

综述

骨形态发生蛋白在椎间盘退变过程中作用及相关机制的研究进展

Advances of the role and mechanism of the bone morphogenetic protein in the intervertebral disc degeneration

陈 智, 沈洪兴

(第二军医大学长海医院骨科 200433 上海市)

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2012.05.16

中图分类号: R681.5 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2012)-05-0458-04

骨形态发生蛋白 (bone morphogenetic proteins, BMPs) 作为促进植骨融合的经典生长因子为大众熟知, 近年来 BMPs 在椎间盘退变过程中的作用及相关机制被广泛关注和研究^[1-3]。BMP-2、-5、-6、-8、-9 和 -14 对软骨细胞的作用被相继发现^[3-12]。越来越多的研究学者认为, 明确 BMPs 在椎间盘中的作用及其机制具有重要意义, 因为 BMPs 有望使椎间盘退变性疾病 (degenerated disc disease, DDD) 通过基因手段获得早期防治, 从而能够减少或避免后期的具有更大创伤的手术治疗。笔者就 BMPs 在椎间盘退变过程中的作用及其相关机制的研究进行综述。

第一作者简介: 男 (1984-), 医学博士, 研究方向: 脊柱外科

电话: (021) 81873396 E-mail: mcgrady923@126.com

通讯作者: 沈洪兴 E-mail: shenhxgk@126.com

1 BMPs 在动物椎间盘退变中的作用及相关机制

1.1 大鼠

早期研究主要是验证 BMPs 是椎间盘中的一种功能性生长因子。Takae 等^[4]选取 3 组不同年龄 (8、24 和 50 周龄) 大鼠, 针对颈椎间盘内 BMP-2、BMP-4 及其受体进行组织学和免疫组化方面的研究, 50 周龄大鼠椎间盘退变较其他 2 组明显; BMP-2、BMP-4 及其受体在不同年龄大鼠椎间盘内表现出明显差异, 8 周和 24 周龄大鼠椎体上下终板的透明软骨内有大量 BMP-2、BMP-4 及其受体的表达, 而在纤维环细胞内的表达则较少; 而 50 周龄大鼠的表达结果则相反。但 BMP-2、BMP-4 分布位置的不同是否会导致椎间盘退变以及退变机制, 仍需进一步研究。

1.2 兔

Murakami 等^[6]研究发现椎间盘 (包括纤维环和髓核细

4 参考文献

1. 凡进, 任永信, 蔡卫华, 等. 兔脊髓缺血再灌注损伤时 Bcl-xL/Bcl-2 相关死亡启动因子的变化及其意义[J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2011, 21(2): 142-147.
2. Lukáš R, Zýková I, Barsa P, et al. Current role of methylprednisolone in the treatment of acute spinal cord injury [J]. Acta Chir Orthop Traumatol Cech, 2011, 78(4): 305-313.
3. 李一帆, 陈东, 张大威, 等. 急性大鼠脊髓损伤 Allen's 法模型改良及电生理评价[J]. 中国实验诊断学, 2010, 14(8): 1169-1172.
4. Bracken MB, Shepard MJ, Collins WF, et al. A randomized, controlled trial of methylprednisolone or naloxone in the treatment of acute spinal cord injury, results of the Second National Acute Spinal Cord Injury Study [J]. N Engl J Med, 1990, 322(20): 1405-1411.
5. Robert AA, Al Jadid MS, Bin Afif S, et al. The effects of different rehabilitation strategies on the functional recovery of spinal cord injured rats: an experimental study [J]. Spine, 2010, 35(23): E1273-1277.
6. Pereira JE, Costa LM, Cabrita AM, et al. Methylprednisolone fails to improve functional and histological outcome following spinal cord injury in rats[J]. Exp Neurol, 2009, 220(1): 71-81.
7. Corwe MJ, Brersnahan JC, Shuman SL, et al. Apoptosis and delayed degeneration after spinal cord injury in rats and monkeys[J]. Nat Med, 1997, 3(1): 73-76.
8. Knobloch SM, Huang X, VanGeelderen J, et al. Selective caspase activation may contribute to neurological dysfunction after experimental spinal cord trauma [J]. J Neurosci Res, 2005, 80(3): 369-380.
9. Yu WR, Liu T, Fehlings TK, et al. Involvement of mitochondrial signaling pathways in the mechanism of Fas-mediated apoptosis after spinal cord injury[J]. Eur J Neurosci, 2009, 29(1): 114-131.
10. Lang-Lazdunski L, Heurteaux C, Mignon A, et al. Ischemic spinal cord injury induced by aortic cross-clamping: prevention by riluzole[J]. Eur J Cardiothorac Surg, 2000, 18(2): 174-181.
11. Lee YB, Yune TY, Baik SY, et al. Role of tumor necrosis factor- α in neuronal and glial apoptosis after spinal cord injury[J]. Exp Neurol, 2000, 166(1): 190-195.

(收稿日期: 2011-12-15 修回日期: 2012-02-07)

(英文编审 蒋欣/贾丹彤)

(本文编辑 刘彦)

胞)的内生性 BMPs 表达量与年龄之间呈正相关。他们将新西兰兔分为 6 个月的低龄组和 3 年的高龄组,处死后取椎间盘组织行 PCR 检测,高龄组兔椎间盘内 BMP-2 和 BMP-7 的 mRNA 均呈现高表达水平。Sowa 等^[7]在此基础上又进一步将新西兰兔分为 6 个月的低龄组,1 年的中龄组和 3 年的高龄组,发现在中、高龄组兔椎间盘内 BMP-2 的表达量较低龄组明显增加。这也证实了随着椎间盘退变程度的增加,BMPs 的表达不断上调,随着年龄增加椎间盘退变加重,需要依靠更多的椎间盘细胞的合成代谢。但无论退变程度如何,增加的 BMPs 表达量始终无法满足因年龄增加椎间盘细胞的分解代谢加快而消耗的那部分,最终失代偿而造成椎间盘的进一步退变。

而在兔椎间盘退变模型的研究中,BMPs 表达情况也不尽相同,究其原因,是由于椎间盘损伤造模方式的不同而导致。Guehring 等^[8]通过在新西兰兔背部的腰椎区域持续负重建立腰椎间盘退变模型,造模后 28d 发现 BMP-2 基因表达量明显增加。随后,Omlor 等^[9]在此基础上进行了改进,给兔腰椎负重后,根据压迫时间长短(1、28 和 56d)分为 3 组,处死动物进行观察,3 组不同压迫时间的兔椎间盘内 BMP-2 的基因表达量较假手术组均增加,且压迫时间最长组表达量最大,说明在椎间盘退变过程中 BMPs 合成代谢的作用不断加强。但值得一提的是,虽然基因表达量增加,但免疫组化检测结果发现,上述两个研究的 BMP-2 的蛋白表达水平却下降,预示着严重受损的椎间盘细胞可能无法表达基因产物。与此相反,Anderson 等^[10]对新西兰兔手术切除部分腰椎间盘建立退变模型,并在术后不同时间处死,发现 BMP-2 基因表达量较对照组并未明显增加,可能与切除了部分腰椎间盘,破坏正常生理结构较为明显,超过正常椎间盘修复负荷极限,无法产生正常的代谢反应有关。

Sobajima 等^[11]用 16G 注射针头对 12 只新西兰兔腰椎行前路穿刺,建立兔腰椎间盘退变模型,在术后 3、6、12 和 24 周获取椎间盘组织并进行相关分析,发现 BMP-2 的基因表达量与假手术组百分比在上述时间点分别为 3.7%、20%、27.5% 和 82.2%;BMP-7 分别为 7.8%、3.5%、24% 和 65.5%,推测由于椎间盘细胞受损后的延迟修复,造成损伤早期大量椎间盘细胞受损,即使后期随着损伤修复能力增加,BMP-2/7 的基因表达增加,也很难弥补先前过度分解代谢造成的损耗,从而造成了椎间盘的进一步退变。他们同时提出,早期使用外源性 BMP-2/7 可能延缓或逆转椎间盘退变。

通过上述不同椎间盘退变动物模型的研究,作为椎间盘内的功能性生长因子,BMPs 在椎间盘退变过程中起到了重要作用。随着生物体年龄的增长,BMPs 在时空分布上均出现了变化,基因表达产物相应增加,可部分修复受损的椎间盘组织。但 BMPs 的具体变化规律仍未完全阐明,且依靠自然的生物代偿作用修复椎间盘的作用有限,因此通过人工的基因治疗手段来进一步弥补生物代偿能

力的不足,有望进一步延缓椎间盘退变的过程,甚至可能恢复受损椎间盘,为椎间盘退变疾病的治疗打开另一扇窗口。

2 BMPs 治疗椎间盘退变的基础研究

2.1 大鼠

Mundy 等^[12]建立大鼠 DDD 模型,采用辛伐他汀治疗,辛伐他汀通过抑制甲羟戊酸的生成来促进 BMP-2、软骨聚集蛋白聚糖、II 型胶原的基因表达。因为加入甲羟戊酸后新陈代谢效应被完全逆转,辛伐他汀部分通过抑制甲羟戊酸通路来上调 BMP-2,促进椎间盘细胞的软骨细胞生成。Zhang 等^[13]根据辛伐他汀剂量分组,发现辛伐他汀剂量与 BMP-2 基因表达量之间呈正相关,进一步验证了辛伐他汀部分通过抑制甲羟戊酸通路来上调 BMP-2 的信号通路机制。Zhang 等^[14]用 21G 注射针头穿刺大鼠椎间盘造模,术后 4 周在椎间盘内注射辛伐他汀,6 周后处死动物,发现注射辛伐他汀组的 BMP-2 基因表达量较损伤对照组明显增加,同时辛伐他汀组髓核细胞质量、T2WI 信号强度均较损伤对照组有明显改善。

还有许多研究者报道了大鼠椎间盘内注射 BMP-7 对退变椎间盘的保护作用的相关研究。Kawakami 等^[15]将 34 只大鼠分为 4 组,第 1 组为假手术组,第 2 组为椎间盘受压损伤 4 周后注射生理盐水组,第 3 组为椎间盘压迫损伤 4 周后注射 BMP-7 后继续压迫,第 4 组在第 3 组基础上注射 BMP-7 后解除压迫,组织学观察发现第 3、4 组均有不同程度的细胞外基质合成增加,提示 BMP-7 能够促进部分椎间盘细胞外基质合成,从而延缓椎间盘退变的过程。Chubinskaya 等^[16]进一步研究注射 BMP-7 后对椎间盘细胞的合成和分解代谢的影响,结果表明外源性注射 BMP-7 可以激发椎间盘内的内源性 BMP-7 的合成,促进椎间盘细胞的合成代谢反应。同时 BMP-7 还具有拮抗椎间盘细胞的分解代谢的能力,从而延缓分解代谢产物的合成速度。

2.2 兔

Guehring 等^[17]将 18 只新西兰兔分为 3 组,使其负载超过腰椎生理极限的重物 28d,第 1 组持续负重,第 2 组采取牵引处理,第 3 组不处理,接受牵引的兔腰椎椎间盘内 BMP-2 基因表达量明显下降,提示在牵引状态下的椎间盘内合成代谢减少。因此,牵引治疗 DDD 的可靠性还需进一步研究。Fei 等^[18]分别取 6 月龄和 3 年龄新西兰兔的 L4/5 椎间盘细胞进行体外培养,同时加入等量的 BMP-2,发现两组均表现为蛋白聚糖聚合物和胶原蛋白 I、II 的增加,但高龄组的表达量较低龄组更多,他们认为使用 BMP-2 治疗 DDD 可以有效帮助退变椎间盘恢复合成代谢能力。Zhang 等^[19]研究发现 BMP-7 可以有效增加髓核细胞内蛋白聚糖含量,BMP-10 则不具备该能力。

许多学者针对 BMP-7 对退变椎间盘的保护作用进行了大量离体和在体研究。Takegami 等^[20]采用白介素-1 α

(interleukin-1 α , IL-1 α)诱发新西兰兔腰椎间盘退变,在离体培养的椎间盘细胞内加入 BMP-7 后,发现 BMP-7 能够减少 IL-1 α 导致的细胞外基质丢失,能有效促进髓核细胞和纤维环细胞中蛋白聚糖和胶原蛋白的增加。An 等^[21]行兔椎间盘活体内注射 BMP-7,与注射生理盐水组和假手术组对照,术后 2、4、8 周时观察椎间盘高度,发现 BMP-7 的应用使椎间盘外基质的丢失减少,与对照相比,能够更好地维持椎间盘高度,延缓椎间盘退变。Masuda 等^[22]的研究同样发现 BMP-7 可以有效维持兔椎间高度,增加 MRI 上椎间盘的含水量和蛋白聚糖等细胞外基质的合成。Miyamoto 等^[23]研究证实 BMP-7 可以使兔椎间盘内的髓核细胞表达蛋白聚糖增加,以及髓核细胞和纤维细胞表达胶原蛋白增加,从而较好地保持椎间盘的弹性和粘性。Imai 等^[24]利用硫酸软骨素酶 ABC 椎间盘内注射诱导兔椎间盘退变,注射 BMP-7 的椎间盘术后 6、8、12、16 周随访含水量较对照组明显增多,椎间高度丢失不明显。

2.3 犬

Wang 等^[25]用重组 2 型腺相关病毒携带 BMP-7 转染犬髓核细胞,转染后 7d 和 14d,椎间盘内蛋白聚糖和胶原蛋白 II 的表达明显增加。

2.4 牛

Zhang 等除了进行兔椎间盘的相关研究,同时也对牛椎间盘进行了类似研究^[26,27]。他们将腺病毒转染牛的关节软骨细胞,分别表达不同的 BMPs (BMP-2, -4, -5, -7, -10, -13),然后在体外与髓核细胞共同培养 6d,结果发现其能促进蛋白聚糖和胶原蛋白聚集,蛋白聚糖按效率从高到低依次是 BMP-7、-10、-4、-2,胶原蛋白按效率从高到低依次是 BMP-2、-5、-7、-4。因此,BMP-2 和 BMP-7 是目前研究已知的牛髓核细胞内 2 种作用最显著的 BMPs。他们同时还发现蛋白聚糖在髓核细胞、内层和外层纤维环细胞内均有表达,在髓核和外层的细胞蛋白聚糖合成速率更快。Kim 等^[28]研究发现,胰岛素样生长因子 1 (Insulin-like growth factor 1, IGF-1) 与 BMP-7 具有协同作用,可以高效促进细胞外基质的合成,延缓椎间盘的退变。

2.5 人类

Wallach 等^[29]从 8 例接受脊柱手术的患者中获取椎间盘组织(4 例颈椎,4 例腰椎),提取椎间盘细胞培养,并转染携带 BMP-2 的腺相关病毒 (adeno-associated virus, AAV),随着载体数量增加,蛋白聚糖的合成效率明显增强。Moon 等^[30]将 22 例接受腰椎手术患者的腰椎间盘细胞进行培养,并用携带不同质粒的腺相关病毒[BMP-2 腺相关病毒 (AdBMP-2),类胰岛素 1 号生长因子腺相关病毒 (AdIGF-1),转化生长因子 β 1 腺相关病毒 (AdTGF β -1)]单独或不同组合进行转染,发现三者同时转染人腰椎间盘细胞时,蛋白聚糖的合成量最高。他们认为,BMPs 配合其他生长因子修复退变椎间盘的效率将更高。

BMPs 除了具有促进合成代谢之外,可能还具有保护作用。已有研究证实,细胞凋亡在 DDD 的椎间盘细胞凋

亡中发挥了一定作用^[31]。Wei 等^[32]从 8 例腰椎手术患者中获得椎间盘组织,进行椎间盘细胞培养,并在基质中加入 rhBMP-7。结果发现,由于肿瘤坏死因子 α (TNF α) 和过氧化氢 (H₂O₂) 的诱导凋亡作用,大量椎间盘细胞出现凋亡反应,但在 rhBMP-7 存在区域,有效阻止了凋亡反应,并维持了细胞外基质的正常环境。

BMPs 已逐渐应用于椎间盘退变性疾病治疗的研究,通过腺相关病毒等载体途径,内源性和外源性增加椎间盘内 BMPs 的表达量,促进细胞外基质的合成,减少椎间盘高度的丢失,对维持椎间盘的正常生理功能,具有重要的意义。

3 小结与展望

近年来针对 BMPs 治疗 DDD 可能性的相关研究正逐渐被广大学者关注,活体和离体实验表明,BMPs 不但在椎间盘内广泛存在,而且可以有效延缓高龄和外伤造成的椎间盘退变过程,减少椎间高度的丢失。离体实验表明,上调 BMPs 的表达能有效增加椎间盘细胞周围基质的合成,延缓椎间盘退变过程。希望在不久的将来,能够发现早期预防椎间盘退变产生的有效治疗方式,更好地为临床上 DDD 的治疗提供一种早期、微创、高效的手段。

4 参考文献

1. Gilbertson L, Ahn SH, Teng PN, et al. The effects of recombinant human bone morphogenetic protein-2, recombinant human bone morphogenetic protein-12, 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.
2. Snelling SJ, Hulley PA, Loughlin J. BMP5 activates multiple signaling pathways and promotes chondrogenic differentiation in the ATDC5 growth plate model[J]. Growth Factors, 2010, 28(4): 268-279.
3. Hiyama A, Sakai D, Tanaka M, et al. The relationship between the Wnt/ β -catenin and TGF- β /BMP signals in the intervertebral disc cell[J]. Cell Physiol, 2011, 226(5): 1139-1148.
4. Takae R, Matsunaga S, Origuchi N, et al. Immunolocalization of bone morphogenetic protein and its receptors in degeneration of intervertebral disc[J]. Spine, 1999, 24(14): 1397-1401.
5. Kim H, Lee JU, Moon SH, et al. Zonal responsiveness of the human intervertebral disc to bone morphogenetic protein-2[J]. Spine, 2009, 34(17): 1834-1838.
6. Murakami H, Yoon ST, Attallah-Wasif ES, et al. The expression of anabolic cytokines in intervertebral discs in age-related degeneration[J]. Spine, 2006, 31(16): 1770-1774.
7. Sowa G, Vadala 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*, 2008, 33(17): 1821-1828.
8. Guehring T, Omlor GW, Lorenz H, et al. Stimulation of gene expression and loss of annular architecture caused by experimental disc degeneration: an in vivo animal study [J]. *Spine*, 2005, 30(22): 2510-2515.
 9. Omlor GW, Lorenz H, Engelleiter K, et al. Changes in gene expression and protein distribution at different stages of mechanically induced disc degeneration: an in vivo study on the New Zealand white rabbit[J]. *J Orthop Res*, 2006, 24(3): 385-392.
 10. Anderson DG, Izzo MW, Hall DJ, et al. Comparative gene expression profiling of normal and degenerative discs: analysis of a rabbit annular laceration model[J]. *Spine*, 2002, 27(12): 1291-1296.
 11. 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]. *Spine J*, 2005, 5(1): 14-23.
 12. Mundy G, Garrett R, Harris S, et al. Stimulation of bone formation in vitro and in rodents by statins [J]. *Science*, 1999, 286(5446): 1946-1949.
 13. Zhang H, Lin CY. Simvastatin stimulates chondrogenic phenotype of intervertebral disc cells partially through BMP-2 pathway[J]. *Spine*, 2008, 33(16): E525-531.
 14. Zhang H, Wang L, Park JB, et al. Intradiscal injection of simvastatin retards progression of intervertebral disc degeneration induced by stab injury[J]. *Arthritis Res Ther*, 2009, 11(6): R172.
 15. Kawakami M, Matsumoto T, Hashizume H, et al. Osteogenic protein-1(osteogenic protein-1/bone morphogenetic protein-7) inhibits degeneration and painrelated behavior induced by chronically compressed nucleus pulposus in the rat[J]. *Spine*, 2005, 30(17): 1933-1939.
 16. Chubinskaya S, Kawakami M, Rappoport L, et al. Anti-catabolic effect of OP-1 in chronically compressed intervertebral discs[J]. *J Orthop Res*, 2007, 25(4): 517-530.
 17. Guehring T, Omlor GW, Lorenz H, et al. Disc distraction shows evidence of regenerative potential in degenerated intervertebral discs as evaluated by protein expression, magnetic resonance imaging, and messenger ribonucleic acid expression analysis[J]. *Spine*, 2006, 31(15): 1658-1665.
 18. Fei QM, Jiang XX, Chen TY, et al. Changes with age and the effect of recombinant human BMP-2 on proteoglycan and collagen gene expression in rabbit annulus fibrosus cells [J]. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2006, 38(11): 773-779.
 19. Zhang Y, Phillips FM, Thonar EJ, et al. Cell therapy using articular chondrocytes overexpressing BMP-7 or BMP-10 in a rabbit disc organ culture model[J]. *Spine*, 2008, 33(8): 831-838.
 20. Takegami K, Thonar EJ, An HS, et al. Osteogenic protein-1 enhances matrix replenishment by intervertebral disc cells previously exposed to interleukin-1[J]. *Spine*, 2002, 27(12): 1318-1325.
 21. An HS, Takegami K, Kamada H, et al. Intradiscal administration of osteogenic protein-1 increases intervertebral disc height and proteoglycan content in the nucleus pulposus in normal adolescent rabbits[J]. *Spine*, 2005, 30(1): 25-32.
 22. Masuda K, Imai Y, Okuma M, et al. Osteogenic protein-1 injection into a degenerated disc induces the restoration of disc height and structural changes in the rabbit annular puncture model[J]. *Spine*, 2006, 31(7): 742-754.
 23. Miyamoto K, Masuda K, Kim JG, et al. Intradiscal injections of osteogenic protein-1 restore the viscoelastic properties of degenerated intervertebral discs[J]. *Spine J*, 2006, 6(6): 692-703.
 24. Imai Y, Okuma M, An HS, et al. Restoration of disc height loss by recombinant human osteogenic protein-1 injection into intervertebral discs undergoing degeneration induced by an intradiscal injection of chondroitinase ABC [J]. *Spine*, 2007, 32(11): 1197-1205.
 25. Wang C, Ruan DK, Zhang C, et al. Effects of adeno-associated virus-2-mediated human BMP-7 gene transfection on the phenotype of nucleus pulposus cells[J]. *J Orthopaed Res*, 2011, 29(6): 838-845.
 26. Zhang Y, Li Z, Thonar EJ, et al. Transduced bovine articular chondrocytes affect the metabolism of cocultured nucleus pulposus cells in vitro: implications for chondrocyte transplantation into the intervertebral disc[J]. *Spine*, 2005, 30(23): 2601-2607.
 27. Zhang Y, Anderson DG, Phillips FM, et al. Comparative effects of bone morphogenetic proteins and Sox9 overexpression on matrix accumulation by bovine annulus fibrosus cells: implications for annular repair[J]. *Spine*, 2007, 32(23): 2515-2520.
 28. 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.
 29. Wallach CJ, Sobajima S, Watanabe Y, et al. Gene transfer of the catabolic inhibitor TIMP-1 increases measured proteoglycans in cells from degenerated human intervertebral discs [J]. *Spine*, 2003, 28(20): 2331-2337.
 30. Moon SH, Nishida K, Gilbertson LG, et al. Biologic response of human intervertebral disc cells to gene therapy cocktail[J]. *Spine*, 2008, 33(17): 1850-1855.
 31. Ariga K, Miyamoto S, Nakase T, et al. The relationship between apoptosis of endplate chondrocytes and aging and degeneration of the intervertebral disc[J]. *Spine*, 2001, 26(22): 2414-2420.
 32. Wei A, Brisby H, Chung SA, et al. Bone morphogenetic protein-7 protects human intervertebral disc cells in vitro from apoptosis[J]. *Spine J*, 2008, 8(3): 466-474.

(收稿日期:2011-09-19 修回日期:2011-12-12)

(本文编辑 李伟霞)