

骨形态发生蛋白在多器官 组织分化发育中的作用及研究进展

刘 蕾^{1,2}, 王 慧², 颜光涛¹, 史 晶², 荫 俊²

(1. 中国人民解放军总医院 基础所生化室, 中国北京 100853; 2. 军事医学科学院 微生物流行病学研究所
病原微生物生物安全国家重点实验室, 中国北京 100071)

摘 要: 骨形态发生蛋白(Bone morphogenetic proteins, BMPs)是一种多功能蛋白,是转化生长因子 TGF- β 超家族成员,参与骨器官发生、形成与再生的过程,同时对神经系统、造血系统的分化发育也有调控作用。目前, BMPs的研究已经涉及发育生物学、遗传学等多个领域,并在临床上具有广泛的应用前景。基于相关研究近况,对 BMPs的分子结构特征及其在多器官组织分化发育中的作用进行分析,为进一步研究 BMPs的体内活性及临床应用提供了理论借鉴和参考。

关键词: 骨形成蛋白; 诱导骨活性; 分化

中图分类号: R318

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2006)S2-0081-05

Roles of Bone Morphogenetic Proteins in the Differentiation and Development of Multiple Organs and Tissues

LIU Lei^{1,2}, WANG Hui², YAN Guang-tao¹, SHI Jing², YIN Jun²

(1. Research Laboratory of Biochemistry, Basic Medical Institute, General Hospital of PLA, Beijing 100853, China; 2. State Key Laboratory of Pathogen and Biosecurity, Academy of Military Medical Science, Beijing 100071, China)

Abstract: Bone morphogenetic proteins (BMPs) are multi-functional proteins that belong to the transforming growth factor beta (TGF- β) superfamily. They involve in bone organogenesis, bone formation and regeneration, and regulate the differentiation and development of nervous system and hematopoietic system. To date, the studies on BMPs relate to many aspects such as development biology and genetics, and BMPs have great prospects for clinical use. A brief overview of the effect of BMPs on the differentiation and development of bone and other organs is provided. Further studies are needed on BMPs to refine our understanding of their activities *in vivo* and to optimize and expand their clinical use.

Key words: BMPs; bone inductive activities; differentiation

(Life Science Research, 2006, 10(4)S2: 081 ~ 085)

骨形成蛋白(bone morphogenetic proteins, BMPs)最初因具有诱导骨形成的作用而得名。随着研究的不断深入,人们发现 BMPs 作为一类重要的形态发生素,不仅在胚胎时期骨组织分化发

育和成年骨损伤修复中起着重要作用,而且还在胚胎发育的中胚层诱导和分化,造血组织的发育以及神经系统的发育和修复等方面都起着重要作用。因此 BMPs 的研究不仅具有重要的理论意

收稿日期: 2006-06-10; 修回日期: 2006-08-04

作者简介: 刘蕾(1980-),女,河北邢台人,军事医学科学院硕士研究生; 王慧(1971-),女,满族,北京人,军事医学科学院副研究员,博士,通讯作者,主要从事微生物毒素及感染免疫研究, Tel: 010-66948532, E-mail: geno0109@vip.sina.com.

义, 还有着良好的临床应用前景. 本文就其在多个系统分化发育中的作用及进展作一综述.

1 BMPs 的结构特征及其受体

BMPs 是转化生长因子 TGF- β 超家族成员, 在胚胎的发生、发育, 组织和细胞的分化、增殖等方面都起着重要作用. 目前至少已发现有40种不同的亚型^[1]. BMPs 属分泌性多功能蛋白质, 是一种30~38 kDa 的同型二聚体, 包括 N 端疏水性的分泌引导序列, 中间区域的前肽和 C 端的成熟区域. 首先 cDNA 编码的一个约400个氨基酸组成的较大前体 pre-pro-BMP, 经翻译后修饰, 切除 N 端信号肽后, 可形成前体蛋白 pro-BMP, 后者受内切蛋白酶作用后, 会生成 C 端100多个氨基酸组成的成熟肽. 成熟肽一般通过一个链间二硫键形成具有生物学活性的二聚体. 其中 C 端成熟区域内的7个高度保守的半胱氨酸可能参与了二聚体的形成(只有 BMP-8例外, 有8个半胱氨酸)另外, 在体外可形成几种 BMP 异源二聚体, 与相应的同源二聚体相比具有更强的生物学活性^[2].

在 BMPs 的信号转导过程中起重要作用的是 I 型和 II 型受体. 其中 II 型受体在空间和时间上的分布有所不同, 这在一定程度上解释了为什么同一种 BMPs 作用于不同的细胞类型会发挥不同的生物学效应, 甚至在细胞生长发育的不同时期会产生不同的生物学反应^[3]. I 型受体和 II 型受体在结构功能上有许多相似性, 都是丝氨酸/苏氨酸激酶受体, 存在较短的含有半胱氨酸的箱式胞外区, 能够选择性地结合 BMPs 并以二聚体的形式存在. 这两种受体间的差别体现在: II 型受体胞内区有一个21个氨基酸组成的 C 端延伸区域, 而 I 型受体在跨膜区及胞内激酶功能域之间有一个20~30个氨基酸的富含甘氨酸、丝氨酸的 GS 结构域, 该区域对于 I 型及 II 型受体的相互作用十分重要. 在 BMPs 与细胞膜 II 型受体结合后, II 型受体可磷酸化 I 型受体高度保守的 GS 结构域上的丝氨酸、苏氨酸残基, 激活 I 型受体传导信号至下游的转录因子 Smads 蛋白. 磷酸化激活的 Smads 转入细胞核, 引起细胞的构象、生长代谢发生变化, 从而参与涉及软骨和骨及其它组织形成基因的转录调控^[4,5].

2 BMPs 在不同器官组织分化发育中的作用

长期以来对 BMPs 生物学活性的研究主要集

中在诱骨活性上, 而近年来的一些研究表明, BMPs 在胚胎、神经及造血系统的分化发育功能等方面也具有重要作用.

2.1 BMPs 在骨形成中的作用

骨形成是指一组未分化的前体细胞移行到损伤部位, 然后在一定的生长因子刺激下定向分化为成骨细胞, 合成胶原, 形成钙化的骨组织. 它需要 3 个必要条件: 1) 刺激因子的存在; 2) 特定的干细胞; 3) 合适的骨形成环境. 骨形成是一个非常复杂的过程, 有很多激素和因子都参与并影响骨的形成, 其中研究最多的是骨诱导因子, 尤其是 BMPs.

BMPs 是有效的分化因子, 能诱导间充质干细胞分化为骨软骨原细胞和成骨前体细胞^[6]. Wan M 等^[7]将 BMP 植入软组织内, 发现其可异位诱导新骨的形成, 而且骨折后骨愈合过程中局部 BMP 的表达水平明显增高, 且局限于骨折骨痂形成区. Cheng 等^[8]用 BMPs 重组腺病毒转染间充质前体细胞和成骨细胞来分析 BMPs(BMP2-15) 在这两种细胞中的活性, 进而证明 BMPs 具有较强的骨诱导能力. 他们通过一个成骨分级模型来解释其研究, 发现 BMP-2、6、9 在介导间充质干细胞向成骨细胞的分化中起着重要的作用, 而其他的多数 BMPs(除 BMP-3、12 外)只对较成熟或终末分化的成骨细胞起诱导作用. 如下图所示^[9]:

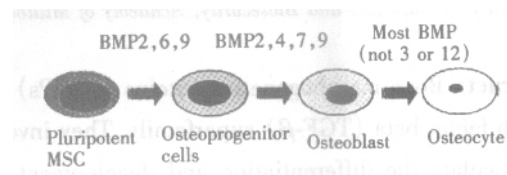


图 1 BMPs 在骨细胞分化过程中的作用
Fig. 1 Overview of the role of different BMPs in osteocytic differentiation

此外, BMPs 也可以诱导肌源性细胞向骨-软骨细胞分化. Gutierrez 等^[10]观察 BMP-2 对肌源性细胞系 C2C12 的作用, 发现 BMP-2 几乎完全抑制 C2C12 细胞内肌小管的形成, 抑制与肌细胞表型相关的基因表达, 但却诱导其表达成骨细胞表型. 在新生小鼠来源的肌肉细胞也观察到了这一结果. 这都表明 BMP-2 可以改变肌源性细胞的分化路径而使其向成骨细胞分化. 但是对骨骼肌来源的细胞系 L6, BMP-2 只抑制其肌小管的形成而不诱导成骨细胞表型的表达^[11], 这说明 BMPs 诱导肌源性细胞向骨细胞分化时依赖于细胞的分化程度.

Cho 等^[12]通过对骨折后愈合阶段的小鼠胫骨的研究,发现在骨折后第1 d BMP-2 和生长分化因子-8(GDF-8) 都有最高的表达。Kang 等^[13]用重组腺病毒表达14种BMPs,结果发现当将BMPs转导的成骨前体细胞或重组腺病毒注射入无胸腺小鼠的四头肌内时,BMP-6和BMP-9能有效地诱导骨形成。研究人员推断BMP-6和BMP-9可能是更为有效的成骨因子。研究进一步证实BMP-3能有效抑制BMP-2、6、7所诱导的骨形成作用,而不能抑制BMP-9的骨诱导作用。

Zhu 等^[14]通过共转染技术将重组BMP-2/7转染入细胞,结果发现与BMP-2或BMP-7单独转染相比较,重组BMP-2/7在诱导骨细胞分化和脊柱融合上具有更有效的作用,进一步证实了BMPs的异源二聚体比它们相应的同源二聚体具有更强的生物学活性。

2.2 BMPs 在胚胎发生中的作用

TGF- β 家族多数成员在胚胎发育的不同阶段都发挥作用。BMPs除了诱骨活性外,在胚胎发育过程中也有重要作用。

在小鼠胚胎形成原肠胚以前和整个原肠胚期间都检测到了BMPs和其下游信号分子的基因表达,包括BMP-2、4、5、7、8 b, Alk2、3, BMPRII, Actr IIa、b, Smad1、5、8。Ying Y 等报道,在小鼠胚胎发育的内细胞团(ICM)期,可以检测到高水平的BMP-4表达;胚胎发育3.5 d时在滋养层细胞中有BMP-4低水平表达;而在胚胎发育的3.5~6.5 d, BMP-4的表达在胚外中胚层中受到抑制;6.75 d后,在胚外中胚层中又可见BMP-4的明显表达^[15、16]。在小鼠中, *bmp-4* 基因的失活可以导致原肠胚的两种主要缺陷:胚外中胚层尿囊的缺乏或极为细小和原始胚芽细胞(PGCs)的完全缺失,这表明胚外中胚层产生的BMP-4对PGCs的存活和血管发生有着重要的意义。

2.3 BMPs 在神经系统发育中的作用

BMPs对脊椎动物神经胚的形成具有重要的调节作用。Liu A^[17]等运用实验胚胎学和遗传学方法最新证明了BMPs在神经组织的形成以及在对神经元形成的类型和数量方面都起到一定的控制作用。脊椎动物胚孔背侧边缘的组织原含有很多参与神经胚形成的BMPs相关因子和BMPs调节蛋白。该组织原包括中胚层和内胚层,在周围邻近的背侧外胚层中诱导正常的神经系统发生。

BMPs在原肠胚期神经胚形成过程中起重要

作用,并且在背腹化过程中、神经嵴发育中对神经谱系分化的调节,在发育中期大脑成熟过程中对胶质细胞谱系的调节以及在发育后期对神经元存活和分化的调节中都扮演着重要角色^[18]。例如Fukuda S等^[19]最新研究发现在胞核内,BMPs的下游转录因子Smad蛋白等协同其它的信号因子可以诱导星形胶质细胞特定基因的表达,从而参与神经前体细胞的星形细胞的分化。

2.4 BMPs 在造血系统发育中的作用

研究表明BMPs在造血细胞的生成、发育中也起着关键的调节作用。Maguer-Satta V等^[20]研究了BMP-2对于早期红系细胞生成作用的机制,证明BMP-2通过增强EPO-R的表达和降低GATA2的表达来作用于红细胞的生成,而且证实BMP-2和BMP-4对activin A诱导红细胞生成的作用有着不同程度的影响。Detmer K等^[21]证实BMPs可作为调节造血祖细胞分化的细胞因子的补体,例如BMP-4可协同GM-CSF和EPO增加红系细胞和粒细胞/单核细胞的数目;BMP-3、BMP-7、BMP-5和BMP-6可刺激粒细胞/单核细胞集落生成。有研究也发现BMPs对成年动物造血损伤后的恢复有一定的诱导和促进作用,可能是通过改善造血微环境或作用于造血调控因子而实现的。在临床上治疗骨髓抑制引起的血液病时,BMPs对造血调控的影响给我们提供了一个新的治疗方向。

2.5 BMPs 在其它器官组织发生中的作用

研究指出我们体内的几乎每一个细胞都受着BMPs的调节,其在多种组织形成中都发挥重要作用。这里就BMPs在心脏和肾脏发育中的作用做一简述。

在小鼠、鸟、蛙、鱼等动物模型中已发现,在心脏原始细胞形成的过程中有大量编码BMPs、TGF- β 及其下游信号分子的基因表达^[22]。许多遗传学和组织胚胎学研究都指出:在心脏发育过程中,BMPs、TGF- β 都起着一定作用。在心脏发育过程中,在胚胎期的第8.0~8.5 d时,在前体心肌层和周围中胚叶可检出BMP-2的表达,随后局限于心房和房室通道。BMP-7的表达水平相对稍低,但广泛表达于整个心肌层,BMP-5主要在心室心肌层,BMP-6则存在于腹侧心肌层^[23]。

在后肾形成过程中和肾发生细胞中有多种BMPs基因的表达:包括BMP-2、BMP-4、BMP-5、BMP-7^[24]。在鼠胚胎的第11 d,由后肾胚肾细胞

中心发出信号至中肾管, 形成输尿管芽, 这时 *BMP-4* 基因的表达在围绕着肾管和输尿管柄的后肾中可以检测到. 基因敲除和肾培养研究均表明: *BMP-4* 可抑制输尿管出芽进程, 但可以加速输尿管芽的生长和延伸, 这样就在肾脏分支形成方面展现了独特的功能^[24]. 也有研究指出: *BMP-7* 在后肾的发生中起着决定性的作用, 输尿管芽胚的形成和肾脏上皮细胞从间充质中分化都需要 *BMP-7* 的参与.

3 BMPs 的临床应用前景和存在的问题

综上所述, BMPs 有着广阔的应用前景. 随着近年来分子克隆技术的发展, BMPs 作用机制的阐明以及新的临床设备器械的产生, 各种特定的高纯度重组 BMP 蛋白的应用得到了迅速发展.

BMPs 作为一种强的诱骨活性因子, 应用主要集中在其诱骨活性方面, 治疗长骨骨折、大面积骨缺损、骨不连、脊椎融合等疾病. 2001 年 10 月, 美国 FDA 批准 OP-1 (*BMP-7*) 作为医疗器械投放市场 (PMA: HO10002), 用于治疗骨不连和骨碎裂长期不愈. 2002 年 7 月, FDA 批准了含 rh*BMP-2* 的医疗器械 InFUSE™ Bone Graft/LT-CAGETM Lumbar Tapered Fusion Device 的商业化, 作为第一个完全的骨移植替代物应用于脊椎融合治疗 (PMA: P000058). 近两年的亚临床和临床研究表明 rh*BMP-2* 和 rh*BMP-7* 结合于可吸收的明胶海绵并移植至骨折部位能诱导骨的形成并可替代自体移植^[25]. 另外, BMPs 在神经再生、造血系统修复等方面也有潜在的开发价值.

当然, BMPs 基因治疗中也存在着许多问题, 其中阻碍其临床应用的最主要问题是其基因治疗技术所用的细胞和病毒载体可能会引起机体的免疫反应. 因此在临床应用前有许多问题尚待解决: 例如, 如何克服机体应用 BMPs 产生的免疫排斥反应及天然 BMPs 对机体的毒副作用; 如何获得生物相容性好、易体内降解, 而又无抗原性的载体来更好地协助 BMPs 发挥骨诱导作用; 如何掌握好使用 BMPs 的适应症和禁忌症等等.

总之, BMPs 的临床应用, 希望与挑战并存, 解决可能存在的问题, 还有赖于对 BMPs 的进一步深入的研究.

参考文献 (References):

[1] HOGAN B L. Bone morphogenetic proteins in development

[J]. *Curr Opin Genet*, 1996, 6: 432-438.

- [2] MATTHEWS S J. Biological activity of bone morphogenetic proteins (BMPs) [J]. *Injury*, 2005, 36 (Suppl 3): 34-37.
- [3] HAYASHI M, IMAMURA T, MIYAZONO K. BMP receptors and signal transduction [J]. *Nippon Rinsho*, 2005, 63 (Suppl 10): 399-403.
- [4] DERYNCK R, FENG X H. TGF- β receptor signalling [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1997, 1333 (2): 105-150.
- [5] SHIMASAKI S, MOORE R K, OTSUKA F, *et al.* The bone morphogenetic protein system in mammalian reproduction [J]. *Endocrine Reviews*, 2004, 25 (1): 72-101.
- [6] SHEA C M, EDGAR C M, EINHORN T A, *et al.* BMP treatment of C3H10T1/2 mesenchymal stem cells induces both chondrogenesis and osteogenesis [J]. *Cell Biochem*, 2003, 90: 1112-1127.
- [7] WAN M, CAO X. BMP signaling in skeletal development [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 328 (3): 651-657.
- [8] CHENG H, JIANG W, PHILLIPS F M, *et al.* Osteogenic activity of the fourteen types of human bone morphogenetic proteins (BMPs) [J]. *Bone Joint Surg Am*, 2003, 85 (8): 1544-1552.
- [9] GOVENDER P V, RAMPERSAUD Y R, RICKARDS L, *et al.* Use of osteogenic protein 1 in spinal fusion: literature review and preliminary results in a prospective series of high risk cases [J]. *Neurosurg Focus*, 2002, 15 (13 (6)): e4.
- [10] GUTIERREZ J, OSSES N, BRANDAN E. Changes in secreted and cell associated proteoglycan synthesis during conversion of myoblasts to osteoblasts in response to Bone Morphogenetic Protein-2: role of decorin in cell response to BMP-2 [J]. *Cell Physiol*, 2005, 26.
- [11] KATAGIRI T, YAMAGUCHI A, KOMAKI M, *et al.* Bone Morphogenetic Protein-2 converts the differentiation pathway of C2C12 myoblasts into osteoblast lineage [J]. *Cell Biol*, 1994, 127 (6): 1755.
- [12] CHO T J, GERSTENFELD L C, EINHORN T A. Differential temporal expression of members of the transformation growth factor beta superfamily during murine fracture healing [J]. *Bone Miner Res*, 2002, 17 (3): 513-520.
- [13] KANG Q, SUN M H, CHENG H, *et al.* Characterisation of the distinct orthotopic bone-forming activity of 14 BMPs using recombinant adenovirus-mediated gene delivery [J]. *Gene Ther*, 2004, 11 (17): 1312-1320.
- [14] ZHU W, RAWLINS B A. Combined bone Morphogenetic protein-2 and -7 gene transfer enhances osteoblastic differentiation and spine fusion in a rodent model [J]. *Bone Miner Res*, 2004, 19 (12): 2021-2032.
- [15] YING Y, LIU X M, MARBLE A, *et al.* Requirement of BMP8b for the generation of primordial germ cells in the mouse [J]. *Mol Endocrinol*, 2000, 14: 1053-1063.
- [16] YING Y, ZHAO G Q. Cooperation of endoderm-derived BMP-2 and extraembryonic ectoderm-derived BMP-4 in primordial germ cell generation in the mouse [J]. *Dev Biol*, 2001, 232: 484-492.

- [17] LIU A, NISWANDER L A. Signalling in development: Bone morphogenetic protein signalling and vertebrate nervous system development[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2005 6(12): 945-954.
- [18] YAMAMOTO Y, OELGESCHLAGER M. Regulation of bone morphogenetic proteins in early embryonic development[J]. *Natur wissenschaften*, 2004, 91(11): 519-534.
- [19] FUKUDAL S, TAGA T. Roles of BMP in the development of the central nervous system [J]. *Clin Calcium*, 2006, 16(5): 781-785.
- [20] MAGUER-SATTA V, BARTHOLIN L, JEANPIERRE S, *et al.* Regulation of human erythropoiesis by activin A, BMP2, and BMP4, members of the TGF-beta family[J]. *Exp Cell Res*, 2003, 282(2): 110-120.
- [21] DETMER K, WALKER A N. Bone morphogenetic proteins act synergistically with haematopoietic cytokines in the differentiation of haematopoietic progenitors[J]. *Cytokine*, 2002, 17(1): 36-42.
- [22] SCHLANGE T, ANDREE B, ARFNOLD H H, *et al.* BMP-2 is required for early heart development during a distinct time period[J]. *Mech Dev*, 2000, 91: 259-270.
- [23] KIM R Y, ROBERTSON E J, SOLLOWAY M J. BMP6 and BMP7 are required for cushion formation and septation in the developing mouse heart[J]. *Dev Biol*, 2001, 235: 449-466.
- [24] MIYAZAKI Y, OSHIMA K, FOGO A, *et al.* Bone morphogenetic protein 4 regulates the budding site and elongation of the mouse ureter[J]. *Clin Invest*, 2000, 105: 863-873.
- [25] EINHORN T A, MAJESKA R J, MOHAIDEEN A, *et al.* A single percutaneous injection of recombinant human bone morphogenetic protein-2 accelerates fracture repair[J]. *Bone Joint Surg Am*, 2003, 85: 1425-1435.