

· 综 述 ·

重组人骨形态发生蛋白-7 的研究与应用

陈 聪¹, 孟 勇¹, 刘贵峰²综述, 齐 强³审校

(1. 威海市立医院脊柱骨病外科, 山东威海 264200; 2. 哈尔滨工业大学海洋学院, 山东威海 264209; 3. 北京大学第三医院骨科, 北京 100083)

关键词: 重组人骨形态发生蛋白-7; 结构; 功能; 临床应用

doi: 10. 3969/j. issn. 1671-8348. 2012. 28. 042

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2012)28-2997-02

1965 年, Urist^[1] 在研究中发现, 把脱钙的皮质骨植入动物的肌肉中, 1~2 周后会有新骨形成。他的结论是, 植入的骨虽是死的, 但其中可能含有某种物质在诱导新骨的形成。Urist 从皮质骨中提取物获得了对成骨至关重要的骨形态发生蛋白 (bone morphogenetic protein, BMP), 在全世界范围内掀起了成骨诱导研究的热潮。其后的大量研究表明, BMP 具有跨种属诱导成骨、新骨生成迅速且生成量与 BMP 植入量呈正相关等特点^[2-3]; 而且 BMP 是一个多功能因子, 参与调节多种细胞的增殖、分化和凋亡的生物学过程, 在胚胎发育、出生后各组织器官内环境稳定及多种肿瘤的发生中都有重要作用^[4]; 此外, BMP 不仅在肾脏发育中具有重要作用, 还与许多肾脏疾病有关, 特别是与糖尿病肾病密切相关^[5]。其中, 骨形态发生蛋白-7 (BMP-7) 结构和功能的研究已取得了一定的进展, 在临床上也得到了广泛应用。

1 BMP-7 的结构

BMP-7 又称 OP-1, 是一类具有促进成骨细胞生长、增殖和基质合成作用的蛋白质或多肽, 属于转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β) 超家族成员中的重要一员, 属 Dpp/Vgl 亚群, 与 BMP-2、BMP-5、BMP-6 家族有密切的关系, 具有广泛的生物活性^[6]。由人 BMP-7 的 cDNA 序列可以推测出 BMP-7 是一段由 431 个氨基酸组成的多肽, 以一段 29 个氨基酸残基的信号肽为起始序列, 中间第 29~292 位氨基酸称为前肽, 第 293~431 位氨基酸称为成熟肽^[7]。重组蛋白是通过成熟肽同源二聚体的形式进行分泌, 具体步骤: 由蛋白酶识别 Arg-X-X-Arg 的加工信号, 然后在第 292 位的 Arg 和 293 位的 Ser 之间切割得到。这种成熟肽形成的同源二聚体 $[(30\sim36)\times 10^3]$ 含有 2 个单体, 分别含有 139 个氨基酸。

2 重组人骨形态发生蛋白-7 (rhBMP-7) 的生物学功能

rhBMP-7 是通过基因工程技术, 将克隆的 BMP-7 片段通过载体转入原核或真核体系中进行表达, 从而得到有很好生物学活性、纯度高的 rhBMP-7 成熟肽, 在骨骼系统和器官的再生、修复和保护过程中发挥着重要作用^[8], 具有广泛的应用前景。

2.1 在骨骼系统中的作用 rhBMP-7 能在体内外诱导未分化的间充质细胞分化成软骨细胞, 促进成骨细胞诱导成骨, 还能促进软骨细胞分泌 II 型胶原和透明质酸^[9], 在骨代谢和骨再生中发挥重要作用^[10]。Sampath 等^[11] 对 rhBMP-7 通过骨诱导作用促进新骨快速生成进行了研究。实验选用骨胶原作为载体, 将 rhBMP-7 植入大鼠皮下组织, 使其诱导异位成骨, 5 d 后可以发现植入部位有大量软骨细胞产生; 9 d 后有新毛细血

管生成, 软骨细胞钙化, 随后新骨开始形成; 到第 14~21 天时大部分矿化骨开始重建, 形成骨髓腔, 可以观察到粒细胞、红细胞和巨核细胞在腔内发育。通过与高纯化牛成骨蛋白组的比较, 可见 rhBMP-7 的作用特异性更高, 成骨活性更强, 而单纯植入载体组和不植入载体组均未能诱生新骨。

卞翠荣等^[12] 通过对新西兰白兔进行植入 rhBMP-7 手术后的观察与研究, 证实了 rhBMP-7 的修复及促进新骨再生的功能。实验以明胶海绵为载体, 经过与大肠杆菌原核表达的 rhBMP-7 复合后植入即刻拔除牙齿的牙槽窝内进行干预治疗, 术后 2、4、8 及 12 周将动物处死, 取标本分别进行大体观察、扫描电镜分析、碱性磷酸酶 (ALP) 活性测定。大体观察的结果表明, 实验组和对侧牙槽嵴高度的吸收有显著性差异; 扫描电镜分析显示, 实验组的骨愈合比对照组提前大约 4~6 周; ALP 活性测定显示实验组均明显高于对照组。因此, 可以得出结论: 核表达的 rhBMP-7 具有促进新骨修复再生、防止牙槽骨吸收的作用。

rhBMP-7 是骨细胞分化和成骨的有效调节剂, 对因外科手术造成牙周伤口的愈合有促进作用。Giannobile 等^[13] 在研究中建立了小猎犬上颌双侧 5 mm 齿槽骨缺损唇裂模型, 并随机分为 3 组, 一侧接受以胶原为载体的 rhBMP-7 治疗, 剂量分别为 0.75、2.5、7.5 mg/g 胶原, 而对侧进行单纯载体治疗。8 周后经过组织病理学分析, 得到了齿槽骨的重建参数 (包括骨生成区域、骨厚度、损伤部位被新骨覆盖百分比等)。结果表明, 3 种剂量的 rhBMP-7 治疗位点相对于单纯载体一侧均有明显的骨、牙骨质再生和新的吸附形成, 其中 7.5 mg 治疗组, 生成骨面积和重建骨厚度与另两组比较差异有统计学意义 ($P < 0.0001$)。因此, 该研究肯定了 rhBMP-7 在牙周损伤愈合中的重要作用, 为其应用于人类牙周损伤的治疗打下了坚实基础。

2.2 rhBMP-7 对器官的修复和保护作用 rhBMP-7 是一种较强的生物活性因子, 是胚胎期器官发育的重要调节因子, 是维持机体内多种器官内环境稳定的重要因素, 并参与各器官的修复和保护过程^[14]。

许霁虹等^[15] 选用大鼠作为实验动物, 构建了 Wistar 大鼠心肌缺血再灌注模型, 证实了 rhBMP-7 对心肌缺血再灌注损伤的保护作用。实验将大鼠随机分为 3 组, 分别为对照组 (C 组)、缺血再灌注组 (I 组) 和 rhBMP-7 处理组 (B 组), 每组 10 只。在血流阻断前 10 min 对 B 组给予剂量为 250 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的 rhBMP-7 股静脉注射, C 组和 I 组给予等量生理盐水。在血流再灌注后 24 h 取血, 对磷酸肌酸激酶 (CPK) 和乳酸脱氢酶

(LDH)含量;经过心肌匀浆后检测超氧化物歧化酶(SOD)活性和丙二醛(MDA)含量;在电镜下观察心肌组织学变化。结果显示:大鼠心肌缺血再灌注 24 h 后, rhBMP-7 处理组的心肌酶含量和 MDA 均明显低于 I 组, SOD 活性增加 ($P < 0.01$), 而且心肌细胞的坏死程度也明显轻于 I 组。因此, 得到结论, rhBMP-7 可以降低心肌脂质过氧化, 增强心肌抗氧化酶活力, 对心肌缺血再灌注损伤具有保护作用。

此后, 许霓虹等^[16]又为了探讨 rhBMP-7 对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用, 采用线栓法构建了局灶脑缺血再灌注模型。实验随机分为 3 组, 分别为对照组(C 组)、缺血再灌注组(I 组)和 rhBMP-7 处理组(B 组)。在再灌注开始前 30 min 以 250 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的剂量对 B 组给予 rhBMP-7 尾静脉注射, C 组和 I 组给予等量生理盐水。在血流再灌注后 24 h 神经功能缺陷评分后取脑, 对脑含水量和梗死体积进行测定, 再计算脑梗死体积比, 并在电镜下观察脑超微结构发生的变化。结果显示: B 组大鼠经过脑局灶性缺血再灌注 24 h 后, 神经功能缺陷评分明显下降, 而且脑含水量和梗死体积比明显低于 I 组 ($P < 0.01$), 神经细胞的坏死程度也明显轻于 I 组。因此, 可以得出结论, rhBMP-7 可以缩小梗死体积, 减轻脑水肿, 对脑缺血再灌注损伤具有保护作用。

3 rhBMP-7 的临床应用

由于 rhBMP-7 的安全性和高效诱导成骨活性被越来越多的试验所证实, 在一些国家(如欧洲、美国、澳大利亚)已步入临床实验阶段。通过大量的临床实验表明, rhBMP-7 可以治疗新鲜骨折、骨缺损、骨不连、脊柱融合、股骨头缺血性坏死等^[17]。

安新玲等^[18]采用皮内多点注射法将 rhBMP-7 免疫新西兰大白兔 4 次, 每次间隔 2 周, 免疫后颈动脉插管取血。通过 ELISA 法测定抗血清效价为 1:640 000 000; 通过蛋白免疫印迹技术从小鼠骨组织及肾脏组织中提取的 BMP-7 证实抗体有很好的特异性, 抗血清的最佳稀释度为 1:5 000~1:50 000, 灵敏度为 1~100 ng。因此, 该研究成功制备了 rhBMP-7 抗体, 并具有很高的特异性及灵敏度, 为 rhBMP-7 临床应用奠定了基础。

Vaccaro 等^[19]通过对 36 例椎板切除术后患者的临床实验分析, 证实了 rhBMP-7 作为一种新策略在椎板的修复中可以替代自体骨移植。对患者分别进行 rhBMP-7 复合 I 型胶原给予治疗和自体骨移植治疗, 术后 4 年对 22 例(其中 16 例 rhBMP-7 复合 I 型胶原, 6 例自体骨移植)进行放射检查, 结果显示: 两组放射学愈合率分别为 68.8% 和 50.0%; 对 25 例(其中 18 例 rhBMP-7 复合 I 型胶原, 7 例自体骨移植)进行临床检查, 结果显示: 两组的临床愈合率分别为 73.7% 和 57.1%, 两组的总体愈合率分别是 62.5% 和 33.3%, 因此, rhBMP-7 的临床效果相对较为显著, 肯定了 rhBMP-7 作为一种骨诱导因子在骨重建中的重要作用。

Geesink 等^[20]在实验中证实了 rhBMP-7 在腓骨切开术中的价值。骨基质经过去矿物质作用后作为载体, 并设立空白对照组, 结果显示实验组在 6 周后就有新骨形成, 而对照组骨无明显变化, 表明了 rhBMP-7 与自体骨移植有着相同的功效。以 I 型胶原作为载体的 rhBMP-7 植入过程也证实了 rhBMP-7 在人腓骨损伤修复中具有显著的成骨活性。

Gary 等^[21]对 124 例胫骨骨不连患者进行了 rhBMP-7 种植和自体骨移植的对比, 临床实验进一步证实了 rhBMP-7 的优越性。将患者随机分为两组, 分别应用 rhBMP-7 种植加内固定和普通自体骨移植加内固定。结果显示: 自体骨移植治疗组的感染率及术后慢性疼痛症状的发生率明显高于 rhBMP-7 组。这表明 rhBMP-7 作为高效诱导分子, 能够诱导细胞和血管的生成, 为骨的修复和重建提供必要的准备, 具有安全可靠的优势; 同时还可以说明 rhBMP-7 很有可能在其他部位的肌肉与骨骼异常中发挥重要作用, 为临床研究提供了一定的科学指导。

近年来, 国内外学者对 rhBMP-7 的临床应用研究已取得了初步成功。随着分子生物学技术的发展, 以基因工程方法大量获取 rhBMP-7 已经实现。在美国 Creative Biomolecules 与 Stryker 企业合作开发下 rhBMP-7 已进入临床试验, 主要用于修补脊柱融合术、畸形缺陷、骨和软骨的缺损及骨折愈合以及治疗牙齿再生等。这种基因工程产品具有纯度高(90%以上)、特异性好、活性强, 可大规模生产以及无病原体污染和免疫排斥反应等优点, 如果能推广应用, 必将开创在分子水平研究和治疗骨缺损的新时代。

参考文献:

- [1] Urist MR. Bone formation by autoinduction[J]. Science, 1965, 150(6):893-899.
- [2] 杜鹏, 刘维钢. 骨形态发生蛋白治疗骨折和骨缺损的发展及临床疗效[J]. 医学综述, 2009, 15(14):2128-2131.
- [3] 徐世旭, 阳富春. 骨形态发生蛋白的成骨作用及其在骨组织工程中的应用[J]. 医学综述, 2008, 14(2):193-195.
- [4] 郭丹, 黄佳祎, 印国兵, 等. 骨形态发生蛋白在乳腺癌增殖、转移中作用的初步筛选[J]. 重庆医学, 2010, 39(7):807-809.
- [5] 陈利群, 余素君, 甘华. 氯沙坦对糖尿病肾病患者血和尿中骨形态发生蛋白-7 浓度的影响[J]. 重庆医学, 2011, 40(23):2318-2320.
- [6] 辛洪奎, 张超, 阮狄克, 等. 骨形态发生蛋白-7 及其对椎间盘退变修复作用的研究进展[J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2011, 21(5):416-418.
- [7] 安新玲, 韩金祥, 王世立. 重组人骨形态发生蛋白-7 表达系统研究进展[J]. 生物技术通讯, 2009, 20(6):846-848.
- [8] 沈奕, 李晓森, 王伟力, 等. 骨形态发生蛋白-7 在骨科的应用[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(26):4864-4867.
- [9] 张洁, 刘巍, 朱新辉, 等. 转腺病毒人骨形态发生蛋白-7 软骨细胞分泌的透明质酸和 II 型胶原[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(28):5153-5156.
- [10] 安新玲, 韩金祥, 王世立. 骨形态发生蛋白的研究进展[J]. 食品与药品, 2009, 11(1):69-73.
- [11] Sampath TK, Maliakal JC, Hauschka PV, et al. Recombinant human osteogenic protein-1 (rhBMP-7) induce new bone formation in vivo with a specific activity comparable with natural bovine osteogenic protein and stimulates osteoblast proliferation and differentiation(下转第 3007 页)

力。根据教师上传的学习资源,制定科学的学习计划,优化学习策略,学生通过网络搜索专业知识,部分学生查到资料产生愉悦感促进学习,而部分学生因查不到资料产生挫败感而继续努力或放弃查找^[8]。由于学习习惯不同,能否接受网络学习,是否熟练使用电脑及是否拥有电脑都直接影响到使用网络辅助学习的积极性。

本研究表明,利用网络教学平台进行教学有利于提高护理专业本科学生自主学习能力,为教学改革提供了依据,同时,教师应结合自身及学生特点,科学有效地使用网络教学平台将更加有利于教学质量的提高。(1)在实施教学前,教师应充分根据学科性质和学生特点,对教学环节进行设计,充分利用网络教学平台辅助教学,以提高教学质量。(2)更新教育观念,鼓励并培养学生自主学习能力,充分发挥教师主导作用,注重培养本科生信息行为倾向,提升积极的信息意识状态^[9],引导学生,从被动学习转变为主动获得信息,积极主动学习。(3)充分利用平台加强师生交流,增加了新的课外辅导方式,有效打破传统教学中的师生关系界限,为学生双向或多向交流提供了方便,及时的信息交流使讨论的范围从小组扩大到了全班,既能使学生积极寻求解决问题的方法,有效弥补课堂教学的局限性,又能锻炼学生的组织协调能,不断提高团队合作意识。(4)不断提高自身素质建设,满足教学需求^[10]。教师作为传道、授业、解惑者,除了要有扎实的专业理论和教育学理论,精湛的操作技术,更应具备终身学习的能力,灵活运用各种现代教育技术方法和手段,掌握获取信息的方法。学习先进的教育技术方法和手段,丰富教学资源,提高教师素质建设,最终提高教学质量。

参考文献:

[1] 胡韵,姜安丽.宏观环境改变对构建高等护理教育培养目标

(上接第 2998 页)

- in vitro[J]. J Biol Chem,1992,267(28):20352-20362.
- [12] 卞翠荣,肖水清,汲平.原核表达重组人骨形态发生蛋白-7 对牙槽骨修复再生的实验研究[J].华西口腔医学杂志,2007,25(4):323-326.
- [13] Giannobile WV,Ryan S,Shih MS,et al. Recombinant human osteogenic protein-1 (OP-1) stimulates periodontal wound healing in class III furcation defects[J]. J Periodontol,1998,69(2):129-137.
- [14] Chen D,Zhao M,Mundy GR. Bone morphogenetic proteins[J]. Growth Factors,2004,22(2):233-241.
- [15] 许霁虹,王俊科,袁治国,等.重组人骨形态发生蛋白-7 对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用[J].中国老年学杂志,2006,26(12):1641-1643.
- [16] 许霁虹,赵彦艳,张铁铮,等.重组人骨形态发生蛋白-7 对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤的保护作用[J].中国老年学杂志,2009,29(22):2924-2926.
- [17] Moghaddam A,Elleser C,Biglari B,et al. Clinical application of BMP 7 in long bone non-unions[J]. Arch Orthop

标的启示[J]. 护理研究,2007,21(6):1413-1415.

- [2] 安力彬,李丽娟,李文涛.护理本科生自主学习能力调查与分析[J].中华现代护理杂志,2010,16(12):1449-1451.
- [3] Stern DT,Woitzak A,Schwarz MR. The assessment of global minimum essential requirements in medical education[J]. Medical Teacher,2003,24(6):589-595.
- [4] 杨江林.研究式学习在《护理研究》教学中的应用[J].中华护理杂志,2009,44(7):628-630.
- [5] 雷晓玲,史亚琴.护理专业本科生学习策略调查与分析[J].中国电力教育,2011,10(2):175-176.
- [6] 王莉莉,李悦,朱仁英.合作学习促进护理本科生自主学习能力的实践[J].中国高等医学教育,2011,9(1):105-107.
- [7] 刘军,丁芮,林芝芳,等.通过网络教学平台进行护理学基础教学的实践[J].山西医科大学学报:基础医学教育版,2009,11(1):117-119.
- [8] Pawlina W. Basic sciences in medical education; why how when where[J]. Medical Teacher,2009,31(9):787-789.
- [9] 王缘,李莎莎,杨楠. PBL 教学法对护理本科生信息意识的影响[J]. 护理学杂志,2011,26(1):63-64.
- [10] 陆爱平,罗晨玲.《护理学基础》网络教学教师行为探讨[J].南方护理学报,2005,12(1):67-68.

(收稿日期:2012-03-06 修回日期:2012-04-16)

Trauma Surg,2010,130(1):71-76.

- [18] 安新玲,王志宇,刘肖帅,等.重组人骨形态发生蛋白-7 抗体的制备及鉴定[J].山东医药,2009,49(1):27-28.
- [19] Vaccaro AR,Whang PG,Patel T,et al. The safety and efficacy of OP-1(rhBMP-7) as a replacement for iliaccrest autograft for posterolateral lumbar arthrodesis: minimum 4-year follow-up of a pilot study[J]. Spine J,2008,8(3):457-465.
- [20] Geesink RG,Hoefnagels NH,Bulstra SK. Emerging strategies of bone and joint repair[J]. J Bone Joint Surg Br,1999,81(4):710-718.
- [21] Gary E,Clayton R,Perry MD,et al. Osteogenic protein-1 (bone morphogenetic protein-7) in the treatment of tibial nonunions;a prospective,randomized clinical trial comparing rhOP-1 with fresh bone autograft[J]. J Bone Joint Surg Am,2001,83(1):151-158.

(收稿日期:2012-02-28 修回日期:2012-04-23)