

· 综 述 ·

强直性脊柱炎相关骨化因子研究进展*

许红飞 综述, 初同伟 审核

(第三军医大学新桥医院骨科, 重庆 400037)

关键词: 脊柱炎; 强直性; 血管内皮生长因子; 骨形态发生蛋白类; 转化生长因子; 基质金属蛋白酶 3

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.15.036

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2013)15-1769-03

强直性脊柱炎(ankylosing spondylitis, AS)是一种慢性自身免疫性疾病,主要累及人体中轴骨关节系统,特征性病理改变是肌腱和韧带的骨附着点炎及炎症后骨化,多见于青壮年,部分患者还伴有不同程度的眼、肺、心血管、肾等其他病变。最严重的后果是脊柱强直,故重视 AS 骨化机制的研究十分重要。近年来,随着对 AS 病理研究的深入,已发现一些与骨化相关的蛋白因子参与了 AS 软组织骨化病理改变的过程,使得对其疾病演变过程有了更清晰的认识。AS 在炎症性关节炎中占第二位,以异位骨形成导致骨硬化为特征,即肌腱端炎。肌腱端炎的病理过程是指关节囊、肌腱、韧带的骨附着点为中心的慢性炎症,炎症部位肉芽组织形成,最终肌腱端出现纤维化和骨化,最多发生在骶髂关节、椎间盘、椎体周围韧带等部位,肌腱附着点通常被认为能提供新骨形成所需的基质,以及前体细胞微小的生长平台。在新骨形成的过程中,有多种蛋白成分参与了局部组织的破坏、成骨细胞的分化增殖、血管的增生。如血管内皮生长因子(vascular endothelial growth, VEGF)、骨形态发生蛋白(bone morphogenetic protein, BMP)、转化生长因子 $\beta 1$ (transforming growth factor- $\beta 1$, TGF- $\beta 1$)、结缔组织生长因子(connective tissue growth factor, CTGF)、基质金属蛋白酶 3(matrix metalloproteinase3, MMP-3)。本文主要针对参与 AS 软组织骨化病理改变的相关蛋白进行综述。

1 VEGF

VEGF 又名血管通透因子,属血小板生长因子家族,是一种特异性促内皮细胞分裂素,能够刺激体外培养的内皮细胞成活,进行有丝分裂、分化、生长和迁移,它通过与血管内皮细胞膜上的受体结合,迅速增加细胞内钙离子浓度,经磷酸肌醇特异性磷酸酯酶 C 途径,特异性的促血管内皮细胞增生和血管生成^[1]。有研究发现,AS 患者血清中 VEGF 高于正常人,且与 C 反应蛋白、红细胞沉降率、疾病活动程度呈正相关关系^[2],VEGF 基因的多态性也可能与疾病的严重程度相关^[3]。在接受肿瘤坏死因子拮抗剂治疗后的患者,其血 VEGF 水平有明显的下降^[4],且与 AS 疾病活动评分(ASDAS)有一致性的改善^[5],故也可把 VEGF 用来作为一个评判疾病活动程度的指标。VEGF 在 AS 中升高可能与它的促成骨作用有关。已有研究证实,VEGF 具有明显的成骨作用,可以加速骨折的愈合^[6],骨化必伴有血管生成,骨化初期的血管增生标志着骨化的开始,此过程有 VEGF 的参与^[7]。有研究运用原位杂交的方法证实了在 AS 活动期患者棘间韧带、骶髂关节滑膜组织中的成纤维细胞及滑膜细胞内 VEGF mRNA 呈强阳性表达^[8-9]。可能通过以下几方面发挥作用:(1)促进局部内皮细胞分泌 BMP,通过 BMP 介导成骨作用^[10];(2)作用于单核细胞使其向

成骨细胞迁移,进而发挥成骨作用^[11];(3)诱导水解酶、组织因子、基质胶原酶等释放,改变细胞外基质,介导骨与软骨破坏^[12];(4)促进病变区域血管形成,输送更多的骨化因子到达病变部位,加速骨化的发展。

2 BMP

BMP 主要位于骨髓基质细胞、骨膜细胞和骨细胞内^[13]。1985 年有学者观察到脱钙骨基质具有诱导成骨的能力,并发现 BMP 是骨形成的关键因子。BMP 与其受体结合后,通过激活 co-Smad 信号蛋白并结合辅助因子复合物进入细胞核,调节靶基因的表达。在体内 BMP 具有多种生物学效应,在诱导成骨和生长与调控方面发挥着重要作用,通过旁分泌和自分泌的形式,能够诱导血管、肌肉和筋膜周围游离的和未分化的间充质细胞及纤维细胞,转化为不可逆的骨系细胞,从而促进骨折愈合,与骨、软骨、肌腱、牙周组织等形成有极为密切的关系。有研究表明,在脊柱关节病的小鼠模型中,BMP 参与肌腱末端骨形成^[14],运用 BMP 细胞外拮抗药物 noggin 后,内源性 BMP 水平降低,延缓了关节软骨向骨形成的转化^[15]。在人类 BMP 的 noggin 基因的点突变,可导致多发的关节融合及进行性关节腔狭窄^[16]。目前基因重组 BMP 已经广泛用于临床,通过载体植入缓释、局部注射、基因治疗等途径,有效的促进骨形成,加速骨折愈合。研究证实,活动期 AS 患者骶髂关节滑膜组织中 MBP-2 mRNA 强阳性表达^[17],且 AS 血清 BMP 水平与脊柱和髋关节放射学评分(BASRI)呈正相关^[18],通常伴有 BMP 抑制物 Sclerostin 表达降低^[19],说明 BMP 为 AS 病理性成骨过程中的重要的成骨因子。其机制可能为,AS 活动期患者某些因子刺激邻近的骨细胞、骨膜细胞等分泌 BMP-2,促进成纤维细胞向成骨细胞转化,病理性骨组织增生,破坏关节正常结构,导致关节骨性强直。

3 TGF- $\beta 1$

TGF- $\beta 1$ 是 TGF- β 超家族成员的核心因子,具有广泛的生物学效应,在炎症和纤维化过程中均起关键的作用。TGF- $\beta 1$ 不同的生物学活性尤其是其前炎和抗炎的双向调节特性,文献报道它在脊柱关节病中的作用复杂多样^[20-21]。有报道称,AS 患者血清 TGF- $\beta 1$ 水平较健康对照者明显升高^[22],骶髂关节组织中存在 TGF- $\beta 1$ /Smad 通路表达异常^[23],而骶髂关节又是 AS 的主要病变靶点,TGF- $\beta 1$ 升高说明它在病理改变过程扮演了重要角色。TGF- $\beta 1$ 是已知单核细胞趋化因子中最强的一种,可由多种实质细胞产生,炎症时由渗出细胞,如单核细胞、淋巴细胞等产生或分泌,在炎症早期少量 TGF- $\beta 1$ 聚焦在炎症部位,导致单核细胞向炎症部位聚焦。单核细胞数量增多后,又大量产生 TGF- $\beta 1$,高浓度的 TGF- $\beta 1$ 又可继续趋化和激活

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81071523);重庆市自然科学基金重点项目(CSTC2011BA5009)。 作者简介:许红飞(1982~),主治医师,硕士研究生,主要从事脊柱外科学研究。

单核细胞,并且 T 细胞被吸引至炎症部位,这样就加重了病变部位的炎症。TGF- β 1 上调白介素等前炎症因子和 MMP 表达来加重关节部位的炎症,还可以促进 Th17 分化而参与炎症反应,并且通过与 TNF- α 及 RANKL 的协同效应诱导破骨细胞分化,对软骨和骨进行破坏^[24]。除了参与炎症外,TGF- β 1 还能协助 BMP 促进骨膜生发层间充质细胞的增殖、成熟、分化为骨系细胞,加速骨组织的形成。

4 CTGF

CTGF 是一种富含半胱氨酸的多肽,属于即刻早期基因家族,具有促进细胞外基质合成等作用,参与机体组织的创伤修复,在组织器官纤维化过程中起着重要作用。它不仅能促进软骨增殖和分化、软骨细胞外基质合成及血管形成,还能修复损伤的关节软骨、促进软骨再生^[25]。目前认为,CTGF 与 TGF- β 1 关系密切。CTGF 与 TGF- β 1 结合后,增强 TGF- β 1 与受体结合的能力,从而活化 TGF- β 1 信号通路。成骨细胞中 TGF- β 1 能诱导 CTGF 的表达,同时在 TGF- β 1 诱导成骨细胞外基质产生的过程中,CTGF 是其重要的下游调节器^[26-27]。TGF- β 1 是激活 CTGF 的主要因子,CTGF 被 TGF- β 1 诱导分泌。AS 患者骶髂关节组织中,在血管翳炎症细胞及骨髓细胞的细胞质内高表达 CTGF^[28],CTGF 的过度表达可诱发及增加 I 型胶原的合成,这可能是 CTGF 在 AS 关节病变的主要作用机制。

5 MMP-3

MMP-3 是对基质起广泛作用的一种蛋白酶,是具有降解细胞外基质功能的蛋白多糖酶,其作用底物主要是蛋白多糖和糖蛋白。MMP-3 一般只在炎症情况下才会高表达,它在血清中的水平高低可以作为判断 AS 病情活动程度的指标。Maksymowych 等^[29]通过对外周血中 MMP-3,软骨蛋白聚糖和 II 型胶原水平及放射学的检测,证实 MMP-3 mRNA 可以作为 AS 的一种独立的骨与软骨损伤的预测标记。易钊泉等^[30]对 MMP-3 与强直性脊柱炎临床分级关系进行研究后发现,RT-PCR 及凝胶成像分析系统半定量检测出 MMP-3 的扩增产物在 AS I、II、III 级白细胞中呈递增表达,与不同炎症时期病情程度呈正相关。MMP-3 不仅参与 AS 炎症,还是调节骨质破坏病理过程的重要因素。它对 AS 的关节破坏可能通过直接降解软骨和骨基质。软骨由大量的基质及少量的软骨细胞构成,细胞间质大部分为水分,其余由胶原、蛋白多糖和其他基质蛋白构成。胶原构成基质的骨架,其余成分填埋于胶原网络中间,MMP-3 对基质广泛降解破坏后,软骨便失去了正常功能。软骨下骨的骨基质同样也由于 MMP-3 的破坏而失去了正常的结构^[31],并随着炎症的推进,骨破坏转变为骨修复增强,软骨也被增生的骨组织代替,逐渐演变为骨性强直。

6 结 语

AS 是一种遗传因素占主导的多基因疾病,通过全基因扫描不仅证实了人类白细胞抗原(HLA)区域是与 AS 相关的重要区域,并且发现了 HLA 外还存在其他的 AS 易感区域。基础病理研究揭示了上述骨化相关的因子在 AS 病变部位的病理性表达,相互之间又存在错综复杂的联系,共同的结果就是促进了病变局部的骨基质形成,最终导致关节骨化强直。将来需要更多的分子生物学、遗传学、免疫学及其他相关学科的共同研究,如能找到调控这些蛋白病理性表达的方法,不失为一种治疗 AS 的新途径。

参考文献:

[1] Yoon YS, Johnson IA, Park JS, et al. Therapeutic myocardial angiogenesis with vascular endothelial growth factor

[J]. *Mol Cell Biochem*, 2004, 264(1/2): 63-74.

- [2] Drouart M, Saas P, Billot M, et al. High serum vascular endothelial growth factor correlates with disease activity of spondylarthropathies[J]. *Clin Exp Immunol*, 2003, 132(1): 158-162.
- [3] Seo JS, Lee SS, Kim SI, et al. Influence of VEGF gene polymorphisms on the severity of ankylosing spondylitis[J]. *Rheumatology(Oxford)*, 2005, 44(10): 1299-1302.
- [4] Visvanathan S, Wagner C, Marini JC, et al. Inflammatory biomarkers, disease activity and spinal disease measures in patients with ankylosing spondylitis after treatment with infliximab[J]. *Ann Rheum Dis*, 2008, 67(4): 511-517.
- [5] Pedersen SJ, Sørensen IJ, Lambert RG, et al. Radiographic progression is associated with resolution of systemic inflammation in patients with axial spondylarthritis treated with tumor necrosis factor α inhibitors: a study of radiographic progression, inflammation on magnetic resonance imaging, and circulating biomarkers of inflammation, angiogenesis, and cartilage and bone turnover[J]. *Arthritis Rheum*, 2011, 63(12): 3789-3800.
- [6] 初同伟,王正国,朱佩芳,等. 血管内皮生长因子在骨折愈合中的作用[J]. *中国修复重建外科杂志*, 2002, 16(2): 75-78.
- [7] 王哲,王全平,张俊华,等. 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(4): 341-343.
- [8] 钱奕铭,初同伟,李建明,等. 强直性脊柱炎活动期 VEGF 和 TNF- α 在棘间韧带组织中 mRNA 表达水平的检测[J]. *第三军医大学学报*, 2008, 30(15): 1459-1461.
- [9] 钱奕铭,初同伟. VEGF 在强直性脊柱炎活动期病理学表达临床对照试验[J]. *中国骨伤*, 2008, 21(9): 649-651.
- [10] Bouletreau PJ, Warren SM, Spector JA, et al. Hypoxia and VEGF up-regulate BMP-2 mRNA and protein expression in microvascular endothelial cells; implications for fracture healing[J]. *Plast Reconstr Surg*, 2002, 109(7): 2384-2397.
- [11] Duyndam MC, Hilhorst MC, Schlüper HM, et al. Vascular endothelial growth factor-165 overexpression stimulates angiogenesis and induces cyst formation and macrophage infiltration in human ovarian cancer xenografts[J]. *Am J Pathol*, 2002, 160(2): 537-548.
- [12] Olofsson B, Jeltsch M, Eriksson U, et al. Current biology of VEGF-B and VEGF-C[J]. *Curr Opin Biotechnol*, 1999, 10(6): 528-535.
- [13] Wozney JM. The bone morphogenetic protein family: multifunctional cellular regulators in the embryo and adult[J]. *Eur J Oral Sci*, 1998, 106 Suppl 1: 160-166.
- [14] Lories RJ, Derese I, Luyten FP. Modulation of bone morphogenetic protein signaling inhibits the onset and progression of ankylosing enthesitis[J]. *J Clin Invest*, 2005, 115(6): 1571-1579.
- [15] Lories RJ, Daans M, Derese I, et al. Noggin haploinsufficiency differentially affects tissue responses in destructive and remodeling arthritis[J]. *Arthritis Rheum*, 2006, 54(6): 1736-1746.
- [16] Sémonin O, Fontaine K, Daviaud C, et al. Identification of

- three novel mutations of the noggin gene in patients with fibrodysplasia ossificans progressiva[J]. *Am J Med Genet*, 2001, 102(4): 314-317.
- [17] 李建明, 初同伟, 周跃. BMP-2, bFGF 在强直性脊柱炎活跃期骶髂关节滑膜组织中的表达[J]. *第三军医大学学报*, 2008, 30(3): 251-253.
- [18] Chen HA, Chen CH, Lin YJ, et al. Association of bone morphogenetic proteins with spinal fusion in ankylosing spondylitis[J]. *J Rheumatol*, 2010, 37(10): 2126-2132.
- [19] Appel H, Ruiz-Heiland G, Listing J, et al. Altered skeletal expression of sclerostin and its Link to radiographic progression in ankylosing spondylitis[J]. *Arthritis Rheum*, 2009, 60(11): 3257-3262.
- [20] Howe HS, Cheung PL, Kong KO, et al. Transforming growth factor beta-1 and gene polymorphisms in oriental ankylosing spondylitis[J]. *Rheumatology(Oxford)*, 2005, 44(1): 51-54.
- [21] Toussirot E, Racadot E, Nguyen NU, et al. Absence of relation between TGF beta 1 serum levels and bone mass in ankylosing spondylitis patients[J]. *Clin Exp Rheumatol*, 2000, 18(1): 111.
- [22] 林曲, 古洁若, 魏秋静, 等. 强直性脊柱炎和未分化脊柱关节病患者血清转化生长因子 $\beta 1$ 水平及依那西普对其的影响[J]. *中华内科杂志*, 2007, 10(46): 852-853.
- [23] 王庆文, 曾惠芬, 刘郁, 等. 转化生长因子- $\beta 1$ /Smad 信号转导在强直性脊柱炎骶髂关节中表达的研究[J]. *中华风湿病学杂志*, 2010, 14(3): 151-153.
- [24] Sarkar S, Cooney LA, Fox DA. The role of T helper type 17 cells in inflammatory arthritis[J]. *Clin Exp Immunol*, 2010, 159(3): 225-237.
- [25] Nishida T, Kubota S, Kojima S, et al. Regeneration of defects in articular cartilage in rat knee joints by CCN2 (connective tissue growth factor)[J]. *J Bone Miner Res*, 2004, 19(8): 1308-1319.
- [26] Arnott JA, Nuglozeh E, Rico MC, et al. Connective tissue growth factor(CTGF/CCN2) is a downstream mediator for TGF-beta1-induced extracellular matrix production in osteoblasts[J]. *J Cell Physiol*, 2007, 210(3): 843-852.
- [27] Arnott JA, Zhang X, Sanjay A, et al. Molecular requirements for induction of CTGF expression by TGF-beta1 in primary osteoblasts[J]. *Bone*, 2008, 42(5): 871-885.
- [28] 王庆文, 杨彩红, 曾惠芬, 等. 强直性脊柱炎患者血清和骶髂关节结缔组织生长因子的表达——附 30 例检测分析[J]. *新医学*, 2011, 42(3): 170-172.
- [29] Maksymowych WP, Landewé R, Conner-Spady B, et al. Serum matrix metalloproteinase 3 is an Independent predictor of structural damage progression in patients with ankylosing spondylitis[J]. *Arthritis Rheum*, 2007, 56(6): 1846-1853.
- [30] 易钊泉, 苏卓娃, 马文松, 等. 基质金属蛋白酶 3 与强直性脊柱炎临床分级的研究[J]. *中华临床医师杂志: 电子版*, 2008, 2(10): 1166-1170.
- [31] Karsdal MA, Woodworth T, Henriksen K, et al. Biochemical markers of ongoing joint damage in rheumatoid arthritis—current and future applications, limitations and opportunities[J]. *Arthritis Res Ther*, 2011, 13(2): 215.

(收稿日期: 2012-09-08 修回日期: 2013-02-21)

· 综 述 ·

微 RNA 结合靶点区单核苷酸多态性与肿瘤的关系*

何亚舟, 刘嘉铭, 舒 驰 综述, 黄 进[△] 审校
(四川大学华西临床医学院, 四川成都 610041)

关键词: 微 RNA; 多态性, 单核苷酸; 肿瘤; 结合靶点区

doi: 10. 3969/j. issn. 1671-8348. 2013. 15. 037

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2013)15-1771-04

微 RNA(microRNA, miRNA) 是一类长度为 18~26 nt 的小分子非编码 RNA。研究表明 miRNA 与人类肿瘤的发生发展有重要关联^[1]; 其通过与靶基因 mRNA 结合在转录后水平调控肿瘤相关基因表达^[2]。靶基因 mRNA 序列中与 miRNA 相结合的区域称为 miRNA 结合靶点区(miRNA binding site)。miRNA 结合靶点区单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP) 是影响 miRNA 与靶序列结合的重要因素。近年来, 研究发现 miRNA 结合靶点区 SNP 可能介导肿瘤的发生、发展及预后^[3]; 因而探索 miRNA 结合靶点区 SNP 与肿瘤的相关性对肿瘤的个体诊疗有重大意义。本文结合最新研究进展, 对 miRNA 结合靶点区 SNP 与人类肿瘤的关系进行综述, 为研究肿瘤分子遗传机制及临床实践提供参考。

1 miRNA 结合靶点区 SNP 影响肿瘤的主要机制概述

20 世纪 90 年代, Lee 等^[4] 首先发现线虫体内 Lin-4 基因编码的小分子 RNA(2001 年命名为 microRNA) 序列与 Lin-14 基因 3' 端非翻译区(3' UTR) 内多个位点呈互补关系。而同年 Wightman 等^[5] 发现了这些位点与 Lin-14 基因的表达抑制密切相关; 实验中观察到 Lin-14 蛋白明显减少, 但 Lin-14 mRNA 水平保持不变。这提示了 miRNA 可能通过与 mRNA 结合在转录后水平调控基因表达。近年来, 有研究证实人类 miRNA 也能够与肿瘤相关基因互补结合, 从而影响肿瘤的发生、发展^[6], 而位于结合靶点区内的 SNP 是影响 miRNA 结合过程的关键因素。Chen 等^[7] 首先发现了绵羊体内 Mstn 基因结合靶点区的 SNP 使得靶基因上产生了新的 miRNA-206 结合位点,