

强直性脊柱炎异位骨化机制研究进展

聂蕊¹ 李涯松^{2*}

1. 浙江中医药大学, 浙江 杭州 310053
2. 浙江省人民医院, 浙江杭州 310014

中图分类号: R593.23 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2016)10-1350-05

摘要: 强直性脊柱炎是一种发病机制不明的慢性炎性脊柱关节病,主要侵犯骶髂关节、脊柱关节等,严重者可发生脊柱、关节的畸形和强直。临床表现为炎性腰背痛,夜间及休息后加重,活动后减轻。该病发病率男性高于女性,且男性主要表现为中轴关节改变,而女性大多首发于外周关节。目前生物制剂肿瘤坏死因子抑制剂通过控制炎症,从而改善病情发展,被认为是最前沿的药物,但其在阻断新骨形成方面尚未经循证医学证实有效。本文着眼于新骨形成角度,从基因及细胞因子层面探讨强直性脊柱炎的病因。目前相关研究发现 LRP5、ANTXR2、PTGER4、ANKH 等基因的异常表达激活骨形成信号通路,在多种细胞因子及相关蛋白(如 Noggin 蛋白、DKK、转化生长因子- β 、骨形态发生蛋白、碳酸酐酶 1 等)直接或间接作用下将骨形成信号传至靶细胞表面,进而传入细胞核,改变靶细胞正常生理代谢过程,导致过度骨形成,造成异位骨化。近年的临床影像学病例分析也提示了骨赘形成的分布特点,进而推断机械应力是促进其形成的外部因素。本文对强直性脊柱炎异位骨化方面进行了文献综述,以期能进一步加深对本病的认识,为临床治疗研究提供新的思路。

关键词: 强直性脊柱炎;异位骨化;易感基因;信号通路

Research advance on heterotopic ossification in ankylosing spondylitis

NIE Rui¹, LI Yasong² 1. Zhejiang University of Traditional Chinese Medicine 310053
2. Zhejiang Province People's Hospital 310014
Corresponding author: LI Yasong, Email: lysong2@163.com

Abstract: Ankylosing spondylitis (AS) is the most common form of spondyloarthritis and its pathogenesis is not clear. It primarily affects the sacroiliac joints and spine, and could cause stiffness and deformity in severe cases. A typical manifestation at the axial skeleton is inflammatory back pain which is typically at its worst in the early morning and disappears or subsides after limbering up. The incidence of AS in males is higher than females. In males it mainly causes axial joint changes, whereas in females mainly caused peripheral joints changes. Treatment with tumour necrosis factor blockers has been proven to be an important step forward in the treatment of this disease. It influences the progression of the disease by inhibiting inflammation, but whether it can stop heterotopic ossification has not to be affirmed by sufficient evidence. This review focuses on the advances in genetic, signaling pathways and cellular research to explore the cause of AS. Recent research found that abnormal genes like LRP5, ANTXR2, PTGER4 and ANKH can activate the signaling pathways of bone formation, then under the directly or indirectly action of cytokines and related proteins (such as Noggin, DKK, TGF- β , BMP and CA1), the signal passes the surface of the target cells to the nucleus. This process can change the normal metabolism of the target cells, resulting in heterotopic ossification. Recently clinical imaging of AS also suggests that mechanical forces may play an important role in heterotopic ossification. In this review, literatures on heterotopic ossification were summarized, in order to further understand this disease and to provide new ideas for the treatment of AS.

Key words: Ankylosing Spondylitis; Heterotopic ossification; Genes; Signaling pathway

强直性脊柱炎(ankylosing spondylitis, AS)是一种与人类白细胞抗原 B27 相关的慢性炎性脊柱关节病,确切发病机制不明,早期表现为炎性下腰痛

及晨僵,晚期典型表现为椎体方形变、韧带钙化、脊柱“竹节样”变等脊柱强直畸形,活动受限,甚则残废。其中脊柱周围韧带、关节囊等组织纤维化及异位骨化,是导致脊柱和关节强直致残的直接原因。

*通讯作者: 李涯松, Email: lysong2@163.com

研究异位骨化机制,对提高 AS 临床疗效及预防残疾具有重要临床意义。本文对 AS 异位骨化机制进行文献综述。

1 AS 的异位骨化

在人体中,骨的稳态是通过破骨细胞和成骨细胞之间的平衡来维持,一旦平衡被打破,便可能会产生各种骨病。当各种因素导致骨损伤后,再生和修复系统被激活,局限在骨组织内的再生或重塑称作正位性骨形成,而局限在软组织中的骨形成称为异位性骨形成,也称异位骨化。异位骨化是一种病理性的骨形成,常见于关节和关节外组织,分为骨连续和骨非连续,最终发展致使关节结构破坏,功能丧失。

AS 最初的损害部位是椎间盘和纤维环,韧带骨赘顺着前纵韧带形成并连接椎间的间隙,最终导致脊柱僵直。目前认为骨赘形成的起点是关节应激反应。当炎症破坏 AS 脊柱关节时,应激系统被激活,促使韧带成纤维细胞分化为成骨细胞,产生骨基质,促进羟基磷灰石结晶沉淀,诱导骨形成,构建新的骨结构。但是这种随炎症启动的异位骨化并不随着炎症的消失而终止,提示异位骨化是一个不依赖于炎症而独立发展的病理过程。在对大量非甾体消炎药及肿瘤坏死因子拮抗剂的抗炎治疗研究中,并未发现有效的循证医学证据证明抑制炎症能阻断异位骨化的进展,间接证明了炎症与异位骨化是两个独立的病理过程。

2 AS 异位骨化相关基因

研究表明除 HLA-B27 外,还有多种基因与 AS 骨化相关联,如 LRP5、ANTXR2、PTGER4、ANKH 等^[1]。目前已发现 LRP5 受体通过调节 Wnt 信号通路并促进成骨细胞分化^[2],从而影响新骨的形成。而 ANTXR2 基因又通过与 LRP5 受体相互作用影响 Wnt 信号通路^[3]。PTGER4 编码 PGE2 的 EP4 受体通过信号传递增加成骨细胞和破骨细胞活性从而影响新骨形成^[4,5]。ANKH 调节细胞外无机焦磷酸运转和合成,ANKH 一旦发生变异会使细胞外无机焦磷酸水平降低,导致异位羟基磷灰石结晶沉积,引起异位骨化。多种骨形成相关基因的异常表达,提示 AS 不只是脊柱、关节的炎性疾病,同时也是一种骨代谢异常性疾病。

3 AS 异位骨化相关细胞因子

在 AS 的异位骨化过程中,多种细胞因子直接

或者间接参与了骨形成发生及发展的调节。目前研究比较明确的有 Noggin 蛋白、DKK/转化生长因子- β 、骨形态发生蛋白、碳酸酐酶 1、血管内皮生长因子、结缔组织生长因子等。

3.1 Noggin

Noggin 是由人类 NOG 基因编码的一种二聚体糖蛋白,通过与转化生长因子超家族的配体结合,从而阻断其与相应受体结合,抑制骨代谢信号传导,减少新骨形成。目前 Noggin 蛋白的研究重点是对骨形态发生蛋白(BMP)的抑制作用,通过影响 AS 骨代谢的信号通路,使成熟状态的成骨细胞凋亡^[6],抑制骨赘形成。体外研究^[7]结果显示 Noggin 蛋白使 BMP-2 诱导的人类成骨细胞钙沉积减少,碱性磷酸酶活性显著降低,成骨细胞基因、骨桥蛋白、骨钙素等相关因子水平均降低。

3.2 DKK-1

Dickkopf-1(DKK-1)是一种分泌蛋白,是骨代谢信号通路的抑制因子,通过与低密度脂蛋白相关蛋白 5/6(LRP5/6)、Kremen1/2 形成三聚体,减少细胞膜上信号传导所需的受体数量,快速阻断信号向胞内传递,进而减少骨形成^[8]。有研究^[9]表明高水平的 DKK-1 是避免骨赘形成的保护因素。

3.3 TGF- β

转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)是一组调节细胞生长和分化的细胞因子,具有使正常成纤维细胞的表型发生转化的能力。在 AS 的异位骨化过程中,其促进成纤维细胞向成骨细胞转换,使骨细胞增殖分化、促进骨形成。同时 TGF- β 能上调韧带细胞结缔组织生长因子(CTGF)的表达,间接促进成骨分化。

3.4 BMP

骨形态发生蛋白(bone morphogenetic protein, BMP)是发现的第一个能够诱导异位骨化的蛋白,是骨形成的重要活性物质。BMP 具有诱导成骨和促进成骨细胞分化的能力,能够诱导间充质细胞和成纤维细胞转化为不可逆的骨系细胞。在 BMP 家族中,BMP-2 是活性最强且能单独诱导成骨的因子。BMP-2 在骨形成早期使未分化的间质细胞向骨形成中心聚集,使成纤维细胞、成肌细胞和骨髓的基细胞分化为骨系细胞^[10]。BMP 在骨骼以外部位诱导产生软骨和骨组织,最终形成异位骨化^[11]。

3.5 CA1

碳酸酐酶 1(carbonic anhydrase1, CA1)在生物矿化和新骨形成方面起到一定作用,相关体外试

验^[12]表明 CA1 可促进钙的沉积导致新骨形成。其机制^[13]是 CA1 可水化二氧化碳,生成碳酸氢根,碳酸氢根与钙离子结合,产生碳酸钙沉淀,从而加速骨钙化过程^[14]。有研究^[15]表明,在使用 CA 抑制剂醋甲唑胺治疗后,AS 患者的异位骨形成在影像学上有改善,表现为关节面较前清晰,异常的钙沉积减少。

3.6 VEGF

血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)有促进成骨作用。VEGF 与血管内皮细胞膜上受体结合,增加细胞内钙离子浓度,促进血管内皮细胞增生和血管生长^[16],生成的血管保证了骨化过程中骨细胞代谢和增殖,从而加速骨赘形成,因此血管增生可看作骨化启动的标志。近年研究表明,低氧可以促进 VEGF 表达,VEGF 高表达促进内皮细胞分泌 BMP, BMP 诱导未分化的间充质细胞形成软骨细胞,促进新骨形成^[17]。

3.7 CTGF

结缔组织生长因子(connective tissue growth factor, CTGF)是一种富含半胱氨酸的多肽,能促进细胞外基质合成,参与机体组织修复,在组织纤维化过程中起到重要作用。CTGF 能促进软骨增殖分化以及再生、促进软骨细胞外基质合成、修复损伤的软骨^[18]。成骨细胞中的 TGF- β 1 能诱导 CTGF 表达,CTGF 过度表达可增加 I 胶原的合成,而胶原是钙盐沉积的基础。

4 新骨形成过程

在 AS 中由于易感基因的异常表达,激活了异位骨化的信号通路,最经典的信号通路有 BMP/Smad 信号通路及 Wnt/ β -catenin 信号通路,它们是很重要的骨代谢调节通路,将骨形成信号传入靶细胞内,使间充质干细胞、成纤维细胞活化并不可逆地转化为成骨细胞,成熟的成骨细胞在适合环境及细胞因子作用下分泌骨基质,形成新骨,促进异位骨化。在 AS 异位骨化过程中,血管的生长也起到了重要作用,大量的血管翳为新骨形成提供了营养支持,为异位骨化过程中新骨生长提供了温床。

4.1 AS 骨化信号通路激活

4.1.1 BMP/Smads 信号通路激活: AS 具体病因尚不完全明确,可能与遗传、炎症、机械应力等相关。由于以上各种因素致使生长因子超家族中的 BMP 表达增强, BMP 与苏氨酸/丝氨酸蛋白激酶受体结合,激活下游的 Smad 信号分子,使 Smad-1 和 Smad-5 磷酸化,继而激活下游 Smad4,将 TGF- β 信号由胞

外传递至细胞内^[19],激活核心结合因子 α 1,刺激多种成骨相关基因的表达,诱导间充质细胞转化为成骨细胞。Noggin 蛋白是 BMP/Smads 信号通路的抑制因子,可选择性结合 BMP2、4、6、7 和生长分化因子 5 和 6,阻止这些蛋白与 BMP 受体结合,抑制 BMP 活性^[20,21]。

4.1.2 Wnt/ β -catenin 信号通路激活: Wnt/ β -catenin 信号通路中, Wnt 蛋白是一类通过自分泌或旁分泌发挥作用的分泌型糖蛋白,是重要的细胞外信号传导分子。Wnt 蛋白与其受体卷曲蛋白结合,信号通路被激活,卷曲蛋白作用于胞质内的蓬乱蛋白,使其活化并激活糖原合成酶激酶 3 β 结合蛋白,此蛋白活化后能抑制糖原合成酶激酶 3 磷酸化 β -catenin,导致 β -catenin 不能磷酸活化使泛素连接酶无法将其识别,进而 β -catenin 无法被蛋白酶复合体降解,使细胞质内的 β -catenin 含量上升而进入细胞核,并在细胞核内与相关细胞因子结合,启动靶基因转录,引起大量骨质形成。DKKs 家族是 Wnt/ β -catenin 信号通路的抑制剂,其中 DKK-1 和 DKK-4 可以抑制 Wnt 信号通路。二者中以 DKK-1 最重要,通过阻断 Wnt 信号传导,阻断过度成骨现象^[21]。

4.2 AS 靶细胞活化:间充质干细胞、成纤维细胞和成骨细胞

间充质干细胞最初发现于骨髓,在特定诱导条件下可分化成多种组织细胞,相关研究发现 AS 患者间充质干细胞的成骨分化能力明显高于正常人群。当引导新骨形成的 BMP/Smads 信号通路和 Wnt/ β -catenin 信号通路被激活,间充质干细胞便向前成骨细胞分化,经过过渡性成骨细胞、分泌型成骨细胞、骨细胞性成骨细胞,最终分化为成熟的成骨细胞。同时在 BMP 诱导下,成纤维细胞也向成骨细胞分化。成熟的成骨细胞为长方体形态,能合成分泌骨基质,是异位新骨形成的前提条件。骨基质主要成分是胶原和钙颗粒,钙盐结晶依附于胶原纤维生长,胶原纤维随钙盐生长逐步钙化,最终形成异位骨化。有研究表明 AS 患者的成纤维细胞生长速度高于正常人群并伴有过度增殖现象^[23,24],提示 AS 的骨化不仅与 AS 的成纤维细胞向成骨细胞分化有关,细胞异常增殖及凋亡受抑可能是加速 AS 骨化的重要因素。

4.3 矿化形成骨赘

在软骨细胞及成骨细胞的细胞膜上存在一种膜镶嵌微颗粒,称为基质小泡。钙离子及磷酸根离子在基质小泡中汇集,结合形成非晶体磷酸钙沉淀,之

后转变为磷酸八钙,最后变为高度难溶的羟基磷灰石(HA)。HA在磷酸水解酶与钙结合分子相互作用下开始沉积。当基质小泡外有足量的钙离子和磷酸根离子时,HA晶体会继续形成并扩大沉积范围,随后基质小泡通过膜联蛋白与Ⅱ型胶原结合形成桥梁,使得矿物晶体进入胶原纤维中继续生长^[25-26],最终导致异位骨形成。有研究^[27]发现,在AS患者滑膜中促进钙沉积的CA1高表达,提示CA1可能参与新骨形成。

4.4 血管的营养作用

血管过度形成会引起不适当的骨修复和骨形成。肥大软骨细胞分泌VEGF,并从细胞外基质中释放出来,诱导新生的血管从软骨膜中形成。新生的血管为成骨细胞、破骨细胞提供营养支持,形成原始骨化中心。有研究发现在AS患者关节内发现大量异常血管翳,说明异常的血管化在异位骨化过程中起着重要作用。

5 异位骨化常见分布

影像学研究表明,新骨形成部位并非随机事件,通过研究患者X片发现,异位骨化常见于椎骨的后外侧缘^[28]。最常出现骨赘的脊柱关节是T10-T11、T11-T12、T12-L1^[28]。这可能与椎骨机械受力相关,脊椎受力主要集中在椎体后半部分及椎弓根,这些受力部位与骨赘形成的部位基本一致,推测机械应力可能促进了骨赘的产生发展,在新骨形成过程中起促进作用。

骨赘最先出现于椎体上终板,并继续向上生长,随后与椎体下终板向下生长的骨赘相连,并逐渐形成骨桥,骨桥最早形成于椎骨后外侧缘,可能与此处骨赘优先形成有关,与此同时,椎骨间隙其他尚未完全形成的骨桥也在同步发展,并最终包绕连接关闭椎骨间隙,使脊柱失去弹性而僵直。

6 小结

AS的病理变化主要表现为炎症、骨侵蚀和异位骨化三个阶段,本文重点讨论了异位骨化的发展过程,多种基因如HLA-B27、LRP5、ANTXR2等异常表达激活骨形成信号通路(BMP/Smad信号通路和Wnt/ β -catenin信号通路),在多种细胞因子及相关蛋白的直接或间接作用下将骨形成信号传至靶细胞表面,进而传入细胞核,促进成骨表达,最终导致过度骨形成。如Noggin、DKK的减少,BMP的增加强化了异位骨化信号通路,同时BMP、TGF- β 、CA1的

增加使成纤维细胞和成骨细胞活性增强,促进羟基磷灰石结晶形成,最终形成异位骨化。迄今众多研究表明AS非单基因疾病,并且不断有新的易感基因在全基因组关联研究中被发现,而与该病相关的细胞因子及蛋白也逐渐浮出水面,如内质网氨肽酶1、粪便钙卫蛋白等,但它们在AS发病中确切机制尚未阐明。目前认为AS中出现异位骨化是关节对应激反应的一种机体保护策略,但其具体发病还有待进一步研究。本文从AS发病的机制及病理变化进行文献分析,建立从基因水平、分子层次、信号通路、靶细胞、组织器官等方面同时多靶点治疗代替单一角度治疗的思路,多方面控制炎症,阻断异位骨化,从而有望提高AS的治疗效果,防止残疾,提高AS患者活动能力及生活质量。

【参 考 文 献】

- [1] Cortes A, Maksymowych WP, Wordsworth BP, et al. Association study of genes related to bone formation and resorption and the extent of radiographic change in ankylosing spondylitis[J]. *Ann Rheum Dis*, 2015, 74: 1387-1393.
- [2] Liu JM, Zhou XY, Shan ZX, et al. The Association of LRP5 Gene Polymorphisms with Ankylosing Spondylitis in a Chinese Han Population[J]. *J Rheumatol*, 2011, 38(12): 2616-2618.
- [3] Xia Y, Chen K, Zhang MH, et al. MicroRNA-124 involves in ankylosing spondylitis by targeting ANTXR2 [J]. *Modern Rheumatol*, 2015, 25(5): 784-789.
- [4] Alander Cynthia B, Raisz Lawrence G. Effects of selective prostaglandins E2 receptor agonists on cultured calvarial murine osteoblastic cells[J]. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 2006, 81(3-4): 178-183.
- [5] Mano M, Arakawa T, Mano H, et al. Prostaglandin E2 directly inhibits bone-resorbing activity of isolated mature osteoclasts mainly through the EP4 receptor[J]. *Calcif Tissue Int*, 2000, 67(1): 85-92.
- [6] Hyzy S L, Olivares Navarrete R, Schwartz Z, et al. BMP-2 induces osteoblast apoptosis in a maturation state and noggin-dependent manner[J]. *J Cell Biochem*, 2012, 113(10): 3236-3245.
- [7] Chen C, Uludag H, Wang Z, et al. Noggin suppression decreases BMP-2-induced osteogenesis of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in vitro[J]. *J Cell Biochem*, 2012, 113(12): 3672-3680.
- [8] Pinzone JJ, Hall BM, Thudi NK, et al. The role of Dickkopf-1 in bone development, homeostasis, and disease [J]. *Blood*, 2009, 113(3): 517-525.
- [9] Heiland GR, Appel H, Poddubnyy D, et al. High level of functional dickkopf-1 predicts protection from syndesmophyte formation in patients with ankylosing spondylitis[J]. *Ann Rheum Dis*, 2012, 71(4): 572-574.

- [10] Fu J, Liu HX. BMP and pathologic bone formation of ankylosing spondylitis[J]. Chin J Immun, 2013, 29(5):553-559.
- [11] Wiley David M, Jin Suk-Won. Bone morphogenetic protein functions as a context-dependent angiogenic cue in vertebrates [J]. Semin Cell Dev Biol, 2011, 22(9):1012-1018.
- [12] Chang XT, Zheng YB, Yang QR, et al. Carbonic anhydrase I (CA1) is involved in the process of bone formation and is susceptible to ankylosing spondylitis [J]. Arthritis Research & Therapy, 2012, 14(4):R176.
- [13] Ramanan R, Kannan K, Sivanesan SD, et al. Bio-sequestration of carbon dioxide using carbonic anhydrase enzyme purified from Citrobacter freundii [J]. World J Microbiol Biotechnol, 2009, 25(6):981-987.
- [14] Chang XT, Han JX, Zhao Y, et al. Increased expression of carbonic anhydrase I in the synovium of patients with ankylosing spondylitis[J]. BMC Musculoskeletal Disorders, 2010, 11:279.
- [15] Chang XT, Yan XF, Zhang YZ. Treat Ankylosing Spondylitis with Methazolamide[J]. Int J Med Sci, 2011, 8(5):413-419.
- [16] 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.
- [17] 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.
- [18] 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.
- [19] Bonor J, Adams E L, Bragdon B, et al. Initiation of BMP2 signaling in domains on the plasma membrane [J]. J Cell Physiol, 2012, 227(7):2880-2888.
- [20] Xie ZY, Wang P, Li YX, et al. Imbalance Between Bone Morphogenetic Protein 2 and Noggin Induces Abnormal Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells in Ankylosing Spondylitis [J]. Arthritis & Rheumatology, 2016, 68(2):430-440.
- [21] Krause C, Guzman A, Knaus P. Noggin [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2011, 43:478-481.
- [22] Niehrs C. Function and biological roles of the Dickkopf family of Wnt modulators [J]. Oncogene, 2006, 25(57):7469-7481.
- [23] Wang XF, Gao GD. The Study of fibroblasts from ankylosing spondylitis secrete osteocalcin in vitro [J]. Orthop J Chin, 2002, 9(4):367-369.
- [24] Liu HX, Feng XH, Li L, et al. The Study of cell cycle and apoptosis of fibroblasts cells from Ankylosing Spondylitis [J]. Chin J Rheumatol, 2005, 9(12):758-760.
- [25] Ellis E, Golub. Role of matrix vesicles in biomineralization [J]. Biochim Biophys Acta, 2009, 1790(12):1592-1598.
- [26] Orimo H. The mechanism of mineralization and the role of alkaline phosphatase in health and disease [J]. Nippon Ika Daigaku Zasshi, 2010, 77(1):4-12.
- [27] Zhang H, Jia TH, Li XG, et al. An increased expression of carbonic anhydrase I in the synovium of patients with ankylosing spondylitis [J]. Orthop J Chin, 2011, 19(8):667-670.
- [28] Sovira Tan, Abhijit Dasgupta, Yao JH, et al. Spatial distribution of syndesmophytes along the vertebral rim in ankylosing spondylitis: preferential involvement of the posterolateral rim [J]. Ann Rheum Dis, 2016, (1):1-7.

(收稿日期:2016-03-22,修回日期:2016-04-22)