

# 骨形态发生蛋白-2 在先天性胫骨假关节中的应用进展



邓华军<sup>1</sup> 综述 梅海波<sup>2</sup> 审校

先天性胫骨假关节 (congenital pseudarthrosis of the tibia, CPT) 是发生在儿童的一种罕见疾病,常伴随 I 型神经纤维瘤病 (Neurofibromatosis type 1, NF-1)。由于胫骨发育畸形导致胫骨成角、髓腔狭窄或囊肿,最终形成不愈合的假关节<sup>[1]</sup>。自 Paget 于 1891 年报道该病以来,其病因机制尚未阐明<sup>[1-3]</sup>。治疗主要以手术为主,尽管术式不断改进,但目前仍没有一种理想的术式,术后肢体短缩、成角畸形、再骨折不愈合等风险并未降低<sup>[4]</sup>。近年来骨形态发生蛋白 (Bone Morphogenetic Proteins, BMPs) 在骨缺损及骨不连中的应用成为热点, BMPs 属于转化生长因子  $\beta$  (Transforming Growth Factor beta, TGF- $\beta$ ) 超家族中的一种蛋白调节因子,对于骨及软骨的形成与修复起着关键性作用<sup>[5]</sup>。美国食品药品监督管理局 (Food and Drug Administration, FDA) 目前已批准人重组骨形态发生蛋白-7 (Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-7, rhBMP-7) 以及人重组骨形态发生蛋白-2 (Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2, rhBMP-2) 用于成人脊柱融合手术、成人胫骨开放性骨缺损及胫骨骨不连等一些特定骨科疾病<sup>[6,7]</sup>。近年来 BMP-2 在儿童先天性胫骨假关节治疗中的应用取得了一定疗效,本文就 BMP-2 在儿童先天性胫骨假关节中的应用综述如下。

## 一、BMP-2 概述

1965 年, Urist<sup>[8]</sup> 于实验时将牛脱钙骨基质 (decalcified bone matrix, DBM) 植入鼠肌肉内,发现巨噬细胞、炎性结缔组织及一些游走细胞能接受刺激诱导异位骨形成,从而提出了骨诱导理论 (Osteoinductive theory)。他认为 DBM 中存在着非特异性物质,能诱导未分化间充质细胞分化为骨祖母细胞,在异位或正常部位促进骨组织或软骨组织形成。1971

年, Urist<sup>[9]</sup> 将这类诱导成骨物质定义为骨形态发生蛋白 (BMPs)。至 20 世纪 80 年代, Wang 等<sup>[10]</sup> 首次从牛骨基质中提取 BMP-3, 随后 Wozney 等<sup>[11]</sup> 克隆出人 BMP-2、BMP-4。近 30 年来,人们不仅从多种动物骨组织中分离和纯化出天然 BMP-1、BMP-2、BMP-3 和 BMP-4, 而且还能通过基因重组技术使 BMPs 在中国仓鼠的卵母细胞和大肠杆菌中表达<sup>[10,12]</sup>。目前已有文献报道了 20 多种 BMPs, 不仅在骨基质及骨膜中可表达诱导骨的形成与重建, 而且可在人体多种组织中表达, 对人体多种细胞的发育和功能的维持有重要作用<sup>[5]</sup>。BMP-2 是目前研究最为广泛、诱导成骨活性最强的 BMPs 之一, 是骨及软骨组织形成和骨折愈合的启动因子, 还是其他 BMPs 在骨细胞中表达的诱导因子<sup>[5]</sup>。

## 二、BMP-2 的作用机制

BMP-2 是通过自分泌和旁分泌的一种生长因子, 在细胞及细胞间质之间传导信息, 对于成骨细胞的分化及骨组织形成有非常重要的作用<sup>[13]</sup>。早在 1996 年, Hofbauer 等<sup>[14]</sup> 提出, BMPs 首先与细胞膜上的丝氨酸/苏氨酸激酶受体结合, 形成 I、II 型丝氨酸/苏氨酸激酶受体的二聚体, 然后将信息转入细胞内, 经第二信使 MAD (Mater Against Dpp) 磷酸化, 将信息导入细胞核内, 使 BMPs 活性相关的基因表达, 从而产生相应的生物学效应。据 Guo 等<sup>[15]</sup> 研究表明 I 型受体包括激活素受体 IA 型 (activin receptor type-IA, ACTR-IA)、BMP 受体 IA 型 (BMP receptor type-IA, BMPR-IA)、BMP 受体 IB 型 (BMP receptor type-IB, BMPR-IB); II 型受体包括 BMP 受体 II 型 (BMP receptor type-II, BMPR-II)、激活受体 II A 型 (activin receptor type II A, ACTR-II A)、激活素受体 II B 型 (activin receptor type II B, ACTR-II B)。目前研究发现, BMPs 可通过结合细胞膜上的不同受体复合物启动 2 条重要的细胞内信号传导途径引导骨组织形成, 即 Smad 蛋白依赖途径与非 Smad 蛋白依赖途径<sup>[16]</sup>。BMPs 受体激活后磷酸化 Smad1/5/8, Smad1/5/8 磷酸化形成复合物后结合

Smad4 进入细胞核内调节特定靶基因转录,产生成骨细胞特异性转录因子(osterix),从而促进骨形成;非 Smad 蛋白依赖途径包括有丝分裂原激活蛋白激酶(MAPK)/细胞外信号调节激酶(ERK), MAPK/p38, MAPK/JNK(氨基末端激酶)等途径<sup>[17]</sup>。现在研究表明,Ras/ MAPK 信号传导途径过度激活可导致破骨祖细胞、成骨祖细胞及骨髓间充质干细胞异常增殖及分化,是导致 NF1 形成假关节的关键<sup>[18]</sup>。Zhang 等<sup>[13]</sup>通过小鼠模型体外实验证明  $\beta$ -链蛋白( $\beta$ -catenin)能通过经典 Wnt 信号传导途径直接通过反式作用激活成骨细胞内 BMP-2 基因的启动子,促进骨组织形成,BMP-2 与 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号传导途径整合在成骨细胞分化过程中,从而维持骨骼代谢的稳态。Mizrahi 等<sup>[19]</sup>通过细胞核转染技术在体外及体内证明 rhBMP-2 能促使猪脂肪干细胞向骨组织分化。Müller 等<sup>[20]</sup>通过基因转染技术证明 rhBMP-2 能诱导以生物材料为载体的骨髓间充质干细胞在小鼠股骨缺损处形成新生骨。

正常骨膜由浅表的纤维层、中间的血管未分化区和深面的生发层构成。Yang 等<sup>[21]</sup>研究发现正常骨膜、骨细胞及骨基质有 BMP 表达。崔赓等<sup>[22]</sup>研究表明 CPT 的骨膜已失去正常结构,生发层消失,纤维层类似肿瘤样过度增生,无 BMPs 表达。Mi 等<sup>[23]</sup>以 BMP-2 基因敲除的小鼠胫骨骨折为模型证明 BMP-2 基因的缺失对于可导致骨折早期软骨瘤的延迟生成及较低的生物力学性能。Shah 等<sup>[24]</sup>研究发现 CPT 周围的纤维错构瘤样组织替代正常骨膜呈侵袭性生长,成骨能力低下,然而破骨能力强,可见少量纤维软骨及透明软骨生成。Rhodes 等<sup>[25]</sup>通过对 NF1 模型小鼠研究证明 NF1 缺陷的成骨细胞和破骨细胞对 TGF- $\beta$ 1 高反应性,增强了破骨细胞的骨吸收活性而抑制成骨细胞的分化,导致骨缺损,TGF- $\beta$ 1 受体抑制剂能缓解骨缺损及阻止胫骨骨折后骨不连。De 等<sup>[26]</sup>根据近年来对于神经纤维瘤蛋白的生物学行为研究,提出导致 I 型神经纤维瘤病的胫骨假关节主要根源是骨髓间充质细胞发育缺陷及造血细胞对 TGF- $\beta$ 1 高反应性所致,此外,通过 NF1 缺陷的小鼠模型体外基因表达实验证明骨祖细胞内 ERK 慢性激活会导致 BMP-2 表达下降。

### 三、BMP-2 的安全性及并发症

BMP-2 目前已被 FDA 批准应用于成人脊柱融合手术及急性胫骨开放性骨缺损,而 BMP-2 对于不成熟骨骼的应用其安全性及并发症目前尚不明确,FDA 认为在儿童骨骼疾病中不推荐使用应用

BMP-2<sup>[7]</sup>。Oetgen 等<sup>[27]</sup>报道在 81 例儿童骨不连及脊柱融合手术中应用 rhBMP-2,有 16 例出现并发症,均无全身毒性表现,9 例出现手术局部问题,3 例出现深组织感染,1 例出现术后骨筋膜室综合征,2 例出现神经系统并发症(1 例为脊髓病变,1 例硬脊膜纤维化继发肌无力),1 例促使了颅内神经胶质瘤生长。Rocque 等<sup>[7]</sup>回顾性研究 4 658 例儿童脊柱融合手术,大部分患者年龄为 10 ~ 19 岁,其中 1 752 例应用 BMP-2,研究结果表明是否应用 BMP-2 术后并发症并无差异,年龄对于应用 BMP-2 的并发症并无影响。Woo 等<sup>[28]</sup>报道在 62 例非脊柱融合手术中应用 rhBMP-2 的并发症,包括胫骨平台骨折、先天性胫骨假关节、肱骨重建手术,主要并发症包括手术部位感染、局部炎症反应、假关节形成、异位成骨。

### 四、BMP-2 在儿童 CPT 中的应用

2006 年, Lee 等<sup>[29]</sup>报道使用骨移植、髓内针固定及联合 BMP-7 治疗 5 例 CPT 患儿,12 个月后只有 1 例获得骨性愈合。2010 年, Carreira 等<sup>[6]</sup>第 1 次使用 rhBMP-2 以可吸收胶原蛋白海绵为载体包裹骨折断端联合手术切除假关节组织、Williams 髓内针、自体髂骨植骨治疗 7 例 CPT,治疗时已形成明显的假关节畸形,手术时平均年龄为 6.8 岁(1.9 ~ 11.7 岁),4 例合并 I 型神经纤维瘤病,2 例在治疗前已有多次联合手术(假关节切除、髓内针固定、假关节处植骨)。其结果与既往术式相比:1. 缩短了早期愈合时间,5 例术后获得骨性愈合(3.7 ~ 8.1 个月,平均 6.4 个月),减少了再骨折的发生率,其中 4 例保持骨性连接平均时间为 5.4 年(3.9 ~ 7.3 年);平均随访时间 6 年(4 ~ 9 年),4 例获得无支具保护下活动无限制,无痛感。随访 4 年表明,rhBMP-2 在儿童假关节手术中运用不影响骨骼的正常生长,无论有无合并神经纤维瘤病,均未发现肿瘤发生,重复使用无过敏反应。2011 年, Spiro 等<sup>[30]</sup>使用 rhBMP-2 联合髓内针及 Ilizarov 技术治疗 4 例 CPT,术后平均愈合时间 3.5 个月(3.2 ~ 4 个月),再骨折的发生率为 40%,结果表明 rhBMP-2 联合手术能缩短假关节的早期愈合时间。同年, Schindeler 等<sup>[31]</sup>利用 NF-1 缺陷的小鼠胫骨骨折模型采用随机对照试验证明 rhBMP-2 联合二磷酸盐促进合成代谢治疗胫骨假关节(实验组),与单纯使用 rhBMP-2 治疗(对照组),3 周后实验组获得 93% 的愈合率,对照组愈合率为 25%,两组之间差异无统计学意义,结果表明临床运用 rhBMP-2 联合二磷酸盐产生合成代谢刺激也许能改善假关节术后的骨质流失。

2012 年, Dohin 等<sup>[32]</sup>采用胫骨假关节周围骨质及骨膜大段切除, 缺损处用骨水泥填充诱导膜状物生成后取出骨水泥, 填充自体骨及浸有 rhBMP-2 的胶原蛋白海绵, 即 Masquelet 技术联合 rhBMP-2 治疗 3 例 CPT, 平均手术年龄为 3.3 岁, 平均术后假关节愈合时间为 4.5 个月, 平均随访 2 年, 1 例截肢, 2 例获得了较好的骨性愈合, 缩短了早期愈合时间, 然而愈合率较以往文献报道低, 因病例样本较少, rhBMP-2 在 Masquelet 技术治疗假关节中的确切疗效, 需要进一步研究。2013 年, Gouron 等<sup>[33]</sup>报道单独采用 Masquelet 技术治疗 14 例大段骨缺损, 其中包括 3 例 CPT, 平均切除假关节周围骨质及骨膜长度为 4.8 cm (3.5 ~ 7.3 cm), 平均手术年龄为 3.3 岁, 平均术后假关节愈合时间为 8.3 个月, 平均随访 28.3 个月, 均无再骨折发生。Ishack 等<sup>[34]</sup>以小鼠颅骨缺损为模型, 利用 3D 打印技术以羟基磷灰石/ $\beta$ -磷酸三钙为原料打印出骨缺损的支架, 支架表面含有 BMP-2 涂层, 连续观察 8 周, 影像学和组织学检查结果表明该技术能明显促进骨组织再生, 修复骨缺损, 为创伤、感染等引起的骨缺损修复提供了新的思路。Nicolaou 等<sup>[35]</sup>报道采用髓内针固定, Ilizarov 外固定器用或不用自体髂骨包裹式植骨联合 BMP-2 治疗 18 例 CPT, 其中对于 Ilizarov 技术术后 6 周假关节断端无愈合的迹象, 采用自体髂骨包裹式植骨联合 BMP-2 治疗; 11 例获得长期随访 (8 例达到骨骼成熟, 3 例随访超过 5 年), 10 例获得骨性愈合, 8 例骨骼成熟的患儿中有 7 例仍保持骨性连接 (愈合率达 88%), 而欧洲小儿骨科学会多中心研究表明单独采用 Ilizarov 技术愈合率仅 75%<sup>[35]</sup>。2014 年, El-hoss 等<sup>[36]</sup>以导致 NF-1 的信号传导机制为切入点, NF-1 蛋白的缺失会引起 Ras/MEK/MAPK 信号通路过度激活导致骨组织形成过程与破骨过程失去平衡, 最终导致不愈合的假关节, 以 NF-1 蛋白缺陷的小鼠胫骨假关节为模型, 实验组在假关节局部运用 rhBMP-2 与 MEK 抑制剂, 对照组分别为: 未接受治疗, 单独使用 MEK 抑制剂, 单独使用 rhBMP-2, 结果表明实验组假关节愈合率较对照组高, 差异有统计学意义。Conway 等<sup>[37]</sup>报道 BMP-2 治疗 112 例长骨骨不连, 愈合率达 93%, 愈合时间为 19 周, 完全负重时间为 15 周, 与 BMP-7 比较, BMP-2 具有愈合率高, 愈合时间快, 负重时间早等优点。2015 年, De 等<sup>[26]</sup>通过以 NF-1 基因缺陷的小鼠假关节为模型进行研究, 结果表明在假关节断端局部使用 BMP-2 联合 ERK 抑制剂才能促使骨祖

细胞分化, 假关节愈合及增加骨痂强度, 这为假关节合并 NF-1 治疗提供了一个新的视角。

综上所述, rhBMP-2 在儿童先天性胫骨假关节中应用对于提高愈合率作用并不明显, 对于缩短假关节早期愈合时间, 获得较长的骨性连接时间, 改善 CPT 患儿生活质量, 仍需大宗病例的随机对照研究, rhBMP-2 在 CPT 中应用的安全性及并发症因缺乏多中心大宗病例研究目前尚不明确, 如需应用应告知家长有可能出现相关并发症。rhBMP-2 联合 MEK 抑制剂及 Masquelet 技术、生物新材料为治愈儿童先天性胫骨假关节提供了新的方向。

### 参考文献

- 1 梅海波, 汤用波, 赫荣国. 联合手术治疗先天性胫骨假关节的中期结果评价[J]. 中华小儿外科杂志, 2015, 36 (7): 489-495.
- 2 Boyd HB. Pathology and natural history of congenital pseudarthrosis of the tibia[J]. Clinical orthopaedics and related research, 1982; 5-13.
- 3 Pannier S. Congenital pseudarthrosis of the tibia[J]. Orthopaedics and Traumatology: Surgery and Research, 2011, 97 (7): 750-761.
- 4 Khan T, Joseph B. Controversies in the management of congenital pseudarthrosis of the tibia and fibula[J]. Bone and Joint Journal, 2013, 95 B(8): 1027-1034.
- 5 Carreira AC, Lojudice FH, Halcsik E. et al. Bone Morphogenetic Proteins: Facts, Challenges, and Future Perspectives [J]. Journal of Dental Research, 2014, 93(4): 335-345.
- 6 RICHARDS B S, OETGEN M E, JOHNSTON C E. The use of rhBMP-2 for the treatment of congenital pseudarthrosis of the tibia: a case series[J]. The Journal of Bone and Joint Surgery. American Volume, 2010, 92(1): 177-185.
- 7 Rocque BG, Kelly MP, Millet JH. et al. Bone morphogenetic protein - associated complications in pediatric spinal fusion in the early postoperative period: an analysis of 4658 patients and review of the literature[J]. Journal of Neurosurgery. Pediatrics, 2014, 14(6): 635-643.
- 8 Urist MR. Bone: formation by autoinduction[J]. Science (New York, N. Y. ), 1965, 150(3698): 893-899.
- 9 Urist MR. The substratum for bone morphogenesis[J]. The Symposium / The Society for Developmental Biology. Society for Developmental Biology. Symposium, 1970, 29: 125-163.
- 10 Wang EA, Rosen V, Cordes P. et al. Purification and characterization of other distinct bone - inducing factors. [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1988, 85(24): 9484-9488.

- 11 Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ. et al. Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities [J]. Science (New York, N. Y. ), 1988, 242(4885): 1528–1534.
- 12 Brand RA, Marshall R, Urist, 1914–2001 [J]. Clinical Orthopaedics and Related Research, 2009, 467(12): 3049–3050.
- 13 Zhang R, Oyajobi BO, Harris SE. et al. Wnt/ $\beta$ -catenin signaling activates bone morphogenetic protein 2 expression in osteoblasts [J]. Bone, 2013, 52(1): 145–156.
- 14 Hofbauer LC, Heufelder AE. Taking the message to the nucleus: MAD protein as a mediator of bone morphogenetic protein signaling [J]. European Journal of Endocrinology/ European Federation of Endocrine Societies, 1996, 135(6): 654–655.
- 15 Guo J, Wu G. . The signaling and functions of heterodimeric bone morphogenetic proteins [J]. Cytokine & Growth Factor Reviews, 2012, 23(1–2): 61–67.
- 16 Derynck R, Zhang YE. Smad-dependent and Smad – independent pathways in TGF-beta family signalling [J]. Nature, 2003, 425(6958): 577–584.
- 17 Zhang X, Guo J, Zhou Y. et al. The Roles of Bone Morphogenetic Proteins and Their Signaling in the Osteogenesis of Adipose-Derived Stem Cells [J]. Tissue Engineering. Part B, Reviews, 2014, 20(1): 84–92.
- 18 Sharma R, Wu X, Rhodes SD. et al. Hyperactive Ras/ MAPK signaling is critical for tibial nonunion fracture in neurofibromin-deficient mice [J]. Human Molecular Genetics, 2013, 22(23): 4818–4828.
- 19 Mizrahi O, Sheyn D, Tawackoli W. et al. BMP–6 is more efficient in bone formation than BMP – 2 when overexpressed in mesenchymal stem cells [J]. Gene Therapy, 2013, 20(4): 370–377.
- 20 Muller CW, Hildebrandt K, Gerich T. et al. BMP–2–transduced human bone marrow stem cells enhance neo – bone formation in a rat critical–sized femur defect [J]. Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine, 2015.
- 21 Yang LJ, Jin Y. Immunohistochemical observations on bone morphogenetic protein in normal and abnormal conditions [J]. Clinical Orthopaedics and Related Research, 1990 (257): 249–256.
- 22 崔赓, 雷伟, 李洁, 等. 先天性胫骨假关节的组织病理学研究 [J]. 中华医学杂志, 2002, 82(7): 487–491.
- 23 Mi M, Jin H, Wang B. et al. Chondrocyte BMP2 signaling plays an essential role in bone fracture healing [J]. Gene, 2013, 512(2): 211–218.
- 24 Shan H, Rousset M, Canavese F. Congenital pseudarthrosis of the tibia: Management and complications [J]. Indian Journal of Orthopaedics, 2012, 46(6): 616–626.
- 25 Rhodes SD, Wu X, He Y. et al. Hyperactive transforming growth factor –  $\beta$ 1 signaling potentiates skeletal defects in a neurofibromatosis type 1 mouse model [J]. Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research, 2013, 28(12): 2476–2489.
- 26 De La Croix Ndong J, Stevens DM, Vignaux G. , et al. Combined MEK inhibition and BMP2 treatment promotes osteoblast differentiation and bone healing in Nf1Ox<sup>-/-</sup> mice [J]. Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research, 2015, 30(1): 55–63.
- 27 Oetgen ME, Richards BS. Complications associated with the use of bone morphogenetic protein in pediatric patients [J]. Journal of Pediatric Orthopedics, 2010, 30(2): 192–198.
- 28 Woo EJ. Adverse events after recombinant human BMP2 in nonspinal orthopaedic procedures [J]. Clinical Orthopaedics and Related Research, 2013, 471(5): 1707–1711.
- 29 Lee FY–I, Sinicropi SM, Lee FS. et al. Treatment of congenital pseudarthrosis of the tibia with recombinant human bone morphogenetic protein – 7 (rhBMP – 7). A report of five cases [J]. The Journal of Bone and Joint Surgery. American Volume, 2006, 88(3): 627–633.
- 30 Spiro AS, Babin K, Lipovac S. et al. Combined treatment of congenital pseudarthrosis of the tibia, including recombinant human bone morphogenetic protein – 2: a case series [J]. The Journal of Bone and Joint Surgery. British Volume, 2011, 93(5): 695–699.
- 31 Schindeler A, Birke O, YU NYC. et al. Distal tibial fracture repair in a neurofibromatosis type 1–deficient mouse treated with recombinant bone morphogenetic protein and a bisphosphonate [J]. The Journal of Bone and Joint Surgery. British Volume, 2011, 93(8): 1134–1139.
- 32 Dohin B, Kohler R. Masquelet’s procedure and bone morphogenetic protein in congenital pseudarthrosis of the tibia in children: a case series and meta-analysis [J]. Journal of Children’s Orthopaedics, 2012, 6(4): 297–306.
- 33 Gouyon R, Deroussen F, Plancq M–C. et al. Bone defect reconstruction in children using the induced membrane technique: a series of 14 cases [J]. Orthopaedics & traumatology, surgery & research: OTSR, 2013, 99(7): 837–843.
- 34 Ishack S, Mediero A, Wilder T. et al. Bone regeneration in critical bone defects using three-dimensionally printed  $\beta$ -tricalcium phosphate/hydroxyapatite scaffolds is enhanced by coating scaffolds with either dipyrindamole or BMP–2 [J]. Journal of Biomedical Materials Research. Part B, Applied Biomaterials, 2015.