

• 临床研究 •

BMP-4 基因单核苷酸多态性与腰椎后纵韧带骨化症关联性实验研究*

赵伟光¹, 刘振武¹, 刘 利¹, 谢延平¹, 林 欣^{2△}

(1. 河北省邯郸市中心医院骨一科 056001; 2. 首都医科大学附属北京天坛医院骨科 100050)

摘要:目的 探讨骨形态发生蛋白-4(BMP-4)与腰椎后纵韧带骨化症(OPLL)的遗传关联性。方法 OPLL 病例组和健康对照组各 30 例,利用聚合酶链反应(PCR)和直接测序法分析 BMP-4 上 4 个单核苷酸多态性位点 6 007C>T(rs17563)、-5 826G>A(rs1957860)、3 564C>T(rs2855532)和 IVS-160C>T(rs2071047)基因型及等位基因型的分布。结果 两组间位点 rs17563, rs2855532 基因型与等位基因型差异有统计学意义($P<0.05$)。余两位点比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。结论 BMP-4 上的 2 个单核苷酸多态性位点 rs17563,rs2855532 等位基因型突变与 OPLL 的发生有关。

关键词:后纵韧带骨化症,腰椎;骨形态发生蛋白-4;单核苷酸多态性;聚合酶链反应;病例对照研究

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.17.005

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2012)17-1684-03

Experimental study on associativity between bone morphogenetic protein-4 gene polymorphism with ossification of posterior longitudinal ligament of lumbar spine*

Zhao Weiguang¹, Liu Zhenwu¹, Liu Li¹, Xie Yanping¹, Lin Xin^{2△}

(1. First Department of Orthopedics, Handan Central Hospital, Handan, Hebei 056001, China;

2. Department of Orthopedics, Affiliated Beijing Tiantan Hospital, Beijing 100050, China)

Abstract: Objective To explore the genetic associativity of the bone morphogenetic protein-4 gene (BMP-4) with the ossification of posterior longitudinal ligament (OPLL) of the lumbar spine. **Methods** The venous blood samples of 30 OPLL patients and 30 non-OPLL controls were collected. All experimental participants were matched in age-sex composition. Amplifying the DNA sequences including four single nucleotide polymorphisms (SNPs) of the bone morphogenetic protein-4 gene with polymerase chain reaction (PCR). The statistical results were analyzed by SPSS 16.0 Version. **Results** There was a significant association between the rs17563, rs2855532 polymorphism and the occurrence of OPLL in the lumbar spine ($P<0.05$). However, no significant association was found between the other two SNPs (rs1957860, rs2071047) and lumbar OPLL patients. **Conclusion** The two SNPs (rs17563, rs2855532) can increase the incidence of OPLL of the lumbar spine.

Key words: OPLL, lumbar; BMP-4; SNPs; PCR; case-control study

后纵韧带骨化症(OPLL)是指因后纵韧带发生骨化,从而压迫相应节段的脊髓和(或)神经根,产生肢体的感觉和运动障碍及内脏植物神经功能紊乱的一种疾病。由于疾病的迟发特性,保守治疗不能阻止本病的发展,因此,了解 OPLL 的病因非常必要。据统计,脊柱 OPLL 70%发生于颈椎,胸椎仅占 15%,腰椎较少。目前大量研究证实该病与基因多态性存在明显相关性^[1],笔者已研究了骨形态发生蛋白-4(BMP-4)基因上 4 个单核苷酸多态性位点 6 007C>T(rs17563)、-5 826G>A(rs1957860)、3 564C>T(rs2855532)和 IVS-160C>T(rs2071047)与颈椎 OPLL 的关联性,证实了其中 2 个位点与颈椎 OPLL 的发生和发展存在相关性^[2]。但在腰椎 OPLL 患者中是否也存在相似关联性,目前国内、外尚无有关报道,本研究首次对 BMP-4 基因单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)、与腰椎 OPLL 关系进行了研究。

1 资料与方法

1.1 一般资料 所有入选者皆拍摄腰椎 X 线平片、CT 及采集完整病史,由骨科专家组根据 TsuyamaN 的诊断标准^[3],将样本分为腰椎 OPLL 病例组 and 对照组。排除与 OPLL 有关的骨代谢疾病。病例组:男 21 例,女 9 例;年龄 47~65 岁,平均 56.7 岁;对照组:男 19 例,女 11 例;年龄 51~70 岁,平均 60.3

岁。收集入选者周围静脉血 4 mL, EDTA-K₂ 抗凝。样本进行随机混合编号。

1.2 主要仪器及试剂 Wizard Genomic DNA Purification Kit 购自美国 Promega 公司, dNTP 及耐热性 DNA 酶购自日本 TaKaRa 公司,引物由北京三博远志生物有限责任公司合成。ABI 3730XL DNA 测序仪、PCR 仪 MYCYCLER(美国 BIO-RaD 公司)、SIGMA 低温高速离心机、凝胶成像系统 Biospectrum。

1.3 方法

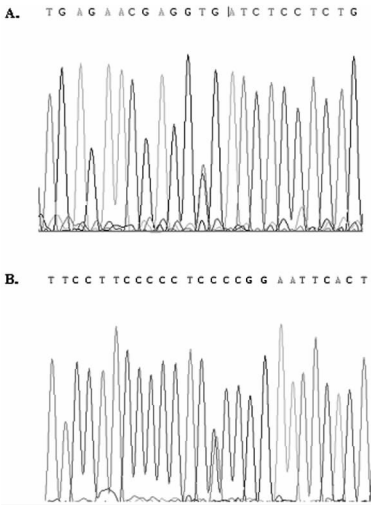
1.3.1 DNA 的提取 利用 DNA 提取试剂盒进行人血白细胞基因组 DNA 提取。提取的 DNA 样品经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳测定, A_{260}/A_{280} 紫外定量,确定每个样本已提取 DNA 成功。

1.3.2 聚合酶链反应(PCR)及产物序列测定 利用 PCR 仪, 50 μ L 反应体系对目的 DNA 片段进行体外扩增: 10 $\times$ LA PCR 缓冲液 5 μ L + Mg²⁺ (25 mmol/L) 5 μ L + dNTPs 混合液 (25 mmol/L) 8 μ L + 上游引物 (10 μ mol/L) 1 μ L + 下游引物 (10 μ mol/L) 1 μ L + Tap 酶 (5 U/ μ L) 0.5 μ L + 模板 2.5 μ L, 最后加灭菌蒸馏水至 50 μ L。反应条件及引物见表 1, 相关测序图见图 1。对产物纯化后用直接测序法测定序列。

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(30872599);北京市自然科学基金资助项目(7092028)。 △ 通讯作者, Tel: (010)67218088; E-mail: linxin@bjtth.com。

表 1 SNP 位点及其引物、扩增片段的长度

SNP 位点(bp)	引物序列	退火温度(℃)	扩增长度(bp)
rs17563	sense primer 5'-CAT TCA TTG CCC AAC CCT-3'	62	421
	antisense primer 5'-AGT TTG GCT GCT TCT CCC-3'		
rs2071047	sense primer 5'-GGA AGA AGA GTT CGG GTT A-3'	55	302
	antisense primer 5'-TTC AGA TCG GAT TAC AAG G-3'		
rs2855532	sense primer 5'-ATT CCG TAG TGC CAT CCC-3'	62	396
	antisense primer 5'-GCC CTC AAG GTA CAA CCC-3'		
rs1957860	sense primer 5'-GCCACAGCACCTGAGAAA-3'	55	313
	antisense primer 5'-GATGACCTTGCCATTTCG-3'		



A:rs17563 基因型为 TC 的测序结果;B:rs2855532 基因型为 CT 测序结果。

图 1 1 位腰椎 OPLL 患者测序图

1.4 统计学处理 采用 SPSS16.0 软件对数据进行统计学处理。用 Chi-square test 检验方法对病例组与对照组 4 个位点基因型、等位基因型分布进行统计学分析。检验水准 $\alpha=0.05$,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

位点 6 007C>T(rs17563)、3564C>T(rs2855532)基因型、等位基因型在两组间的分布差异有统计学意义($P<0.05$),见表 2、3。而其余 2 个位点差异无统计学意义($P>0.05$),见表 4。

表 2 两组间位点 rs17563、rs2855532 基因型的分布比较

SNP 位点	6 007C>T(rs17563)			3 564C>T(rs2855532)		
基因型	TT	TC	CC	CC	CT	TT
OPLL 组($n=30$)	12	13	5	5	17	8
对照组($n=30$)	6	9	15	—	—	—
P	<0.05			<0.05		

—:表示此项目无数据。

表 3 两组间位点 rs17563、rs2855532 等位基因的分布比较

SNP 位点	6 007C>T(rs17563)		3 564C>T(rs2855532)	
等位基因	T	C	C	T
OPLL 组($n=60$)	37	23	27	33
对照组($n=60$)	21	39	38	22
P	<0.05		<0.05	

表 4 两组间位点 rs2071047、rs1957860 基因型的分布比较

SNP 位点	IVS-160C>T(rs2071047)			-5 826G>A(rs1957860)		
基因型	TT	CT	CC	GG	GA	AA
OPLL 组($n=30$)	3	18	9	8	15	7
对照组($n=30$)	4	14	12	7	11	12
P	0.585			0.368		

3 讨 论

OPLL 特征是脊柱椎体对应后纵韧带发生异位骨化,骨化的韧带压迫相应节段脊髓和(或)神经根出现不同程度的临床症状。OPLL 多发于颈椎,胸、腰椎较少。根据骨化灶的形态和范围可分为 4 型:连续型、节段型、混合型和局灶型。Takashid 等^[4]从病理学方面说明了骨化的后纵韧带导致脊髓损伤的主要过程:骨化组织对相应节段脊髓首先产生由前向后的直接压迫,导致脊髓灰质、白质的压缩变形,进而引起运动、感觉神经细胞损伤、坏死,侧索和后索出现脱髓鞘改变,从而最终可能出现脊髓坏死或软化。由于这种疾病的迟发特性,保守治疗不能阻止本病的发展,因此了解 OPLL 的病因是非常必要的。目前,有关颈椎 OPLL 发病机制还不十分清楚,大多数学者认为其发病与遗传、脊柱退行性改变、长期反复应力失衡、外伤、先天发育异常等因素有关。

已有实验证明 OPLL 具有强大的遗传背景,Taizo 等^[5]进行的一项大样本病例对照研究(711 名 OPLL 患者和 896 名对照组)发现 TGF- β 3 基因的单核苷酸多态性与 OPLL 的发生具有显著相关性($P=0.00040$)。Tanno 等^[6]通过对取自 10 例 OPLL 患者与 10 例对照组后纵韧带细胞进行的体外单轴循环拉力诱导实验证实 OPLL 组后纵韧带细胞中的 ALP、BMP-4、BMP-2、骨桥蛋白表达均高于对照组,这说明局部应力对该病的发生也有促进作用。赵刚等^[7]对 15 例腰椎 OPLL 患者研究,认为腰椎 OPLL 发病机制为椎间盘变性后后纵韧带所受应力增大,局部增生、化生而至骨化,所以腰椎 OPLL 多为局灶型和节段型。

基因连锁分析研究表明调节骨形成、骨量及其微观结构的基因定位于染色体 14q12-23^[8-9],其中 BMP-4 基因位于 14q22-23,其除了具有强大的诱导成骨能力外还通过 BMP-Smads 及 MAPK 的级联激活途径等广泛参与包括心血管、胃肠、呼吸、泌尿、生殖及神经系统的胚胎发育、生长和分化^[10-12]。Sato 等^[13]进行的免疫组织化学研究表明,BMP-4、BMP-2 在后纵韧带骨化灶表面肥大化生的软骨细胞内高表达。笔者已研究了 BMP-4 基因上 4 个单核苷酸多态性位点 6 007C>T

(rs17563), -5 826G>A(rs1957860), 3 564C>T(rs2855532) 和 IVS-160C>T(rs2071047) 与颈椎 OPPL 的关联性,证实了其中两个位点与颈椎 OPLL 的发生和发展存在相关性。但在腰椎 OPPL 患者中是否也存在相似关联性,目前国内、外尚无报道。腰椎 OPPL 临床上较少见,本研究通过多中心才搜集到 30 例患者,骨化灶全部为局灶型和节段型,无 1 例连续型且多合并邻近椎间盘突出,这说明局部椎间盘突出可能也参与了腰椎 OPLL 的发病过程。

本实验 4 个 SNP 位点 6 007C>T(rs17563)、3 564C>T(rs2855532)、IVS-160C>T(rs2071047)、-5 826G>A(rs1957860) 分别位于 BMP-4 基因外显子、内含子及转录起始点 5'端,其中 rs17563 是惟一位于编码区域的 SNP 位点,已有报道其等位基因 C 突变为 T 从而使产物蛋白质分子 152 位置上的丙氨酸变为缬氨酸,这种突变可以降低绝经后妇女粗隆间和全髌关节的骨密度少,基因型之间差异有统计学意义^[14]。本实验也证实了此位点 T 基因的突变可诱导腰椎 OPLL 发病,与对照组比较差异有统计学意义($P<0.05$),但是否与骨化严重程度有关本文未进行研究,因为本研究所搜集的骨化类型较局限易造成偏差。本实验进一步证实了 BMP-4 上 rs17563、rs2855532 基因突变不仅促使颈椎 OPPL 的发生而且与腰椎 OPLL 也有关。但是本研究也有一下几点局限性:病例数较少;骨化类型较单一,未涉及所有骨化类型。2 个位点基因突变是否也可加重骨化程度尚待研究。

最近,一些血清及其他体液中 OPPL 标志物的研究也可以对 OPLL 起到早期诊断作用。Ito 等^[15]通过对脊髓型颈椎病组($n=35$)、OPLL 组($n=7$)及对照组($n=12$)脑脊液中 IL-8、IL-10、TNF- α 含量的比较得出 IL-8 在前两组中的含量明显高于对照组($P<0.05$)。Sugimori 等^[16]对比了 43 名 OPLL 患者中骨化椎体仅限于颈椎和骨化椎体包括颈、胸、腰椎血清中完整骨钙素、骨钙素、I 型前胶原羧基前肽(procollagen I C-terminal propeptide, PICP)及骨特异性碱性磷酸酶的含量水平,结果显示前 3 种蛋白含量颈椎 OPLL 患者中低于对照组,而骨特异性碱性磷酸酶则未显示出明显差异。Ishihara 等^[17]则报道血清中骨钙素、PICP、ICTP 及尿中丙酮酸含量在 OPLL 组及对照组中含量未见明显差异。

腰椎 OPPL 发病率较低,但并非临床上罕见病,由于腰椎肌肉和内部脏器影响普通 X 线较难发现骨化灶,所以临床上推荐对诊断有困难的患者可行三维 CT 检查,可准确测量韧带骨化的厚度及范围,同时也是制定手术方案的重要参考。

参考文献:

- [1] Wang H, Liu DM, Yang ZH, et al. Association of bone morphogenetic protein-2 gene polymorphisms with susceptibility to ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine and its severity in Chinese patients[J]. European spine journal, 2008, 17(7): 956-964.
- [2] 赵伟光, 闫亮, 林欣, 等. 骨形态发生蛋白-4 基因单核苷酸多态性与颈椎后纵韧带骨化[J]. 中国康复理论与实践杂志, 2011, 17(1): 39-41.
- [3] Tsuyama N. Ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine[J]. Clin Orthop Relat Res, 1984, 184: 71-84.
- [4] Takashi S, Shunji M, Hiroaki K, et al. Recent progress in the study of pathogenesis of ossification of the posterior longitudinal ligament[J]. J Orthop Sci, 2005, 5(3): 310-

315.

- [5] Taizo H, Koichi M, Yoshiharu K, et al. A large-scale genetic association study of ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine[J]. Hum Genet, 2006, 119(6): 611-616.
- [6] Tanno M, Ueyama K, Harata S, et al. Uniaxial cyclic stretch induces osteogenic differentiation and synthesis of bone morphogenetic proteins of spinal ligament cells derived from patients with ossification of the posterior longitudinal ligaments[J]. Bone, 2003, 4(33): 475-484.
- [7] 赵刚, 周英杰, 史相钦. 腰椎后纵韧带骨化及其诊治探讨[J]. 中国骨伤, 2006, 10(19): 627-628.
- [8] Wilson SG, Reed PW, Andrew T, et al. A genome-screen of a large twin cohort reveals linkage for quantitative ultrasound of the calcaneus to 2q33-37 and 4q12-21[J]. J Bone Miner Res, 2004, 19(2): 270-277.
- [9] Karasik D, Myers RH, Cupples LA, et al. Genome screen for quantitative trait loci contributing to normal variation in bone mineral density: the framingham study[J]. J Bone Miner Res, 2002, 17(9): 1718-1727.
- [10] Frank NY, Kho AT, Schatton T, et al. Regulation of myogenic progenitor proliferation in human fetal skeletal muscle by BMP4 and its antagonist Gremlin[J]. The Journal of Cell Biology, 2006, 175(1): 99-110.
- [11] Hoshino T, Shimizu R, Ohmori S, et al. Reduced BMP-4 abundance in Gata2 hypomorphic mutant mice result in uropathies resembling human CAKUT [J]. Genes to Cells, 2008, 13(2): 159-170.
- [12] Zakin L, De Robertis EM. Inactivation of mouse Twisted gastrulation reveals its role in promoting Bmp-4 activity during forebrain development[J]. Development, 2004, 131(2): 413-424.
- [13] Sato R, Uchida K, Kobayashi S, et al. Ossification of the posterior longitudinal ligament of the cervical spine: histopathological findings around the calcification and ossification front[J]. J Neurosurg Spine, 2007, 7(2): 174-183.
- [14] Ramesh Babu L, Wilson SG, Dick IM, et al. Bone mass effects of a BMP-4 gene polymorphism in postmenopausal women[J]. Bone, 2005, 36(3): 555-561.
- [15] Ito K, Matsuyama Y, Yukawa Y, et al. Analysis of Interleukin-8, Interleukin-10, and tumor necrosis factor- α in the cerebrospinal fluid of patients with cervical spondylotic myelopathy[J]. Spinal Disord Tech, 2008, 21(2): 145-147.
- [16] Sugimori K, Kawaguchi Y, Ohmori K, et al. Significance of bone formation markers in patients with ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine [J]. SPINE, 2003, 28(4): 378-379.
- [17] Ishihara C, Kushida K, Takahashi M, et al. The efficacy of biochemical markers in patients with ossification of posterior longitudinal ligament of the spine[J]. Spinal Cord, 2000, 38(4): 211-213.