

脊柱后纵韧带骨化的基因学研究进展*

王 鹏 综述 刘晓光** 滕 泽 审校

(北京大学第三医院骨科, 北京 100083)

【内容提要】 脊柱后纵韧带骨化的发生是由环境、基因等多因素造成的。随着基因学研究的深入, 目前认为基因突变是诱发后纵韧带骨化的重要因素。尽管目前在后纵韧带骨化疾病的基因学研究方面取得了一定的进展, 但是仍然还未有确切基因显示与后纵韧带骨化关系密切, 后纵韧带骨化的发病机制还需要进一步的探索。

【关键词】 后纵韧带; 骨化; 基因学

文献标识: A 文章编号: 1009-6604(2016)09-0848-04

doi: 10.3969/j.issn.1009-6604.2016.09.021

Advances on Genetic Research of Ossification of the Posterior Longitudinal Ligament Wang Peng, Liu Xiaoguang, Teng Ze.

Department of Orthopaedics, Peking University Third Hospital, Beijing 100083, China

Corresponding author: Liu Xiaoguang, E-mail: xgspine@sina.com

【Summary】 The ossification of the posterior longitudinal ligament (OPLL) is caused by environmental, genetic and other factors. With the development of genomics research, researchers have found that mutations are important factors inducing OPLL. Despite the genomics research on OPLL has made important advances, no highly correlation has been found between OPLL and the exact single nucleotide polymorphisms (SNPs) loci. The pathogenesis of OPLL needs further exploration.

【Key Words】 Posterior longitudinal ligament; Ossification; Genetics

后纵韧带骨化 (ossification of the posterior longitudinal ligament, OPLL) 是椎旁韧带的病理性异位骨化疾病, 脊髓和神经根的慢性受压可导致脊髓压迫症状及神经根病。OPLL 疾病研究始于 20 世纪 60 年代, 胸椎 OPLL 的发现较颈椎晚, 直到 1972 年 Nagashima^[1] 报道胸椎 OPLL 可以引起胸椎管狭窄症, 胸椎 OPLL 才逐渐引起重视。OPLL 疾病的基因学研究始于 20 世纪七八十年代, 目前绝大部分研究成果来自日本学者。

由于 OPLL 的起病隐匿, 发病进展缓慢, 临床表现可以从无症状到严重压迫。该病主要发生在东北亚地区, 日本流行病学调查^[2] 显示, 该病的患病率为 1.9% ~ 4.3%, 远远高于欧洲和美国地区的 0.01% ~ 1.7%。国内流行病学调查^[3] 显示, 该病在中国北方地区颈肩痛患者中的发生率为 0.44% ~ 8.92%。Tsuji 等^[4] 2016 年报道的日本流行病学调查显示, 男女的患病比率为 2.7:1, 患病年龄主要

是 >40 岁的人群。该病 70% 发生在颈椎, 15% 发生在胸椎^[5]。OPLL 在影像学的形态特征主要分为以下四型^[6]: 孤立型; 节段型; 连续型; 混合型。OPLL 的发生是遗传 (多基因遗传) 和环境 (营养、糖尿病、肥胖) 等多因素控制的疾病^[7, 8]。

OPLL 是脊柱外科领域的高风险手术, 国内外文献报道术后出现症状加重及并发症率达 9.6% ~ 40.8%^[9-11]。由于 OPLL 手术操作复杂且风险极高, 而且学者对于术式和手术时机的选择尚存在较大争议, 因此困扰临床医生对该病制定出及时有效的治疗方案。随着近年遗传实验技术的不断发展以及通过测序对人类基因组的更深刻理解和更具体的研究, 基因突变诱发 OPLL 的观点是目前研究的热点。对于 OPLL 的基因遗传学研究, 可能帮助我们深入认识该病的内在发生发展机制, 寻找评估胸椎 OPLL 严重程度及疾病进展可能性指标, 对于疾病的早期发现和诊断以及探索除手术治疗以外的其他

* 基金项目: 国家自然科学基金 (81472041)

** 通讯作者, E-mail: xgspine@sina.com

辅助治疗手段有重要意义。目前 OPLL 基因学研究手段方法主要有全基因组关联分析 (genome-wide association study, GWAS)、全基因组连锁研究、基因测序关联研究等。本文就近年来 OPLL 发病的基因学研究进展进行综述。

1 家族性遗传规律研究

1989 年 Terayama^[12] 观察到 OPLL 患者的后代患病率为 26.15%, 患者兄妹间的患病率为 28.89%, 家庭成员间的患病率显著高于普通人群, 并就此展开了 OPLL 家族遗传学方面的研究。他认为 OPLL 的遗传方式不是传统的常染色体显性或隐性遗传, 而可能是单基因遗传疾病, 最有可能的遗传方式是常染色体不完全显性遗传。但 Karasugi 等^[13] 认为 OPLL 的家族遗传方式是典型的常染色体隐性遗传。尽管迄今为止 OPLL 家族遗传方式仍然是不确定的, 但 OPLL 的家族性遗传背景证明该病的发生与基因学有关^[14]。

2 人类白细胞抗原单体型研究

人类白细胞抗原 (human leukocyte antigen, HLA) 分析是研究有遗传背景疾病的有效方法。Sakou 等^[15] 研究 OPLL 患者家属的 HLA 单体型, 观察到有 3 种 HLA 单体型在普通人群中非常罕见, 且患者亲属中同样有 OPLL 的人与此 OPLL 患者往往有 2 个相同的 HLA 单体型, 而无 OPLL 的亲属与 OPLL 患者只有 1 个相同的 HLA 单体型, 因此认为 OPLL 的发生与遗传有关。这些研究提示 OPLL 的易感基因可能在同样编码 HLA 基因的 6 号染色体上。

3 Toll 样受体

由于 OPLL 患者常伴有脊髓损伤, 与机体炎症反应有关的 Toll 样受体 (Toll-like receptors, TLR) 引起了 OPLL 基因学研究人员兴趣。TLR 是参与非特异性免疫 (天然免疫) 的一类重要蛋白质分子, 是非特异性免疫重要的组成部分, 也是连接非特异性免疫和特异性免疫的桥梁。目前, 在人类中已经发现的人 TLRs 家族成员有 10 个。TLR 可以通过激活核因子 κ B (NF- κ B) 刺激肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 的产生。

Chung 等^[16] 于 2011 年对 166 例 OPLL 和 231 例正常对照组进行的病例对照研究显示, TLR5 与 OPLL 的发生无关 ($P > 0.05$)。He 等^[17] 对 TLRs 家

族进行研究, 认为 TLR 通路是最有可能参与 OPLL 发生的通路 ($P = 0.004$), TLR1、TLR5、TLR7 是 OPLL 发生的易感基因。

4 骨形态发生蛋白基因研究

骨形态发生蛋白 (bone morphogenetic proteins, BMP) 基因是多功能性生长因子, 能使未分化的间充质细胞定向分化为成骨细胞, 并进而合成胶原, 形成钙化的骨组织^[18]。

Furushima 等^[19] 对参与骨代谢的 88 个基因进行广泛的非参数连锁研究, 结果显示 BMP-4 基因是 OPLL 发生的易感基因, 但未进行多态性的相关研究。Wang 等^[20] 针对北京地区汉族人群 57 例 OPLL 与 135 例正常对照组 BMP-2 基因 exons2 区 2 个单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphisms, SNPs) 的研究显示, OPLL 组中 Ser37Ala (T/G) 的发生率显著高于正常对照组 ($P < 0.001$), Ser87Ser (A/G) 多态性中 G 等位基因与 OPLL 发生的严重程度有关 ($P < 0.001$)。Yan 等^[21] 通过对 420 例中国北方汉族 OPLL 的对照分析, 认为 BMP-2 基因是 OPLL 的易感基因, 并且 Smad 蛋白信号通路在其中起到了重要作用。BMP 的表达与机械应力作用有关。Tanno 等^[22] 对培养的脊髓韧带进行周期性拉伸, 增加了碱性磷酸酶、BMP 以及 BMP 受体表达。与颈椎 OPLL 相比, 胸椎由于胸廓的限制活动度远小于颈椎, 所受局部生物应力影响低于颈椎, 提示在胸椎 OPLL 易感基因研究中, BMP 表达的阳性率低于颈椎 OPLL。而 Kim 等^[5] 针对韩国 OPLL 患者与患者家属的对照研究显示, BMP-2 基因与 OPLL 疾病发生没有关系 ($P > 0.05$)。

5 转化生长因子研究

转化生长因子 (transforming growth factor, TGF) 在骨代谢中起到重要的作用, 参与骨的生长。Kawaguchi 等^[23] 认为 BMP-2 和 TGF- β 均在邻近 OPLL 的软骨区域的骨化基质和软骨细胞中表达, 但不会出现在非 OPLL 的区域中。BMP-2 可能在异位骨化发生过程中刺激间充质细胞分化中起重要作用, TGF- β 可能在异位骨化的晚期阶段在刺激骨形成中起重要作用。Kamiya 等^[24] 对 46 例颈椎 OPLL 的研究显示, 在日本人群中 TGF- β 1 基因的 T869→C 多态性是 OPLL 易感的遗传决定因素, 等位基因 C 是 OPLL 易感的危险因素。而 Han 等^[25] 针对 TGF- β 1 基因的 2 个 SNPs 位点 promoter (-509C>T;

rs1800469) 和 exon 1 (869T > C; rs1982073) 进行对照研究,结果显示这 2 个 SNPs 在韩国人中均与 OPLL 的发生无关 ($P > 0.05$)。Kudo 等^[26]将 OPLL 患者分为颈椎组、颈胸腰任意位置组及正常对照组进行对照分析,结果显示 TGF- β 1 等位基因与 OPLL 的发生以及发生的位置没有显著关系 ($P > 0.05$),等位基因 C 是颈胸腰任意位置发生 OPLL 的危险因素 ($P = 0.0142$)。韩国 Jekarl 等^[27]针对 TGF- β 2 基因的病例对照研究(21 例 OPLL,42 例正常对照)显示,既往研究的 455-4T→A 和 571G→A 在 OPLL 组的发生率显著高于正常对照组 ($P = 0.024$),并且还在所有 OPLL 患者 intron 1 区域检测到 95-35C→T 新突变。Horikoshi 等^[28]于 2006 年发表的大规模的 OPLL 病例对照研究(711 例 OPLL 及 896 例正常人)显示,OPLL 组中 TGF- β 3 基因 IVS1-1284G > C 的发生率显著高于正常对照组 ($P = 0.0004$)。

6 核苷酸焦磷酸酶基因研究

核苷酸焦磷酸酶(nucleotide pyrophosphatase, NPP)基因位于染色体 6q22,编码 NPP 蛋白。NPP 是无机焦磷酸盐(PPi)产生的主要作用酶,PPi 是抑制机体组织钙化的主要抑制剂,NPP 功能失常导致 PPi 水平下降,促进异位组织包括韧带组织骨化^[29]。

日本 Okawa 等^[30]通过对 ttw 大鼠进行动物实验研究,提出 ttw 大鼠发生 OPLL 的主要原因是由于 NPP 基因的无义突变造成的。基因突变导致其基因产物减少超过 1/3,PPi 生成减少,加速了异常的钙化及矿盐沉积。Nakamura 等^[31]对 NPP 基因所有 exons 及其周围 introns 区域,再加上启动子区的大约 1.5 kb 进行扫描,结果显示,OPLL 患者 intron 20 (IVS20-11delT)多态性表达高于正常对照组 ($P = 0.0029$)。但 Tahara 等^[32]却观察到尽管 NPPS 基因的 IVS20-11delT 多态性与胸椎发生 OPLL 或多节段受累有关,但与 OPLL 的发生无关。He 等^[29]对中国人 NPPS 基因进行对照研究,结果显示 NPPS 基因 C973T 与 IVS15-14T→C 不仅与 OPLL 的发生有关,还与 OPLL 疾病的严重程度有关 ($P < 0.007$)。

7 其他易感基因研究

Guo 等^[33]对 235 例 OPLL 中国汉族患者的白介素 15 受体 α (interleukin 15 receptor alpha, IL15RA) 基因研究显示,IL15RA 的 rs2228059 等位基因是 OPLL 的易感基因,特别是在男性患者中。Tahara 等^[32]报道瘦素受体(leptin receptor)基因尽管与

OPLL 的发生无关 ($P > 0.05$),但 A861G 多态性 G 等位基因与胸椎发生 OPLL 或多节段受累有关 ($P = 0.028$)。Yang 等^[34]对 Runt 相关转录因子 2 (Runt-related transcription factor 2, Runx2) 影响 OPLL 的机制进行研究,其课题组对后纵韧带细胞进行培养,认为 Runx2 的连接蛋白 43 (Connexin 43) 通过激活细胞外调节蛋白激酶 (extracellular regulated protein kinase, ERK),影响后纵韧带细胞成骨分化。Nakajima 等^[35]于 2014 年进行迄今为止最大样本数(1130 例日本 OPLL)的 GWAS 分析,结果显示 R-spondin 蛋白参与了 OPLL 的发生 ($P < 0.05$)。

尽管在 OPLL 的基因学研究方面目前找到了一些热点易感基因,但仍然还未找到哪个基因 SNPs 位点显示与 OPLL 高度相关及不同种族人群间一致性,并且缺乏相关的功能验证。关于 OPLL 疾病的连锁分析研究方法,在精确定位易感基因的位置上有其理论上的极限,多个易感基因联合检测、具有高密度的 SNPs 关联研究应该是未来的研究方向。全外显子组或全基因组测序等是非常有前途的研究方法。要明确 OPLL 的易感基因还需要全球多中心大样本的研究。

参考文献

- 1 Nagashima C. Cervical myelopathy due to ossification of the posterior longitudinal ligament. Clin Neurol Neurosurg, 1972, 90 (3): 301 - 302.
- 2 Yonemori K, Imamura T, Ishidou Y, et al. Bone morphogenetic protein receptors and activin receptors are highly expressed in ossified ligament tissues of patients with ossification of the posterior longitudinal ligament. Am J Pathol, 1997, 150 (4): 1335 - 1347.
- 3 李中实, 张光铂, 厚绵福, 等. 我国北方地区颈肩痛病人中颈椎后纵韧带骨化症发病率调查. 中国脊柱脊髓杂志, 1999, 9 (5): 46 - 47.
- 4 Tsuji T, Chiba K, Hosogane N, et al. Epidemiological survey of ossification of the posterior longitudinal ligament by using clinical investigation registration forms. J Orthop Res, 2016, 21 (3): 291 - 294.
- 5 Kim KH, Kuh SU, Park JY, et al. Association between BMP-2 and COL6A1 gene polymorphisms with susceptibility to ossification of the posterior longitudinal ligament of the cervical spine in Korean patients and family members. Genet Mol Res, 2014, 13 (1): 2240 - 2247.
- 6 刘 啸, 刘晓光, 祝 斌, 等. 胸椎后纵韧带骨化症的临床分型及其意义. 中国脊柱脊髓杂志, 2014, 24 (7): 599 - 604.
- 7 Ikegawa S. Genetics of ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine: a mini review. J Bone Metab, 2014, 21 (2): 127 - 132.
- 8 祝 斌, 刘晓光. 后纵韧带骨化症的基因学研究进展. 中国脊柱脊髓杂志, 2013, 23 (10): 947 - 950.

- 9 Li M, Meng H, Du J, et al. Management of thoracic myelopathy caused by ossification of the posterior longitudinal ligament combined with ossification of the ligamentum flavum - a retrospective study. *Spine J*, 2012, 12(12):1093 - 1102.
- 10 Cho JY, Chan CK, Lee SH, et al. Management of cerebrospinal fluid leakage after anterior decompression for ossification of posterior longitudinal ligament in the thoracic spine: the utilization of a volume-controlled pseudomeningocele. *J Spinal Disord Tech*, 2012, 25(4):E93 - E102.
- 11 Matsumoto M, Toyama Y, Chikuda H, et al. Outcomes of fusion surgery for ossification of the posterior longitudinal ligament of the thoracic spine; a multicenter retrospective survey: clinical article. *J Neurosurg Spine*, 2011, 15(4):380 - 385.
- 12 Terayama K. Genetic studies on ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine. *Spine (Phila Pa 1976)*, 1989, 14(11):1184 - 1191.
- 13 Karasugi T, Nakajima M, Ikari K, et al. A genome-wide sib-pair linkage analysis of ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine. *J Bone Miner Metab*, 2013, 31(2):136 - 143.
- 14 Stetler WR, La Marca F, Park P. The genetics of ossification of the posterior longitudinal ligament. *Neurosurg Focus*, 2011, 30(3):E7.
- 15 Sakou T, Taketomi E, Matsunaga S, et al. Genetic study of ossification of the posterior longitudinal ligament in the cervical spine with human leukocyte antigen haplotype. *Spine (Phila Pa 1976)*, 1991, 16(11):1249 - 1252.
- 16 Chung WS, Nam DH, Jo DJ, et al. Association of toll-like receptor 5 gene polymorphism with susceptibility to ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine in korean population. *J Korean Neurosurg Soc*, 2011, 49(1):8 - 12.
- 17 He H, Mao L, Xu P, et al. Ossification of the posterior longitudinal ligament related genes identification using microarray gene expression profiling and bioinformatics analysis. *Gene*, 2014, 533(2):515 - 519.
- 18 Smith ZA, Buchanan CC, Raphael D, et al. Ossification of the posterior longitudinal ligament: pathogenesis, management, and current surgical approaches. *Neurosurg Focus*, 2011, 30(3):E1 - E10.
- 19 Furushima K, Shimo-Onoda K, Maeda S, et al. Large-scale screening for candidate genes of ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine. *J Bone Miner Res*, 2002, 17(1):128 - 137.
- 20 Wang H, Liu D, Yang Z, 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. *Eur Spine J*, 2008, 17(7):956 - 964.
- 21 Yan L, Chang Z, Liu Y, et al. A single nucleotide polymorphism in the human bone morphogenetic protein-2 gene (109T > G) affects the Smad signaling pathway and the predisposition to ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine. *Chin Med J (Engl)*, 2013, 126(6):1112 - 1118.
- 22 Tanno M, Furukawa KI, Ueyama K, 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. *Bone*, 2003, 33(4):475 - 484.
- 23 Kawaguchi H, Kurokawa T, Hoshino Y, et al. Immunohistochemical demonstration of bone morphogenetic protein-2 and transforming growth factor-beta in the ossification of the posterior longitudinal ligament of the cervical spine. *Spine (Phila Pa 1976)*, 1992, 17(3 Suppl):S33 - S36.
- 24 Kamiya M, Harada A, Mizuno M, et al. Association between a polymorphism of the transforming growth factor-beta1 gene and genetic susceptibility to ossification of the posterior longitudinal ligament in Japanese patients. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2001, 26(11):1264 - 1266.
- 25 Han IB, Ropper AE, Jeon YJ, et al. Association of transforming growth factor-beta 1 gene polymorphism with genetic susceptibility to ossification of the posterior longitudinal ligament in Korean patients. *Genet Mol Res*, 2013, 12(4):4807 - 4816.
- 26 Kudo H, Furukawa K, Yokoyama T, et al. Genetic differences in the osteogenic differentiation potency according to the classification of ossification of the posterior longitudinal ligament of the cervical spine. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2011, 36(12):951 - 957.
- 27 Jekarl DW, Paek C, An YJ, et al. TGFBR2 gene polymorphism is associated with ossification of the posterior longitudinal ligament. *J Clin Neuro*, 2013, 20(3):453 - 456.
- 28 Horikoshi T, Maeda K, Kawaguchi Y, et al. A large-scale genetic association study of ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine. *Hum Genet*, 2006, 119(6):611 - 616.
- 29 He Z, Zhu H, Ding L, et al. Association of NPP1 polymorphism with postoperative progression of ossification of the posterior longitudinal ligament in Chinese patients. *Genet Mol Res*, 2013, 12(4):4648 - 4655.
- 30 Okawa A, Nakamura I, Goto S, et al. Mutation in Npps in a mouse model of ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine. *Nat Genet*, 1998, 19(3):271 - 273.
- 31 Nakamura I, Ikegawa S, Okawa A, et al. Association of the human NPPS gene with ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine (OPLL). *Hum Genet*, 1999, 104(6):492 - 497.
- 32 Tahara M, Aiba A, Yamazaki M, et al. The extent of ossification of posterior longitudinal ligament of the spine associated with nucleotide pyrophosphatase gene and leptin receptor gene polymorphisms. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2005, 30(8):877 - 880.
- 33 Guo Q, Lv S, Wu S, et al. Association between single nucleotide polymorphism of IL15RA gene with susceptibility to ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine. *J Orthop Surg Res*, 2014, 9(1):103 - 107.
- 34 Yang H, Shi L, Shi G, et al. Connexin 43 affects osteogenic differentiation of the posterior longitudinal ligament cells via regulation of ERK activity by stabilizing Runx2 in ossification. *Cell Physiol Biochem*, 2016, 38(1):237 - 247.
- 35 Nakajima M, Takahashi A, Tsuji T, et al. A genome-wide association study identifies susceptibility loci for ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine. *Nature Genetics*, 2014, 46(9):1012 - 1016.

(收稿日期:2016-04-15)

(修回日期:2016-06-06)

(责任编辑:王惠群)