

后纵韧带骨化症的基因学研究进展

Advance in genetic research of ossification on the posterior longitudinal ligament

祝 斌, 刘晓光

(北京大学第三医院骨科 100191 北京市)

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2013.10.15

中图分类号: R363.2 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2013)-10-0947-04

后纵韧带骨化(OPLL)是导致颈脊髓病的常见病因,在亚洲人群中尤其多见。日本学者报道其人群患病率为1.9%~4.3%^[1];国内报道在北方地区颈肩痛患者中患病率为0.44%~8.92%^[2]。早期对该疾病的研究以大规模的流行病学研究为主,证实其为多基因及后天环境因素共同作用致病。近20年来分子生物学和基因学技术的进步使得更多的学者从分子生物学角度对后纵韧带骨化的可能易感基因进行了深入的研究;近年来单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)研究逐渐成为探索疾病发病相关易感基因位点的主要方法。笔者就近年来 OPLL 发病的基因学研究进展进行综述。

1 COL11A2、COL6A1 基因与 OPLL

基于 OPLL 显著的种族特异性和家族聚集性,许多学者通过基因表型研究发现 HLA 基因同 OPLL 的发病显著相关。最早 Sakou 等^[3]对 OPLL 患者行 HLA 基因单体型分析,发现 6 处特异性的 HLA 基因聚集,提示 6 号染色体可能存在 OPLL 致病相关基因。Maeda 等^[4]和 Koga 等^[5]针对 6 号染色体的基因图谱进行了分析,结果提示 COL11A2 基因的多态性可能与 OPLL 的发病相关。其中 Koga 等^[5]的研究发现了 4 个有意义的 COL11A2 基因变异区 (position-182, intron6, exon43 和 exon46),但均不是疾病特异性突变。Maeda 等^[4]对 COL11A2 基因的多态性与 OPLL 发病之间的关联进行了细致的分析,在非 OPLL 人群和白种人中 intron6(-4A)和 exon6(+28A)突变显著高于 OPLL 人群,进一步研究提示 intron6(-4A)突变可能通过引起 exon7 高转录和 exon6 低转录来起到防止后纵韧带异位骨化的作用,但具体机制不详。

Tanaka 等^[6]通过全基因组关联性分析发现 6 条染色体上的单核苷酸多态性(SNPs)与 OPLL 相关(1p、6p、11q、14q、16q 和 21q),关联性最强的为多态性区域位于 21q22

染色体上的 COL6A1 基因,共发现 21 处有意义的 SNPs,其中 4 处关联性最强 ($P<0.0001$) 的 SNPs 位点分别为 intron32(-29C)、intron21(+18C)、intron33(+20G)、intron33(+55G),在编码 SNPs 中关联性最强的为 exon15(+39C)。对于之前报道位于 6 号染色体上的 COL11A2 基因^[4]和 NPPS 基因^[7],作者亦进行了验证, COL11A2 基因多态性与 OPLL 相关联,但关联强度不及 COL6A1 基因,而 NPPS 基因多态性与 OPLL 没有显著关联性。之后多位学者的研究证实了 COL6A1 基因多态性与 OPLL 之间的关联性。

Tanaka 等^[6]采用患病同胞配对法发现 4 个 SNPs 位点 [intron32(-29C)、intron21(+18C)、intron33(+20G)、intron33(+55G)]与日本人 OPLL 的发生相关。Tsukahara 等^[8]针对日本人和捷克人 OPLL 患者的研究表明,既往报道的 intron32(-29C)SNP 位点与日本人 OPLL 相关,而在捷克人群未显示关联性,提示 SNPs 与 OPLL 之间的关联性具有种族差异性。Kong 等^[9]针对中国汉族人群 OPLL 和/或黄韧带骨化(OFL)的研究验证了 intron32(-29C)SNP 与中国汉族人群 OPLL 的关联性,同时发现了新的相关 SNP 位点 Promoter(-572T)。

2 BMP、TGFB 基因与 OPLL

Furushima 等^[10]在之前研究的基础上^[4],选取了 88 个与成骨分化和骨代谢相关的候选基因对 126 例患病同胞配对进行基因连锁分析(24 个候选基因为人间充质干细胞成骨分化早期明显上调或下调的基因,根据数据库选择的与骨代谢相关的基因 64 个),共发现 8 个候选基因与 OPLL 相关联(CDH13、CRYAB、BMP4、PRG1、TGFB3、OPN、PTH1R、IGF1),其中 BMP4 基因与 OPLL 显著关联。BMP4 可在体内外诱导软骨与骨形成。之后许多学者就 BMPs 基因的多态性与 OPLL 易感性之间的关系进行了广泛的研究。

Koga 等^[11]针对日本 OPLL 患者 COL11A2、BMP2、碱性磷酸酶 (AKP)、TNF- α 基因的限制性片段长度多态性 (RFLP)研究发现, BMP2 基因的两个限制性片段长度多态性 (RFLP) Msp I 和 Taq I 在病例组和对照组之间无统计

第一作者简介:男(1984-),主治医师,博士研究生,研究方向:脊柱外科

电话:(010)82267011 E-mail:zhubin@bjmu.edu.cn

学差异。Wang 等^[12]对中国汉族人群 OPLL 患者 BMP2 基因的 SNPs 研究表明,既往报道的骨代谢相关 SNPs 位点 exons3(-726)T/C 和 exons3(-583)A/G 均与 OPLL 的发生和累及范围无关联性,男性颈椎 OPLL 患者与 exons3(-726)T/C 相关。同一课题组的另一项研究^[13]表明,Ser37Ala T/G 多态性中 G 等位基因与 OPLL 发生相关,与累及范围不相关,而 Ser87Ser A/G 多态性中 G 等位基因与 OPLL 累及范围相关,但与其发生不相关。Ren 等^[14]针对 450 例中国人群 OPLL 患者及 550 例健康对照者的研究发现 3 个 SNP 与中国人 OPLL 易感性相关:SNP8 (intron 5, 54419150,C>T)、SNP13(rs17563,exon5,54417522,C>T)和 SNP14 (rs76335800,3'utr,54416602,C>T),单体型 TGGGCTT(In54419150C>T,rs10130587C>G,rs35107139T>G,rs2761880A>G,rs74486266T>C,rs17563C>T,rs76335-800A>T)与 OPLL 的严重程度相关,推测单体型 TGGGCTT 可导致 BMP4 蛋白在后纵韧带组织中高表达。

除以上基因多态性位点外,TGF-B1 基因是另外一个被深入研究的 OPLL 易感性相关的热点基因。既往研究证实 TGF-B1 是骨形成与吸收过程中的重要影响因子。Yamada 等^[15]研究发现 TGF-B1 基因信号序列第 29 个核苷酸 T>C 多态性会导致其产物中第十个氨基酸由亮氨酸变为脯氨酸,与绝经后女性骨密度减低显著相关,而 OPLL 患者多伴有骨密度减低且女性多见。Kamiya 等^[16]的研究证实了该基因位点的多态性(T869T>C,Leu10>Pro)与 OPLL 的发生相关,该位点 C 等位基因提示 OPLL 易感性。之后多位学者验证了 TGF-B1 基因多态性与 OPLL 易感性之间的关联。Kawaguchi 等^[17]对日本 OPLL 患者 T869T>C 多态性位点与 OPLL 影像学特点之间的关联性进行了研究,发现 T869T>C 多态性与 OPLL 的易感性之间无显著关联,C 等位基因与 OPLL 累及范围相关,OPLL 患者中“CC”和“TC”基因型者 OPLL 易广泛累及颈胸和/或腰椎。Han 等^[18]对韩国人群的研究则表明两个 SNPs (-509C>T;rs1800469 和 869T>C;rs1982073)均与韩国人 OPLL 的发生和累及范围无明显关联性。

然而对于 SNPs 与 OPLL 之间的关联性亦有研究持不同观点,Horikoshi 等^[19]对 35 个候选基因的上 109 个 SNPs 位点进行了测定,研究对象为 711 例日本 OPLL 患者,对照组为 896 例健康成人,35 个候选基因涵盖了既往文献报道的与 OPLL 发生相关联的基因、异位骨化相关基因、OPLL 伴发疾病相关基因和全身骨代谢相关基因(表 1)。结果显示仅有 TGFB3 IVS1-1284G>C 显示与 OPLL 发生高度关联,而之前报道的 OPLL 相关 SNPs 位点(COL11A2 IVS6-4T>A,NPPS IVS15-14T>C 和 TGFB1 29T>C)均未显示与 OPLL 的显著关联性。在亚组分析中 COL11A2 IVS6-4T>A 显示与女性 OPLL 的弱相关性。

3 NPPS 基因、OB-Rb 基因与 OPLL 动物模型

目前比较成熟的 OPLL 的动物模型主要有 ttw/twy 大

表 1 Horikoshi 等^[19]SNPs 研究纳入的 35 个候选基因

基因代号	基因名称	基因位置
COL11A2	胶原蛋白 XI, α 2 Collagen type XI, alpha 2	6p
NPPS	核苷酸焦磷酸酶 Nucleotide pyrophosphatase	6q
TGFB1	转化生长因子- β 1 Transforming growth factor-1	19q
IL1B	白介素-1B Interleukin-1B	2q
PTHRI	甲状旁腺激素受体-1 Parathyroid hormone receptor 1	3p
OPN	骨调素 Osteopontin	4q
RXRB	维甲类受体 β Retinoid X receptor beta	6p
ESR1	雌激素受体-1 Estrogen receptor 1	6q
PRG1	蛋白多糖-1 Proteoglycan 1	10q
CRYAB	晶状体蛋白 α B Crystallin alpha B,	11q
IGF1	胰岛素样生长因子-1 Insulin-like growth factor 1,	12q
BMP4	骨形态蛋白-4 Bone morphogenetic protein 4,	14q
TGFB3	转化生长因子-3 Transforming growth factor-3,	14q
CDH13	钙粘蛋白 13 Cadherin 13	16q
LEPR	瘦素受体 Leptin receptor,	1p
TGFB2	转化生长因子-2 Transforming growth factor-2	1q
AHSG	胎球蛋白 Alpha 2-Heremans-Schmid glycoprotein	3q
MSX2	肌节同源盒基因同系物 2 Msh homeobox homolog 2	5q
EDN1	内皮素-1 Endothelin 1,	6p
SNAI2	Snail homolog 2	8q
ZNF145	锌指蛋白 145 Zinc finger protein 145	11q
MGP	卵白质 Matrix gla protein,	12p
NOG	头蛋白 Noggin	17q
PTGIS	前列腺素 I ₂ 合酶 Prostaglandin I ₂ synthase,	20q
SNAI1	Snail homolog 1	20q
MEPE	Matrix,extracellular phosphoglycoprotei with ASARM motif	4q
FGF23	成纤维细胞生长因子 23 Fibroblast growth factor 23,	12p
DMPK	强直性肌营养不良蛋白基因 Dystrophia myotonica-protein kinase,	19q
GNAS	鸟苷酸调节蛋白 GNAS complex locus	20q
BMP3	骨形态蛋白 3 Bone morphogenetic protein 3,	4p
LRP5	低密度脂蛋白受体相关蛋白 5 Low-density lipoprotein receptor- related protein 5,	11q
OSX	成骨相关转录因子 Osterix	12q
ALOX15	花生四烯酸脂氧合酶 15 Arachidonate 15-lipoxygenase,	17p
SOST	硬骨素 Sclerostin	17q
LDLR	低密度脂蛋白受体 Low-density lipoprotein receptor	19p

鼠和 Zuker 肥胖大鼠。ttw/twy 大鼠是一种自然形成的 OPLL 突变体,并呈现常染色体隐性遗传。该小鼠在 6 周龄时自发出现脊柱韧带的骨化并持续进展,最终导致严重的脊髓病表现。研究表明,其骨化韧带的病理学和骨代谢改变与人类 OPLL 极为相似,是目前最理想的 OPLL 动物模型^[20]。Okawa 等^[21]的研究证实,大鼠 NPPs 基因第 1813 位的核苷酸突变(G>T)导致其由甘氨酸密码子变为终止密码子。NPPs 基因产物核苷酸焦磷酸酶(nucleotide pyrophosphatase)通过调节无机焦磷酸盐(PPi)的生成来调节骨的矿化,PPi 是生理性及病理性钙化、骨矿化等的主要抑制因素^[22]。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^[21]。

Zuker 肥胖大鼠是研究遗传性肥胖的动物模型。有学者观察发现其胸椎韧带易发生异位骨化,免疫组化分析发现在大鼠骨化的韧带内有大量 BMP 受体和激素受体,与人类骨化的后纵韧带组织的免疫组化表现相似^[23]。针对 Zuker 肥胖大鼠的基因学研究证实,大鼠的瘦素受体基因(OB-Rb)第 880 位核苷酸 A>C 突变,导致其编码产物由谷氨酸变为脯氨酸^[24]。Cornish 等^[25]的研究发现瘦素(leptin)在体外实验中可促进基质细胞向成骨细胞分化,并抑制其向脂肪细胞分化,提示其可能为导致 Zuker 肥胖大鼠脊柱韧带骨化的原因。

基于对 OPLL 动物模型致病基因的研究,不断有学者对人类 NPPs 基因及 Leptin 受体基因的多态性与 OPLL 之间的关联性进行探索。Nakamura 等^[26]的研究证实,NPPs 基因 IVS20-11delT 多态性与 OPLL 易感性相关。但同一课题组 Koshizuka 等^[27]通过另一组病例研究却发现 IVS20-11delT 多态性与 OPLL 易感性无关,而另一多态性位点 IVS15-14T>C 与 OPLL 易感性相关,且与疾病的严重程度(大于 10 个节段)和早发(小于 35 岁)相关。Tahara 等^[28]针对日本人 NPPs 基因和 Lptin 受体基因多态性的病例对照研究发现,NPPs 基因的 IVS20-11delT 多态性与男性患者出现胸椎 OPLL 或多节段受累相关,其他 NPPs 基因多态性位点(596C>T,A533C,IVS8+27T>G)未显示与 OPLL 易感性相关;而 Lptin 受体基因的 6 个多态性位点纳入分析(A519G、A861G、T1222C、G2161C、A3250G、CTTTA del/ins in3'-UTR)均未显示与 OPLL 易感性相关,只有 A861G 多态性 G 等位基因显示与 OPLL 累及的范围相关。Horikoshi 等^[19]的大规模基因筛查亦未显示 NPPs 多态性(IVS15-14T>C)与 OPLL 的关联性。

人类 OPLL 患者 NPPs 基因和 OB-Rb 基因多态性分析表明,虽然在动物模型中明确了致病基因及其发病机理,但在人类基因中寻找相对基因位点多态性时结论并不一致。同一研究中心不同时期针对相同 SNPs(IVS20-11delT)与 OPLL 的关联性结论亦不一样^[26,27]。

4 其他 OPLL 相关 SNPs 位点

除前述热点 OPLL 相关 SNPs 位点外,尚有许多学者

发现了其他与 OPLL 发生相关的 SNPs 位点。如上海长征医院科研团队对 RUNX2、BMP-2、COL6A1 及 VDR 基因的 19 个 SNPs 位点与 OPLL 关联性进行了研究,证实 RUNX2 基因的两个 SNPs 位点(RS1321075 和 RS12333172)与中国汉族人群 OPLL 的关联性^[29]。

尽管如此,目前 OPLL 发病相关基因学研究仍存在许多不足,虽然目前已发现许多 OPLL 相关 SNPs 位点,但没有哪个 SNPs 显示与 OPLL 高度相关及研究间的一致性。成熟的 OPLL 动物模型相关突变基因在人类基因组上进行验证时显示关联性较差。以上均提示 OPLL 为多因素致病,基因学及环境因素均在其发病过程中起重要作用,OPLL 发病相关基因学研究仍有大量课题待探索。

5 参考文献

1. Inamasu J, Guiot BH, Sachs DC. Ossification of the posterior longitudinal ligament: an update on its biology, epidemiology, and natural history[J]. Neurosurgery, 2006, 58(6): 1027-1039.
2. 李中实, 张光铂, 绳厚福, 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[J]. 中国脊柱脊髓杂志, 1999, 9(5): 285-286.
3. 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 [J]. Spine, 1991, 16(11): 1249-1252.
4. Maeda S, Ishidou Y, Koga H, et al. Functional impact of human collagen alpha2(XI) gene polymorphism in pathogenesis of ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine[J]. J Bone Miner Res, 2001, 16(5): 948-957.
5. Koga H, Sakou T, Taketomi E, et al. Genetic mapping of ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine [J]. Am J Hum Genet, 1998, 62(6): 1460-1467.
6. Tanaka T, Ikari K, Furushima K, et al. Genomewide linkage and linkage disequilibrium analyses identify COL6A1, on chromosome 21, as the locus for ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine[J]. Am J Hum Genet, 2003, 73(4): 812-822.
7. Koshizuka Y, Kawaguchi H, Ogata N, et al. Nucleotide pyrophosphatase gene polymorphism associated with ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine[J]. J Bone Miner Res, 2002, 17(1): 138-144.
8. Tsukahara S, Miyazawa N, Akagawa H, et al. COL6A1, the candidate gene for ossification of the posterior longitudinal ligament, is associated with diffuse idiopathic skeletal hyperostosis in Japanese[J]. Spine, 2005, 30(20): 2321-2324.
9. Kong Q, Ma X, Li F, et al. COL6A1 polymorphisms associated with ossification of the ligamentum flavum and ossification of the posterior longitudinal ligament[J]. Spine, 2007, 32(25): 2834-2838.
10. 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]. *J Bone Miner Res*, 2002, 17(1): 128–137.
11. Koga H, Hayashi K, Taketomi E, et al. Restriction fragment length polymorphism of genes of the alpha 2 (XI) collagen, bone morphogenetic protein-2, alkaline phosphatase, and tumor necrosis factor-alpha among patients with ossification of posterior longitudinal ligament and controls from the Japanese population[J]. *Spine*, 1996, 21(4): 469–473.
12. Wang H, Yang ZH, Liu DM, et al. Association between two polymorphisms of the bone morphogenetic protein-2 gene with genetic susceptibility to ossification of the posterior longitudinal ligament of the cervical spine and its severity [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2008, 121(18): 1806–1810.
13. 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 [J]. *Eur Spine J*, 2008, 17(7): 956–964.
14. Ren Y, Feng J, Liu ZZ, et al. A new haplotype in BMP4 implicated in ossification of the posterior longitudinal ligament(OPLL) in a Chinese population[J]. *J Orthop Res*, 2012, 30(5): 748–756.
15. Yamada Y, Miyauchi A, Goto J, et al. Association of a polymorphism of the transforming growth factor-beta1 gene with genetic susceptibility to osteoporosis in postmenopausal Japanese women[J]. *J Bone Miner Res*, 1998, 13(10): 1569–1576.
16. 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[J]. *Spine*, 2001, 26(11): 1264–1266; discussion 1266–1267.
17. Kawaguchi Y, Furushima K, Sugimori K, et al. Association between polymorphism of the transforming growth factor-beta1 gene with the radiologic characteristic and ossification of the posterior longitudinal ligament[J]. *Spine*, 2003, 28(13): 1424–1426.
18. 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[J]. *Genet Mol Res*, 2013, 12(AOP): [Epub ahead of print].
19. Horikoshi T, Maeda K, Kawaguchi Y, 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.
20. Okawa A, Ikegawa S, Nakamura I, et al. Mapping of a gene responsible for twy (tip-toe walking Yoshimura), a mouse model of ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine(OPLL) [J]. *Mamm Genome*, 1998, 9(2): 155–156.
21. 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[J]. *Nat Genet*, 1998, 19(3): 271–273.
22. Rebbe NF, Tong BD, Finley EM, et al. Identification of nucleotide pyrophosphatase/alkaline phosphodiesterase I activity associated with the mouse plasma cell differentiation antigen PC-1[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991, 88(12): 5192–5196.
23. Okano T, Ishidou Y, Kato M, et al. Orthotopic ossification of the spinal ligaments of Zucker fatty rats: a possible animal model for ossification of the human posterior longitudinal ligament[J]. *J Orthop Res*, 1997, 15(6): 820–829.
24. Phillips MS, Liu Q, Hammond HA, et al. Leptin receptor missense mutation in the fatty Zucker rat [J]. *Nat Genet*, 1996, 13(1): 18–19.
25. Cornish J, Callon KE, Bava U, et al. Leptin directly regulates bone cell function in vitro and reduces bone fragility in vivo[J]. *J Endocrinol*, 2002, 175(2): 405–415.
26. 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)[J]. *Hum Genet*, 1999, 104(6): 492–497.
27. Koshizuka Y, Kawaguchi H, Ogata N, et al. Nucleotide pyrophosphatase gene polymorphism associated with ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine [J]. *J Bone Miner Res*, 2002, 17(1): 138–144.
28. 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[J]. *Spine*, 2005, 30(8): 877–881.
29. Liu Y, Zhao Y, Chen Y, et al. RUNX2 polymorphisms associated with OPLL and OLF in the Han population[J]. *Clin Orthop Relat Res*, 2010, 468: 3333–3341.
- (收稿日期:2013-07-10 修回日期:2013-08-05)
(本文编辑 卢庆霞)