

- of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. Science, 1995, **270** (5235): 467~ 470
- 3 Langen H, Gray C, Roder D, *et al.* From genome to proteome: protein map of *Haemophilus influenzae*. Electrophoresis, 1997, **18** (7): 1184~ 1192
 - 4 Fountoulakis M, Juranville J F, Roder D, *et al.* Reference map of the low molecular mass proteins of *Haemophilus influenzae*. Electrophoresis, 1998, **19** (10): 1819~ 1827
 - 5 Fountoulakis M, Takacs B, Langen H. Two-dimensional map of basic proteins of *Haemophilus influenzae*. Electrophoresis, 1998, **19** (5): 761~ 766
 - 6 Link A J, Hays L G, Carmack E B, *et al.* Identifying the major proteome components of *Haemophilus influenzae* type strain NCTC 8143. Electrophoresis, 1997, **18** (8): 1314~ 1334
 - 7 VanBogelen R A, Abshire K Z, Pertsemliadis A, *et al.* *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology. Washington DC: ASM Press, 1996. 2067~ 2117
 - 8 Pasquali C, Frutiger S, Wilkins M R, *et al.* Two-dimensional gel electrophoresis of *Escherichia coli* homogenates: the *Escherichia coli* SWISS-2DPAGE database. Electrophoresis, 1996, **17** (3): 547~ 555
 - 9 Neidhardt F C, Savageau M A. *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology. Washington DC: ASM Press, 1996. 1310~ 1324
 - 10 VanBogelen R A, Olson E R, Wanner B L, *et al.* Global analysis of proteins synthesized during phosphorus restriction in *Escherichia coli*. J Bacteriol, 1996, **178** (15): 4344~ 4366
 - 11 VanBogelen R A, Abshire K Z, Moldover B, *et al.* *Escherichia coli* proteome analysis using the gene-protein database. Electrophoresis, 1997, **18** (8): 1243~ 1251
 - 12 VanBogelen R A, Neidhardt F C. Ribosomes as sensors of heat and cold shock in *Escherichia coli*. Proc Nat Acad Sci USA, 1990, **87** (15): 5589~ 5593
 - 13 Urquhart B L, Atsalos T E, Roach D, *et al.* 'Proteomic contigs' of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* (BCG) using novel immobilised pH gradients. Electrophoresis, 1997, **18** (8): 1384~ 1392
 - 14 Hodges P E, Payne W E, Garrels J I. The Yeast Protein Database (YPD): a curated proteome database for *Saccharomyces cerevisiae*. Nucleic Acids Res, 1998, **26** (1): 68~ 72
 - 15 Bini L, Heid H, Liberatori S, *et al.* Two-dimensional gel electrophoresis of *Caenorhabditis elegans* homogenates and identification of protein spots by microsequencing. Electrophoresis, 1997, **18** (3~ 4): 557~ 562
 - 16 Ericsson C, Petho Z, Mehlin H. An on-line two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis protein database of adult *Drosophila melanogaster*. Electrophoresis, 1997, **18** (3~ 4): 484~ 490
 - 17 Arnott D, O'Connell K L, King K L, *et al.* An integrated approach to proteome analysis: identification of proteins associated with cardiac hypertrophy. Anal Biochem, 1998, **258** (1): 1~ 18
 - 18 Wilkins M R, Williams K L, Appel R D, *et al.* Proteome Research: New Frontiers in Functional Genomics. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 1997. 187~ 220
 - 19 Rabilloud T, Kieffer S, Procaccio V, *et al.* Two-dimensional electrophoresis of human placental mitochondria and protein identification by mass spectrometry: toward a human mitochondrial proteome. Electrophoresis, 1998, **19** (6): 1006~ 1014
 - 20 Molloy M P, Bolis S, Herbert B R, *et al.* Establishment of the human reflex tear two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis reference map: new proteins of potential diagnostic value. Electrophoresis, 1997, **18** (15): 2811~ 2815
 - 21 Gravel P, Walzer C, Aubry C, *et al.* New alterations of serum glycoproteins in alcoholic and cirrhotic patients revealed by high resolution two-dimensional gel electrophoresis. Biochem Biophys Res Commun, 1996, **220** (1): 78~ 85
 - 22 Ostergaard M, Rasmussen H, Nielsen H, *et al.* Proteome profiling of bladder squamous cell carcinomas: identification of markers that define their degree of differentiation. Cancer Research, 1997, **57** (18): 4111~ 4117
 - 23 Sarto C, Marocchi A, Sanchez J C, *et al.* Renal cell carcinoma and normal kidney protein expression. Electrophoresis, 1997, **18** (3~ 4): 599~ 604

Progress in Proteome Research. HU Zhi-Yuan, HE Fu-Chu (*Institute of Radiation Medicine, Beijing 100850, China*).

Abstract Proteome research techniques are the important tools in the Post-Genome Era. A review is given about the progress in proteome research of bacteria, *Haemophilus influenzae*, *Saccharomyces cerevisiae*, *C. elegans*, *Drosophila melanogaster* and human diseases.

Key words proteome, two dimension electrophoresis, database

高效的骨诱导生长因子——成骨蛋白-1*

王 健 吴惠联¹⁾ 韩金祥

(山东省医药生物技术研究中心, 济南 250062)

摘要 成骨蛋白-1 (OP-1) 又称骨形态发生蛋白-7 (BMP-7), 属转化生长因子 β (TGF- β) 超家族成员. 重组人 OP-1 (rhOP-1) 在体内和体外都显示了高效的骨诱导活性, 可使多种实验动物的骨缺损满意愈合, 有良好的临床应用前景.

* 山东省重大攻关项目 (981154506). ¹⁾ 山东省医学科学院基础所微生物研究室.

收稿日期: 1998-01-17, 修回日期: 1998-06-08

关键词 成骨蛋白-1 (骨形态发生蛋白-7), 转化生长因子 β , 骨诱导因子, 骨折愈合, 骨缺损

学科分类号 R34, R341

成骨蛋白-1 (OP-1) 又称骨形态发生蛋白-7 (BMP-7) 是 BMP 家族中的一员, 具有高效的骨诱导活性. 它可对成骨细胞系列中的不同细胞发挥阶段特异性调控作用, 诱导新骨形成. 近年来, 随着分子生物学技术的发展, 以 DNA 重组技术生产的重组人 OP-1 已经问世, 并已在多方面证实其生物学活性, 现正向临床过渡.

1 OP-1 的分子生物学

骨形态发生蛋白 (BMP) 是从 DBM 中分离提纯到一类具高效骨诱导活性的蛋白质. 近年来, 随着分子生物学技术的发展, BMP 各成分的 cDNA 克隆相继被报道. 1990 年英国剑桥大学遗传学研究所的 Celeste^[1] 从人的胎盘和胎脑基因组文库中获取了 BMP-7 的 cDNA. 几乎同时, 美国哈佛大学生物分子研究所的 Ozkaynak^[2] 以不同探针从人基因组文库中调出 OP-1 的 cDNA, 后经核苷酸和氨基酸序列比较发现, 二者实为同一物质.

OP-1 是 TGF- β 超家族成员, 与同家族中 BMP-5、BMP-6 关系最近, 被归为一个亚类. 它主要在骨、肾、肾上腺、膀胱和脑 (尤其是海马) 组织以及某些骨肉瘤细胞中表达, 特别在骨发育和骨折愈合过程中表达升高^[2].

人 OP-1 cDNA 全长 1 293 bp, 它含一个开放读码框 (ORF), 编码产生由 431 个氨基酸构成的 OP-1 前体蛋白, 分为信号肽段、前体肽段和成熟肽段三部分^[2,3]. 此前体蛋白可在体内被剪切加工为含 139 个氨基酸的成熟 OP-1 蛋白, 分子质量约 15 ku, 带有 3 个糖基化位点, 属糖蛋白. 其三维立体结构形似“手掌”^[4], 由一个 α 螺旋和 8 个 β 片层结构组成, C 端 TGF- β 家族共有的 7 个半胱氨酸的保守区. 在真核细胞 (如 CHO) 表达的 rhOP-1 通常为同源二聚体形式, 由两成熟单体 OP-1 以第 103 位半胱氨酸结成双硫键连接而成, 其分子质量为 34~38 ku. 部分未剪切加工完全的 (带有前肽成分) 的 OP-1 也可分泌至细胞外, 且水溶性大大增加, 称可溶性 OP-1. 最近, Israel 等^[5] 又利用共转染细胞技术获得了 BMP-4/7 和 BMP-2/7 两种异源二聚体形式表达产物. 与同源二聚体形式产物相比, 生物学活性高出 5~20 倍.

OP-1/BMP-7 通过结合 BMP 家族丝/苏氨酸激

酶类共同受体发挥作用, 一般分两型^[6]: I 型受体为活化素受体样激酶 (ALK)、II 型受体称 DAF-4 蛋白, 三者形成复合物后向胞内传导转录活化信号.

2 OP-1 的生物学活性

2.1 诱导骨形成和发育

虽然骨形成和发育的确切机制和各种生长因子在其中的具体作用尚未明了, 但多方实验表明: OP-1 在其中扮演着重要角色.

Sampath 等^[3] 以骨胶原为载体, 将 rhOP-1 植入大鼠皮下诱导异位成骨. 5 d 后可见植入局部有大量软骨细胞诱生; 9 d 后伴随新生毛细血管长入, 软骨细胞开始钙化形成新骨; 至 14~21 d 时矿化骨大部重建, 其中形成骨髓腔, 腔内可见红系、粒系、巨核系细胞发育. 与高纯化牛成骨蛋白组相比较, rhOP-1 的作用特异性更高, 成骨活性更强. 而单纯植入载体组和不植入载体组均未能诱生新骨. 体外实验表明 OP-1 可刺激成骨细胞, 类成骨细胞及已分化的人骨细胞, 促进其增殖和胶原合成, 以及细胞中碱性磷酸酶, PTH 反应性 cAMP 和骨钙素表达升高; 在长期培养基中可使胞外基质钙化率增加, 且与 1, 25 (OH) $_2$ D $_3$, TGF- β_1 , IGF 有协同效应.

Macias 等^[7,8] 发现 OP-1 对鸡胚发育中骨和关节的形成起着直接调控作用. 包括诱导中胚层间充质细胞向软骨细胞方向分化并调节此类细胞的数量和空间分布; 募集分化的成熟骨细胞以控制长骨骨干和关节发育始基的定位; 刺激生长平台软骨细胞的增殖、分化等.

2.2 诱导软骨生长发育

Chen 等^[9,10] 研究表明 OP-1 可促进雏鸡尾软骨细胞增殖和成熟分化及成年牛和人的关节软骨细胞基质 (如 II 型胶原和粘蛋白等) 的合成. Haaijman 等^[11] 提出 OP-1 对软骨细胞的调控分为两步: 第一步是诱导软骨膜细胞增殖并向软骨细胞表型分化; 第二步是抑制已成熟软骨细胞向肥大软骨细胞分化. 提示 OP-1 对软骨的生长发育调控呈阶段特异性.

2.3 OP-1 的骨诱导机制

Asahina 等^[12] 在胎鼠颅骨细胞软骨内成骨模型中观察到 OP-1 可阶段特异性地诱导原始成骨祖细

细胞的定向分化。如在早期(第一天)加入,可诱导其向成软骨细胞方向分化;在中晚期(第七天)加入则诱导其向成骨细胞方向分化。对不同类型的细胞其作用也不同,对未分化间充质细胞,可诱导其向成软骨细胞分化;对已分化的成骨细胞可使其碱性磷酸酶和骨钙素表达升高,增强成骨活性。有趣的是,对同一类细胞以不同剂量 OP-1 作用的效果也有差异:如对间充质中的脂肪样细胞,在低剂量作用时,使其脂肪合成增加;在高剂量作用时,使其向软骨细胞分化。另外, Hentunen^[13] 等发现 OP-1 还可作用于类破骨细胞的分化,参与骨吸收和骨重建过程。

Li 等^[14] 认为, OP-1 诱导骨形成的机制首先在于促进成骨细胞分化。体外实验显示 OP-1 可使培养基中成骨细胞数量和形成克隆数显著增加。其次在于阶段特异性调节骨基质蛋白的组成成分及含量。在成骨早期, OP-1 可使骨桥素 (osteopordin) 表达升高;在成骨晚期则使骨钙素 (osteocalcin) 含量增加。这与体内成骨过程中骨基质蛋白的变化相吻合。近期, Koyama 等^[15] 又用 DNA 印迹和 RT-PCR 等多种分子生物学方法检测到 OP-1 先后对成骨细胞系和基质细胞系中 77 种(包括碱性磷酸酶、骨钙素等)基因的表达有不同程度的调节作用。以上结果从细胞和分子水平表明 OP-1 是通过阶段特异性地对不同靶细胞发挥不同诱导作用来调节骨形成过程的。它在其中起着至关重要的全程和全方位调控作用。

3 OP-1 的临床应用前景

近年来,国内外学者对 BMP 的临床应用研究已取得了初步成功。但因其天然组织中含量极少(每公斤湿骨中仅提取约 1 mg),且有潜在感染危险和免疫排斥反应问题而受到限制。随着分子生物学技术的发展,以基因工程方法大量获取重组人 BMP 蛋白成分已成现实。目前国外已有 BMP-2, BMP-4, OP-1/BMP-7 等基因工程产品问世。其中 rhOP-1 在美国 Creative Biomolecules 与 Stryker 企业合作开发下已进入临床 III 期试验,主要用于修补矫形缺陷、脊柱融合术、愈合骨折及骨和软骨的缺损以及治疗牙齿再生等方面。其中在批准用于修补矫形缺陷的重组人类蛋白中, OP-1 尚属首例。国内已有大肠杆菌中表达的 BMP-2, BMP-3 产品并通过活性鉴定且申请了专利^[16, 17]。以上基因工程产品具有纯度高(90%以上)、活性强、特异性好,

可大规模生产以及无病原体污染和免疫排斥反应等优点。如能推广应用,必将开创在分子水平研究和治疗骨骼疾病的新时代。

迄今为止,已有大量报道证实 OP-1 可愈合多种实验动物的骨及软骨缺损,显示了良好的临床应用前景。

3.1 愈合骨缺损

Cook 等^[18] 将 rhOP-1 与胶原载体混合植入 2~3 cm 宽的兔尺骨人工缺损处,并进行组织学观察:1~2 周时,可见先是间充质细胞聚集和血管侵入,随后散在的软骨细胞团出现并迅速钙化蔓延,X 射线显示斑点状散在钙化区;2~3 周时,钙化岛屿逐渐相连,中心出现骨髓成分,骨小梁开始形成,同时可见膜内成骨现象;4~8 周时,新骨已重建为致密的板层骨,新生成的皮质和髓质也与断端交界处吻合良好,皮质骨中央的骨髓腔中充满了功能完全的骨髓,至此连续性得到恢复,缺损满意愈合。经大体观察与机械测试,在宽度、颜色、密度和生物力学功能方面与原完整骨相同。而同时设立的单纯植入载体组和不植入对照组只能观察到弥漫的纤维化组织充填,偶见断端少量编织骨生成。对比实验证实 rhOP-1 的成骨活性较天然高纯化牛成骨蛋白高出 40 倍。此后,类似试验在狗、羊和非人灵长类动物体内进行均获得了成功。更有 Ripamonti^[19] 给出 rhOP-1 的最适治疗浓度为 100~500 $\mu\text{g/g}$ 胶原载体,并在实验后长达一年的跟踪观察中未发现任何并发症和毒副作用。另有报道将 OP-1 用于犬脊柱融合术,术后 6 周椎体即可融合牢固,12 周后融合完全,其生物学和生物力学功能明显优于自体骨移植对照组。

以上实验的成功为解决骨科临床的一大难题——大片骨缺损和骨不连接带来了希望,更可进一步应用于矫形外科治疗,甚至可考虑全身应用。以前,此类病例只能靠自体或异体骨移植来治疗,手术操作复杂,患者痛苦大。近来,虽有天然 BMP 制品试用,但因较难获得及潜在感染和免疫排斥问题而使应用受限。rhOP-1 等基因工程生产的人源性骨诱导生长因子的应用,可大大减少甚至免除手术操作,降低患者痛苦。若能大规模推广于临床,必将成为骨科疾病治疗的新里程碑。

3.2 愈合软骨缺损

Grgic 等^[20] 将 OP-1 与载体胶原混合植入兔关节软骨的人工缺损处。组织学发现: OP-1 诱生的间充质来源软骨细胞和创面周围软骨细胞均可产生

关节特异性 II 型胶原及粘蛋白, 促进软骨损伤的修复. 植入 12 周后, 创面完全修复, 外观与正常软骨相同, 厚度一致且连续性好. 对照组则多见纤维组织, 创面修复差或未修复. 软骨的再生修复亦为临床难题之一, OP-1 的应用为其找到了解决办法. 此外, OP-1 还可用于牙齿修补、抑制肿瘤及神经的保护和再生方面, 有着极广泛的应用价值.

当前, 有关骨诱导生长因子方面的报道日渐增多. 虽然骨形成的细胞及分子水平的调控机制如不同细胞群体的趋化、增殖、分化和协调及各种激素、细胞因子或生长因子等活性物质网络构成和调节以至骨骼疾病的分子病理学都未确切了解, 但随着分子生物学技术的应用和发展, 以骨诱导生长因子应用为代表, 从分子水平研究和治疗骨骼疾病已成趋势, 并且显示出良好的发展前景.

参 考 文 献

- Celeste A J, Iannazzi J M, Taylor J A, *et al.* Identification of transforming growth factor β family members present in bone inductive protein purified from bovine bone. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, **87** (24): 9843~ 9847
- Ozkaynak E, Rueger D C, Drier E A, *et al.* OP-1 cDNA encodes an osteogenic protein in the TGF- β family. *EMBO J*, 1990, **9** (7): 2085~ 2093
- Sampath T K, Maliakal J C, Hauschka P V, *et al.* Recombinant human osteogenic protein 1 (hOP-1) induces new bone formation *in vivo* with a specific activity comparable with natural bovine osteogenic protein and stimulates osteoblast proliferation and differentiation *in vitro*. *J Biol Chem*, 1992, **267** (28): 20352~ 20362
- Griffith D L, Keck P C, Sampath T K, *et al.* Three-dimensional structure of recombinant human osteogenic protein 1: structural paradigm for the transforming growth factor beta superfamily. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93** (2): 878~ 883
- Israel D I, Nove J, Kerns K M, *et al.* Heterodimeric bone morphogenetic proteins show enhanced activity *in vitro* and *in vivo*. *Growth Factors*, 1996, **13**: 291~ 300
- ten Dijke P, Yamashita H, Sampath T K, *et al.* Identification of type I receptors for osteogenic protein 1 and bone morphogenetic protein 4. *J Biol Chem*, 1994, **269** (25): 16985~ 16988
- Macias D, Ganan Y, Sampath T K, *et al.* Role of BMP-2 and OP-1 (BMP-7) in programmed cell death and skeletogenesis during chick limb development. *Development*, 1997, **124** (6): 1109~ 1117
- Wu L N, Ishikawa Y, Genge B R, *et al.* Effect of osteogenic protein 1 on the development and mineralization of primary cultures of avian growth plate chondrocytes: modulation by retinoic acid. *J Cell Biochem*, 1997, **67** (4): 498~ 513
- Chen P, Vukicevic S, Sampath T K, *et al.* Osteogenic protein 1 promotes growth and maturation of chick sternal chondrocytes in serum-free cultures. *J Cell Sci*, 1995, **108** (Pt 1): 105~ 114
- Flechtenmacher J, Huch K, Thonar E J, *et al.* Recombinant human osteogenic protein 1 is a potent stimulator of the synthesis of cartilage proteoglycans and collagens by human articular chondrocytes. *Arthritis Rheum*, 1996, **39** (11): 1896~ 1904
- Haaijman A, D' Souza R N, Bronckers A L, *et al.* OP-1 (BMP-7) affects mRNA expression of type I, II, X collagen, and matrix Gla protein in ossifying long bones *in vitro*. *J Bone Miner Res*, 1997, **12** (11): 1815~ 1823
- Asahina I, Sampath T K, Hauschka P V. Human osteogenic protein 1 induces chondroblast, osteoblastic and/or adipocytic differentiation of clonal murine target cells. *Exp Cell Res*, 1996, **222** (1): 38~ 47
- Hentunen T A, Lakkakorpi P T, Tuukkanen J, *et al.* Effects of recombinant human osteogenic protein 1 on the differentiation of osteoclast-like cells and bone resorption. *Biochem Biophys Res Commun*, 1995, **209** (2): 433~ 443
- Li I W, Cheifetz S, McCulloch C A, *et al.* Effects of osteogenic protein 1 (OP-1, BMP-7) on bone matrix protein expression by fetal rat calvarial cells are differentiation stage specific. *J Cell Physiol*, 1996, **169** (1): 115~ 125
- Koyama H. Analysis of genes implicated in osteogenic signaling by osteogenic protein 1 (OP-1) using differential display method. *Kokubyo Gakkai Zasshi*, 1997, **64** (2): 205~ 222
- 卢兹凡, 刘新平, 陈苏民, 等 (Lu Z F, Liu X P, Chen S M, *et al.*). 人骨形成蛋白 2 羧基端肽在大肠杆菌中的高表达及活性测定. 第四军医大学学报 (*Journal of the Fourth Military Medical University*), 1995, **16** (6): 429~ 431
- 崔有宏, 陈苏民, 刘新平, 等 (Cui Y H, Chen S M, Liu X P, *et al.*). 重组人骨形成蛋白-3 羧基端肽在大肠杆菌中表达及其诱骨活性. 生物化学杂志 (*Chin Biochem J*), 1997, **13** (5): 513~ 518
- Cook S D, Baffes G C, Wolfe M W, *et al.* The effect of recombinant human osteogenic protein 1 on healing of large segmental bone defects. *J Bone Joint Surg*, 1994, **76-A** (6): 827 ~ 838
- Ripamonti U, van den Heever B, Sampath T K, *et al.* Complete regeneration of bone in the baboon by recombinant human osteogenic protein 1 (hOP-1, bone morphogenetic protein 7). *Growth Factors*, 1996, **13**: 273~ 289
- Grgic M, Jelic M, Basic V, *et al.* Regeneration of articular cartilage defects in rabbits by osteogenic protein 1 (bone morphogenetic protein 7). *Acta Med Croatica*, 1997, **51** (1): 23~ 27

High Efficient Bone Inductive Factor ——Osteogenic Protein 1. WANG Jian, WU Hui-Lian, HAN Jir-Xiang (Shandong Research Center of Medical Biotechnology, Jinan 250062, China).

Abstract Osteogenic protein 1 (OP-1, or bone morphogenetic protein 7) is a member of the transforming growth factor (TGF) - β superfamily. It has been testified that recombinant human OP-1 (hOP-1) indicated potent bone inductive efficiency *in vitro* and *in vivo*. The satisfactory results were obtained from healing bone defects in many kinds of experimental animals with hOP-1. Recombinant hOP-1 has prospective clinical application.

Key words osteogenic protein 1 (bone morphogenetic protein 7), transforming growth factor- β , bone inductive factor, bone defect, fracture healing