

# 骨形态发生蛋白 4 与血管钙化的相关性

魏 晓 综述, 欧三桃 审校

(泸州医学院附属医院肾病内科, 四川省泸州市 646000)

[关键词] 骨形态发生蛋白 4; 血管钙化; 动脉粥样硬化

[摘要] 骨形态发生蛋白 4(BMP-4)是转化生长因子 $\beta$ (TGF- $\beta$ )超家族成员之一,属于多功能生长因子,在胚胎发育、血管生成、细胞增殖、分化、骨骼形成、异位成骨、骨折修复等方面具有重要作用。血管钙化(VC)是一个与骨发育相似的可调控的复杂的生物学过程,其中心环节是血管平滑肌细胞(VSMC)向成骨样细胞转化。近年的研究发现,BMP-4可能参与血管钙化的发生和发展,但具体机制尚未清楚,文章就其相关关系的研究进展作一综述。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

## The Relevant Research Progress of Bone Morphogenetic Proteins-4 and Vascular Calcification

WEI Xiao, and OU San-Tao

(Department of Nephrology, the Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou, Sichuan 646000, China)

[KEY WORDS] Bone Morphogenetic Proteins-4; Vascular Calcification; Atherosclerosis

[ABSTRACT] Bone morphogenetic proteins-4 (BMP-4), a member of the transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) superfamily, is a multi-functional growth factor that plays key roles in embryonic development, angiogenesis, cell proliferation and differentiation, skeletal formation, ectopic osteogenesis, fracture repair, and et al. Vascular calcification (VC) is considered as an actively regulated and complex process, similar to osteogenesis. The transdifferentiation process of vascular smooth muscle cells (VSMC) to the osteogenic phenotype plays a crucial role in the formation of VC. In recent years, researches have shown that BMP-4 may be implicated in the formation and progress of VC, but the specific mechanism has not yet been elucidated. The relationship between BMP-4 and VC are reviewed in this paper.

骨形态发生蛋白(bone morphogenetic proteins, BMP)属转化生长因子 $\beta$ (Transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ )超家族成员,1965年由Urist等首先从脱钙骨基质提取物中分离得到,是一种具有独特异位骨和软骨诱导活性的酸性蛋白质,具有使未分化的间充质干细胞向骨和软骨细胞分化的能力,因此被命名为骨形态发生蛋白<sup>[1]</sup>。同时,在胚胎发生及发育、组织和细胞分化、凋亡等方面都有重要作用<sup>[2]</sup>。BMP家族成员多达30<sup>[3]</sup>个以上,骨形态发生蛋白2(bone morphogenetic protein-2, BMP-2)是目前研究最广泛,也是公认的BMP家族中成骨活性最强的亚型。而BMP-4和BMP-2的结构和功能非常相似,属于同一亚组,同时,也是促进成骨表型转化的生长因子,参与正常骨和软骨的形成、骨折修复、异位

成骨等<sup>[4]</sup>。晚近研究也发现,血管钙化的病变部位以及血清中可以发现BMP-4的表达是增加的。表明BMP-4与血管钙化的发生发展是密切相关的,因此本文将对其相关关系作一综述。

## 1 骨形态发生蛋白 4 的分子结构、受体及相关的信号通路

### 1.1 骨形态发生蛋白 4 的分子结构

1988年Wang等<sup>[5]</sup>从牛脱钙骨基质中初步纯化了一种牛BMP,分子量为30 kDa,还原后出现了分子量分别为30、18和16 kDa的3种蛋白质。后在人的基因cDNA文库中筛选出BMP-2(BMP-2A)和

[收稿日期] 2015-07-24

[修回日期] 2015-09-03

[基金项目] 泸州市人民政府-四川医科大学科技战略合作项目(2015LZCYD-S04)

[作者简介] 魏晓,硕士研究生,研究方向为糖尿病肾病与血管钙化,E-mail为757061143@qq.com。通讯作者欧三桃,博士,副主任医师,副教授,硕士研究生导师,主要研究方向为糖尿病肾病及血管钙化,E-mail为ousantao@163.com。

BMP-4(BMP-2B),两者属于同一亚群,基因序列高度同源。BMP-4 基因位于 14 号染色体上,BMP-4 的 DNA 编码区为 1.22 kb,编码含 408 氨基酸残基的蛋白质。BMP-4 合成时为前体蛋白,包括 N 端疏水分泌性引导序列、中间区域的前肽和 C 端的成熟区域。其中羧基端成熟区域内的 7 个高度保守的半胱氨酸可能参与了分子间二聚体的形成。通过蛋白质分解过程释放后,两个前体以二硫键结合发生二聚作用,有活性的同二聚体或异二聚体被分泌出来<sup>[6]</sup>。

### 1.2 骨形态发生蛋白 4 受体及相关的信号通路

BMP-4 同其它 TGF- $\beta$  超家族成员一样,通过与异二聚体复合物丝氨酸/苏氨酸酶受体结合而介导胞内信号的传递过程,包括 I 型和 II 型受体, I 型受体包括:骨形态发生蛋白受体 1A(bone morphogenetic protein receptor-1A, BMPR-1A)[也称激活素受体激酶 3(activin receptor-like kinase-3, ALK3)]、BMPR-1B(ALK6)、ALK1、ALK2; II 型受体包括: BMPR II[也称激活素受体 II(activin receptor, ActR II)]、ActR II B。BMP 首先与 II 型受体结合,然后再结合 I 型受体,形成的受体复合物使特定的受体调节蛋白 Smad1、Smad5、Smad8 磷酸化,然后再结合伴随蛋白 Smad4,形成复合物转运至细胞核,参与特定的基因转录过程,产生各种生物学效应<sup>[7]</sup>。BMP-4 也可通过细胞外信号激酶/促丝裂原活化蛋白激酶通路(extracellular-signal regulated kinase/mitogen-activated protein kinase, ERK/MAPK)<sup>[8-10]</sup>、尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶/活性氧(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase/reactive oxygen species, NADPH 氧化酶/ROS)、磷脂酰肌醇 3 激酶/蛋白激酶 B(phosphoinositide 3-kinase/RAC- $\alpha$  serine/threonine-protein kinase, PI3K/Akt)等非 Smad 信号通路发挥作用。

## 2 血管钙化的概述及相关因素

### 2.1 血管钙化的概述

既往认为,血管钙化是钙磷结晶沉积于细胞和组织间的被动过程。近年发现,在血管钙化部位中可以找到大量骨形成的调节因子和骨结构蛋白。因此认为血管钙化形成早期是一个类似于骨和软骨形成的、主动的、高度可调控的生物学过程,其中核心环节是血管平滑肌细胞向成骨样细胞的转分化。血管钙化分为四类:内膜钙化和中膜钙化,另外还有心瓣膜钙化、钙化防御。内膜钙化,类似于软骨

内成骨,主要见于动脉粥样硬化(atherosclerosis, As),与炎症、斑块形成相关,呈斑点状分布;中膜钙化(也称 Mönckeberg's 钙化)类似于膜内成骨,主要见于高龄、糖尿病(diabetes mellitus, DM)及慢性肾脏病(chronic kidney disease, CKD)等,呈连续线样分布,常常导致血管硬度增加、顺应性下降、脉率加快、脉压增大,最终可导致左心室肥大等,增加心血管事件的发生率和死亡率<sup>[11]</sup>。

### 2.2 血管钙化的相关因素

血管钙化的具体机制尚未完全清楚。但从病理机制上讲,血管钙化的促进因素与抑制因素之间的失衡是其发生与发展的重要环节。除了常见的危险因素(年龄、吸烟、肥胖、高血脂、高血糖、高血压等),促进钙化的因素还包括:钙磷水平升高、炎症因子、氧化应激、凋亡、BMP-2、BMP-4、Runx 相关转录因子(runt-related transcription factor 2, Runx2)、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)、骨唾液蛋白(bone sialoprotein)等;抑制钙化的因素包括:骨保护蛋白(osteoprotegerin, OPG)、骨桥蛋白(osteopontin, OPN)、基质谷氨酸蛋白(matrix Gla protein, MGP)、胎球蛋白 A(fetuin-A)、骨形态发生蛋白 7(bone morphogenetic protein-7, BMP-7)、焦磷酸盐(pyrophosphate)等<sup>[12-15]</sup>。各种因素通过诱导血管细胞向成骨和软骨细胞表型转化,细胞外基质矿化,参与血管钙化的发生与进展。

## 3 骨形态发生蛋白 4 在血管钙化中的作用及相关机制

### 3.1 骨形态发生蛋白 4 在血管钙化中的作用

血管内皮细胞(endothelial cells, EC)和血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMC)可以表达 BMP 及其受体,BMP-2、BMP-4 已经被证明在血管钙化的区域有表达。BMP-2 和(或)BMP-4 在钙化病变部位的表达增加会激活转录程序,导致 VSMC 收缩表型下降(比如肌动蛋白 $\alpha$ ),而成软骨和成骨样基因表达上升,引起 VSMC 表型转化,参与血管矿化的发生和发展<sup>[16]</sup>。Stahls 等<sup>[17]</sup>发现,在合并有冠状动脉疾病的 CKD 患者,血清 BMP-4 水平是升高的,与冠状动脉钙化指数呈正相关,并且调整其他危险因素后两者仍然相关。

基质谷氨酸蛋白(matrix Gla protein, MGP)是 BMP-2 和 BMP-4 的抑制剂,在血管内皮和中膜表达,可以抑制血管中膜钙化和动脉粥样硬化钙化的发生。头蛋白(Noggin)是内源性的 BMP 拮抗剂,通

过阻断受体复合物形成,改善内皮功能,抑制 BMP-4 诱导的内皮促动脉粥样硬化效应<sup>[18]</sup>。Malhotra 等<sup>[19]</sup>证实,BMP 信号在 MGP 缺乏的大鼠发生血管钙化中具有重要作用,而抑制 BMP 信号后,会通过抑制成骨表型 (Runx2、OPN) 的产生从而减轻血管钙化的程度。同时,BMP-4 在钙化防御中也起重要作用<sup>[20]</sup>。Poggio 等<sup>[21]</sup>研究发现,在无症状的动脉瓣膜硬化的患者体内,成骨样基因的表达以及 BMP-4 的表达是上升的。但是,Son 等<sup>[22]</sup>发现,在 2 型糖尿病患者,血清 BMP-4 水平与动脉硬化、颈动脉粥样硬化标志物呈负相关,这可能是随着动脉粥样硬化的进展,BMP 抑制剂 (MGP, Noggin 等) 的表达增加所致。总之,BMP-4 可能在血管钙化发生中具有重要作用。

### 3.2 骨形态发生蛋白 4 参与血管钙化的可能机制

3.2.1 炎症反应、氧化应激 动脉粥样硬化被认为是一种炎症性疾病<sup>[23]</sup>,研究表明,在 2 型糖尿病患者,内皮功能不良和低度的炎症是独立于其他危险因素导致动脉粥样硬化的原因<sup>[24]</sup>,同时也是心血管并发症的诱发因素和标志。BMP-4 优先在血管内皮表达,通过增加细胞间黏附分子的表达,加速单核细胞的黏附,是参与促炎、促高血压、促动脉粥样硬化的调节因子。同时,BMP-4 在血流动力学紊乱的血管局部,通过激活动脉 NADPH 氧化酶,产生活性氧 (ROS),导致内皮功能不良以及高血压,参与动脉粥样硬化的发生<sup>[25-26]</sup>。

氧化应激是高糖情况下引起内皮功能不良的主要原因。BMP-4 也通过氧化应激依赖的环氧合酶 2 的表达上调,损害内皮功能,导致内皮依赖的血管舒张功能障碍<sup>[27]</sup>。研究发现<sup>[28]</sup>,高糖增加人主动脉内皮细胞 (HAEC) 上的 BMP (BMP-2、BMP-4) 的表达,以及 Smad 信号通路的激活。Zhang 等<sup>[29]</sup>也发现,Noggin 抑制 BMP-4/激活素样受体激酶 3 (activin receptor-like kinase 3, ALK3)/ROS 信号通路可以限制内皮氧化应激,增加一氧化氮生物利用度,改善糖尿病小鼠血管内皮功能。

3.2.2 细胞凋亡 BMP-4 是一种促炎细胞因子,与内皮细胞凋亡相关<sup>[30]</sup>,BMP-4 诱导内皮细胞凋亡可通过激活 NADPH 氧化酶,导致活性氧产生增加,从而使细胞凋亡蛋白酶 3 的表达增加,同时也引起上游信号通路 p38MAPK 和 c-Jun 氨基末端激酶 (c-Jun N-terminal kinase, JNK) 的激活。因此认为,BMP-4 诱导内皮细胞凋亡是通过 ROS/p38MAPK/JNK 依赖的信号通路激活凋亡蛋白酶 3 所导致

的<sup>[31]</sup>。而凋亡被认为是血管钙化的起始重要环节,因此 BMP-4 可能通过诱导细胞凋亡参与血管钙化的发生,但具体机制尚未阐明。

3.2.3 骨形态发生蛋白 4/骨形态发生蛋白受体 2/Smad1/5/8 信号通路 动脉粥样硬化是由巨噬细胞摄取氧化型低密度脂蛋白 (oxidized low-density lipoprotein, ox-LDL) 引起的慢性炎症性疾病。泡沫细胞的形成是早期动脉粥样硬化形成的关键步骤。研究证实,BMP-4 及其受体在动脉粥样硬化病变部位以及易于发生动脉粥样硬化的血管区域的表达是升高的,说明它们在斑块形成中有重要作用<sup>[32]</sup>。骨形态发生蛋白受体 2 (BMP receptor 2, BMPR-2) 是 BMP-4 的受体,Feng 等<sup>[33]</sup>研究发现,BMP-4 可通过 BMPR-2/Smad1/5/8 信号通路增加泡沫细胞的形成,减少脂质运载体的表达,脂质外流减少,从而参与动脉粥样硬化的发生。

3.2.4 核因子  $\kappa$ B 受体活化因子/核因子  $\kappa$ B 受体活化因子配体/骨形态发生蛋白 4 信号通路 核因子  $\kappa$ B 受体活化因子 (receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B, RANK)/核因子  $\kappa$ B 受体活化因子配体 (receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand, RANKL)/骨保护蛋白 (OPG) 信号通路参与血管钙化的发生,且血管钙化与 RANKL 呈剂量依赖性的增加<sup>[34-35]</sup>。Panizo 等<sup>[36]</sup>发现,RANKL 增加 BMP-4 在 VSMC 上的表达,RANKL 诱导的 VSMC 钙化是通过 RANKL/RANK/BMP-4 依赖的信号途径,同时发现钙化的增加可以被内源性的 BMP-4 抑制剂 Noggin 所抑制。而且,在体内钙化区域内钙内容物的沉积与 RANKL 和 BMP-4 的表达增加平行。因此认为,RANKL 通过结合 RANK 后激活 RANK,增加 BMP-4 的表达,促进血管钙化的发生。同时,Liu 等<sup>[37]</sup>也证实,在瘦素所致的钙化的血管平滑肌细胞成骨分化过程中,与 ERK1/2/RANKL/BMP-4、PI3K/Akt/RANKL/BMP-4 信号通路密切相关,同时也增加 ALP 的活性、Runx2 的表达、钙盐沉积及矿化结节的形成。

## 4 小 结

BMP-4 作为骨形态发生蛋白家族成员,具有诱导骨和软骨形成的特性,尽管国外的研究发现 BMP-4 可能参与血管钙化的发生、发展,尤其在动脉粥样硬化血管钙化过程中,但是具体的作用机制尚未完全清楚,因此,深入研究 BMP-4 在血管钙化中的作用机制,对于高龄、糖尿病、慢性肾脏病等疾病所致血管钙化的预防、治疗及减少心血管事件的发



病率、死亡率具有重要临床指导意义。

#### [参考文献]

- [1] Urist MR, Lietze A, Mizutani H, et al. A bovine low molecular weight bone morphogenetic protein (BMP) fraction[J]. Clin Orthop Relat Res, 1982, (162): 219-232.
- [2] 但洋, 刘鹏, 刘琦斌, 等. 骨形态发生蛋白-2、-4 和-6 在脂肪间充质干细胞向软骨细胞诱导中的调节作用[J]. 中华实验外科杂志, 2014, 31(4): 808-811.
- [3] Son JW, Jang EH, Kim MK, et al. Serum BMP-4 levels in relation to arterial stiffness and carotid atherosclerosis in patients with type 2 diabetes[J]. Biomark Med, 2011, 5(6): 827-835.
- [4] 贝抗胜, 吴礼杨, 孙庆文, 等. BMP4 促进人骨膜来源细胞体外成软骨细胞分化[J]. 中华显微外科杂志, 2013, 36(5): 469-474.
- [5] Wang EA, Rosen V, Cordes P, et al. Purification and characterization of other distinct bone-inducing factors[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988, 85(24): 9484-488.
- [6] Leong LM, Brickell PM. Bone morphogenetic protein-4[J]. Int J Biochem Cell Biol, 1996, 28(12): 1293-296.
- [7] Miyazono K, Kamiya Y, Morikawa M. Bone morphogenetic protein receptors and signal transduction[J]. J Biochem, 2010, 147(1): 35-51.
- [8] 王琴, 仇红刚, 卡米拉·阿不里米提, 等. 骨形态发生蛋白4通过ERK/MAPK 信号通路影响人脐静脉内皮细胞的成血管能力[J]. 基础医学与临床, 2013, 33(8): 1014-018.
- [9] Li Z, Chen YG. Fine-tune of intrinsic ERK activity by extrinsic BMP signaling in mouse embryonic stem cells[J]. Protein Cell, 2012, 3(6): 401-404.
- [10] Chiu CY, Kuo KK, Kuo TL, et al. The activation of MEK/ERK signaling pathway by bone morphogenetic protein 4 to increase hepatocellular carcinoma cell proliferation and migration[J]. Mol Cancer Res, 2012, (3): 415-427.
- [11] Schlieper G, Schurgers L, Brandenburg V, et al. Vascular calcification in chronic kidney disease: an update[J]. Nephrol Dial Transplant, 2015, [Epub ahead of print].
- [12] Palaoian NJ, Giachelli CM. A current understanding of vascular calcification in CKD[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2014, 307(8): F891-900.
- [13] Evrard S, Delanaye P, Kamel S, et al. Vascular calcification: from pathophysiology to biomarkers[J]. Clin Chim Acta, 2015, 438: 401-414.
- [14] McCarty MF, DiNicolantonio JJ. The molecular biology and pathophysiology of vascular calcification[J]. Postgrad Med, 2014, 126(2): 54-64.
- [15] Wu M, Rementer C, Giachelli CM. Vascular calcification: an update on mechanisms and challenges in treatment[J]. Calcif Tissue Int, 2013, 93(4): 365-373.
- [16] Derwall M, Malhotra R, Lai CS, et al. Inhibition of bone morphogenetic protein signaling reduces vascular calcification and atherosclerosis[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2012, 32(3): 613-622.
- [17] Stahls PF 3rd, Lightell DJ Jr, Moss SC, et al. Elevated serum bone morphogenetic protein 4 in patients with chronic kidney disease and coronary artery disease[J]. J Cardiovasc Transl Res, 2013, 6(2): 232-238.
- [18] Chang K, Weiss D, Suo J, et al. Bone morphogenetic protein antagonists are coexpressed with bone morphogenetic protein 4 in endothelial cells exposed to unstable flow in vitro in mouse aortas and in human coronary arteries: role of bone morphogenetic protein antagonists in inflammation and atherosclerosis[J]. Circulation, 2007, 116(11): 1258-266.
- [19] Malhotra R, Burke MF, Martyn T, et al. Inhibition of bone morphogenetic protein signal transduction prevents the medial vascular calcification associated with matrix Gla protein deficiency[J]. PLoS One, 2015, 10(1): e0117098.
- [20] Griethe W, Schmitt R, Jurgensen JS, et al. Bone morphogenetic protein-4 expression in vascular lesions of calciphylaxis[J]. J Nephrol, 2003, 16(5): 728-732.
- [21] Poggio P, Sainger R, Branchetti E, et al. Noggin attenuates the osteogenic activation of human valve interstitial cells in aortic valve sclerosis[J]. Cardiovasc Res, 2013, 98(3): 402-410.
- [22] Son JW, Jang EH, Kim MK, et al. Serum BMP-4 levels in relation to arterial stiffness and carotid atherosclerosis in patients with Type 2 diabetes[J]. Biomark Med, 2011, 5(6): 827-835.
- [23] Imanishi T, Akasaka T. Novel strategies to target inflammatory processes in atherosclerosis[J]. Curr Pharm Des, 2013, 19(9): 1616-625.
- [24] de Jager J, Dekker JM, Kooy A, et al. Endothelial dysfunction and low-grade inflammation explain much of the excess cardiovascular mortality in individuals with type 2 diabetes: the Hoorn Study[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006, 26(5): 1086-093.
- [25] Koga M, Engberding N, Dikalova AE, et al. The bone morphogenetic protein inhibitor, noggin, reduces glycemia and vascular inflammation in db/db mice[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2013, 305(5): H747-755.
- [26] Jo H, Song H, Mowbray A. Role of NADPH oxidases in disturbed flow- and BMP4-induced inflammation and Atherosclerosis[J]. Antioxid Redox Signal, 2006, 8(9-10): 1609-619.
- [27] Wong WT, Tian XY, Chen Y, et al. Bone morphogenetic protein-4 impairs endothelial function through oxidative stress-dependent cyclooxygenase-2 up-regulation: implications on hypertension[J]. Circ Res, 2010, 107(8): 984-991.
- [28] Boström KI, Jumabay M, Matveyenko A, et al. Activation of vascular bone morphogenetic protein signaling in diabetes mellitus[J]. Circ Res, 2011, 108(4): 446-457.
- [29] Zhang Y, Liu J, Tian XY, et al. Inhibition of bone morphogenetic protein 4 restores endothelial function in db/db diabetic mice[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2014, 34(1): 152-159.
- [30] Kiyono M, Shibuya M. Inhibitory Smad transcription factors protect arterial endothelial cells from apoptosis induced by BMP4[J]. Oncogene, 2006, 25(54): 7131-137.
- [31] Tian XY, Yung LH, Wong WT, et al. Bone morphogenetic protein-4 induces endothelial cell apoptosis through oxidative stress-dependent p38MAPK and JNK pathway[J]. J Mol Cell Cardiol, 2012, 52(1): 237-244.
- [32] Bostrom K, Watson KE, Horn S, et al. Bone morphogenetic protein expression in human atherosclerotic lesions[J]. J Clin Invest, 1993, 91(4): 1800-809.
- [33] Feng J, Gao J, Li Y, et al. BMP4 enhances foam cell formation by BMPR-2/Smad1/5/8 signaling[J]. Int J Mol Sci, 2014, 15(4): 5536-552.
- [34] Kang YH, Jin JS, Son SM. Long term effect of high glucose and phosphate levels on the OPG/RANK/RANKL/TRAIL system in the progression of vascular calcification in rat aortic smooth muscle cells[J]. Korean J Physiol Pharmacol, 2015, 19(2): 111-118.
- [35] Yuan LQ, Zhu JH, Wang HW, et al. RANKL is a downstream mediator for insulin-induced osteoblastic differentiation of vascular smooth muscle cells[J]. PLoS One, 2011, 6(12): e29037.
- [36] Panizo S, Cardus A, Encinas M, et al. RANKL increases vascular smooth muscle cell calcification through a RANK-BMP4-dependent pathway[J]. Circ Res, 2009, 104(9): 1041-048.
- [37] Liu GY, Liang QH, Cui RR, et al. Leptin promotes the osteoblastic differentiation of vascular smooth muscle cells from female mice by increasing RANKL expression[J]. Endocrinology, 2014, 155(2): 558-567.

(此文编辑 许雪梅)