

第 X 章

骨形态发生蛋白在骨骼形成及发育中的作用

陈曦, 李刚

创伤及骨外科, 贝尔法斯特女王大学,

Musgrave Park 医院, 贝尔法斯特, BT9 7JB, 英国

Department of Trauma and Orthopaedic Surgery, Queen's University Belfast, Musgrave Park Hospital, Belfast, BT9 7JB, UK.

骨形态发生蛋白 (bone morphogenetic protein, BMPs) 的发现, 提纯及其重组合成标志着人类在骨生理学研究中的重大进展, 本章主要介绍BMPs的发展史, 从早在十九世纪八十年代Senn的偶然发现, 到随后的二十世纪六十年代Urist里程碑式的进展, 直到当代的试验研究以及美国国家药物监督管理局 (FDAs) 关于BMPs作为主流药物应用于临床的决定, 及其分类和功能。另外还将探讨BMPs在胚胎和成人骨骼形成及发展中的作用, 它们在骨科, 牙科, 基因治疗和其他临床领域的应用, 剂量和载体的应用, 以及伴随而来的潜在危险。

1. BMPs 的历史及分类

1889年Senn¹在用脱钙的公牛骨残渣和三碘甲烷治疗骨髓炎骨缺损时注意到脱钙的公牛骨可以促进骨缺损的愈合。1930年Levander^{2,3}注意到骨的天然酒精抽提物回注到肌肉组织可以诱导新骨形成。1961年Sharrard和Collins⁴报道了儿童脊柱融合手术中乙二胺四乙酸 (EDTA) 脱钙同种异体骨移植的应用。并且得到Ray and Holloway⁵试验室研究的进一步证实。但在这一领域中最重要发现可能是1965年Urist⁶关于骨基质能诱导骨形成的报道。Urist通过异位移植动物供者盐酸脱钙骨干骨, 例如植入腹直肌, 四头肌, 脊柱伸肌腹侧陷凹, 发现植入的骨抽提物可以诱导新骨的形成。他把这种活性成分命名为“骨形态发生蛋白 (bone morphogenetic protein, BMPs)”或“成骨蛋白 (osteogenic protein, OPs)”。然而, 由于当时还没有可再生的分析手段, 不能明确证实异位骨形成就是由于这种假定蛋白质的存在, 因此试验只好被迫中止。1983年Reddi和Sampath发现了一种粗糙但是可以高度重复利用的分析方法。通过对异位形成骨的分析, 他们发现分离出蛋白组分之后, 余下的基质成分无法诱导新骨的形成。而恢复正常组成成分之后, 诱导成骨的能力也随之完全恢复⁷。

1992年Johnson及其同事利用纯化的人类BMP进行了第一例临床试验⁸。随之开展了大量的有关BMP基因测序的工作。直到最终2002年美国国家药物监督管理局 (FDAs) 批准OP-1 (BMP-7) 用于长骨缺损的临床治疗以及胶原载体颗粒携带重组人类BMP-2在前腰体间融合中的应用。

BMPs是转化生长因子 β (TGF-beta) 超家族成员。这一定义是基于二者在一些氨基酸序列, 如TGF-beta激活素和抑制素, 及Müllerian抑制物质(MIS)^{9,10}中的相似之处。

Table 2: 骨形态发生蛋白家族

BMP	主要功能
BMP-1	骨基质中 BMPs 的释放
BMP-2	成骨诱导, 成骨细胞分化
BMP-3 (Osteogenin)	骨中含量最高, 抑制成骨
BMP-4	成骨诱导, 肺脏及眼的生长发育
BMP-5	成骨诱导
BMP-6	成骨细胞分化, 软骨形成
BMP-7 (OP-1)	成骨诱导, 肺脏及眼的生长发育
BMP-8 (OP-1)	成骨诱导
BMP-9	神经系统, 造血
BMP-10	心脏系统发育
BMP-11 (GDF-8)	中胚层及神经组织塑模
BMP-12 (GDF-7)	肌腱及韧带形成
BMP-13 (GDF-6)	肌腱及韧带形成
BMP-14 (GDF-5)	软骨形成, 促进肌腱及骨骼的愈合
BMP-15	调节卵泡刺激素活性

GDF:生长分化因子

2. BMPs 在骨发育及形成中的作用

2.1 BMPs 和异位骨形成

位于骨膜, 骨髓以及其他骨骼外组织的细胞具有成骨的能力^{11, 12, 13}。非定向化的间充质细胞群向骨组织的分化始于一个称为成骨诱导的过程。从组织学来看, 移植骨片 (含有 BMPs) 中的新骨形成代表着经典的软骨内骨化过程。开始时表现为间充质干细胞向移植处的聚集。它们围绕着骨片, 在 1—3 天内端粒酶活性显著增强, 随之分化为软骨, 软骨钙化, 形成新骨。众所公认, 这一过程代表着骨形成中的软骨模式, 但是进一步的研究表明事实并非如此。Caplan¹⁴报道骨片周围有一成骨细胞层, 这层细胞与入侵血管紧密接触, 形成最初的骨样组织, 随后在骨片表面进行骨化。而肥大的软骨被骨髓取代, 植入骨片的周围会有许多骨髓形成¹⁵。异位骨形成通常用于对 BMPs 成骨诱导能力的一种功能分析。

2.2 BMPs 和胚胎骨骼

过去几十年的研究证实了 BMPs 在骨骼细胞定型及分化中的作用。原位杂交证实发育中的胚胎含有 BMP-2 到 BMP-7 以及 GDF-5 到 GDF-7 转录本。而胚胎中转录本出现的时间和地点与其参与间充质成熟和软骨分化密切相关。虽然一些特定位置调控 BMPs 表达的上游信号仍然未知, 研究表明 BMPs, 成纤维细胞生长因子 (FGFs) 和 sonic hedgehog (SHH) 相互间以一种级联的模式调控。

人们在外胚脊的尖端和极化活性区发现了 BMP-2 和 4 的表达, 而这两区是参与肢端塑模的重要信号中心。BMP-2/4 基因敲除小鼠在胚胎肢端塑模发生前即死亡, 说明 BMP-2 缺陷小鼠存在羊膜/绒毛膜和心脏发育缺陷, 不可存活。BMP-2/4 在胚胎发育早期的其他作用仍然有待进一步研究。有可能 BMP-2/4, 不同于其他 BMPs (如 BMP-7 敲除小鼠只表现为轻微的骨骼畸形) 其作用不能被代偿。可能与 BMP-4 在肺组织发育中的部分作用有关。然而由于我们还不了解 BMP-2/4s 的所有功能, 其它可能仍然存在。无数的临床试验已经证实 BMP-2 可以促进骨和软骨的生长。因此我们可以推测如果其它 BMPs 无法替代 BMP-2, 那它在胚胎期骨诱导以及间充质细胞分化中一定起着十分重要的作用。值得一提的是如果在骨诱导中没有软骨前体的存在, 生命就不会产生。这是因为我们出生时绝大多数重要器官都被骨或者软骨保护着。没有这些结构保护因素, 我们的重要器官将无法

抵御任何形式的创伤，将会发生无数的出生缺陷。但这也无法完全解释为什么 BMP-2/4 敲除小鼠会在出生前死亡。

BMP-3 是骨基质中含量最多的一种 BMP，并被认为是 BMP-2 活性的拮抗剂。其机理可能与激活素受体途径有关。BMP-3 敲除小鼠表现为骨密度增加及骨小梁含量的增加。因此 BMP-3 可能在适当的时间和位置参与阻止骨的继续生长。BMP-5 存在于其它位置，但其缺失不会导致明显的异常，可能是由于其它 BMPs 的代偿作用。BMP-6 参与软骨细胞肥大及软骨内成骨，但 BMP-6 敲除小鼠出生时没有明显异常。BMP-7 存在于肢芽早期，而其敲除小鼠出生后能够存活，仅带有轻微的骨骼异常。BMP-7 也是胚胎肾发生的一个诱导因素，并参与眼发育以及骨骼塑模^{27, 28}。它可以被其它 BMPs 代偿，例如 BMP-2/4²⁹，这表明在骨骼发育过程中各种 BMP 的作用之间可能有所重复。GDF-5 (BMP-14) 敲除小鼠表现为长骨明显短缩，指（趾）数目减少以及前后肢骨骼畸形^{31, 32}。GDF-5 通常在这些畸形和异常发生处表达。因此它很可能参与骨间关节的形态发生，以及保证间充质组织的大小和形状，人类 GDF-5 发生基因突变时观察到关节发育异常^{33, 34, 35}。GDF-11 可能参与中轴骨以及上腭的发育。缺乏 GDF-11 的小鼠表现为胸椎和腰椎的过多生长，以及尾巴完全缺失³⁶。GDF-11 可能是骨发育过程中的负性调控因子，抑制软骨形成和肌形成。在鸡肢发育过程中异位应用 GDF-11 可以导致肢短缩³⁷。

2.3 BMPs 与骨骼重塑

胚胎发育过程决定了各种骨骼的形状和位置。而成人骨骼在系统和局部信号以及机械刺激下，不断的进行自我更新，即骨骼重塑。这一过程需要成骨细胞和破骨细胞从骨髓及其前体细胞中分化出来³⁸，而 BMPs 是诱导这一分化的局部信号。成骨细胞在体内和体外均能合成和分泌 BMP，这表明 BMPs 能够促发间充质干细胞的分化并形成一正反馈环路从而促使其它 BMP 信号的产生。当在大鼠及兔骨片断缺损模型中应用人类重组骨形态发生蛋白 2 (rhBMP-2) 后，它可以诱导软骨内骨化，从而形成骨。BMPs 的拮抗剂如 noggin 和 gremlin 也存在于骨中，提示局部组织对间充质干细胞激活以及分化的调控作用^{41, 42}。据认为 BMP-1 可能与胶原基质的 BMPs 释放有关，从而为特异位点的重塑提供一种外源性 BMPs⁴³。因为 BMPs 可以调节几种成骨细胞特异性转录因子的转录，所以骨重塑的骨形成和骨吸收过程可能是通过 BMPs 相互联系的⁴⁴。

3. BMPs 的治疗性应用

3.1 BMPs 基质及载体

BMPs 在特异位点的导入需要基质和载体。载体的应用不仅是为了控制 BMPs 在特异位点的分布，也是为了确保 BMPs 在体内存活到细胞发生作用。基质和载体也可以用于确定所诱导新骨的形状和大小以适应特定的治疗性需要。基质或载体可以由许多材料组成，例如胶原，透明质酸，同种异体骨，磷酸钙，羟磷灰石/三磷酸钙复合物或者合成材料如多聚粘多糖类 (polylactide)^{45, 46, 47, 48}。

3.2 骨科应用

BMPs 在骨科中主要应用于骨折的修复，如治疗骨折的不完全愈合或加速单纯性骨折的愈合。它们也用于治疗大段的骨缺损，以及需要大量新生骨的脊柱融合治疗。大量的动物研究已经证实 BMP-2 能够加速家兔，羊和狗模型中骨折的愈合，结果显示 BMP-2 可以使愈合时间缩短 30-50%，骨痂形成增加并且加速骨痂成熟^{45, 46, 47, 48}。一些临床试验表明 BMP-2 有助于胫骨骨不连和急性胫骨骨折的治疗⁴⁹。BMP-2 能治疗大鼠，狗，兔和猴的大片断骨缺损⁵⁰。以影像学，机械力学，以及组织学标准来判断，rhBMP-2 在前临床动物脊柱融合（体间和横突间）模型中的应用已经成功^{51, 52, 53, 54, 55}。这些研究证实 rhBMP 在脊柱融合中的应用效果至少相当于，甚至优于目前的自体骨移植技术⁵⁶。

3.3 牙科应用

近年来在牙科领域需要再生骨用于牙移植术和修复术，如拔牙后牙床的填充，牙周病中牙槽骨的缺失。前临床试验证实了BMPs在顎片断缺损动物模型中的骨诱导作用^{57, 58}。在羊，狗，猴和人模型中，rhBMP-2能够增加上颌骨和腭骨的形成^{59, 60, 61, 62}。所有新形成的骨均具有原位骨的功能，可支持牙移植。

3.4 基因治疗

将BMPs合成基因导入细胞使其在局部长期释放BMPs是BMPs基因治疗的主要目的。因为在治疗骨折愈合/骨诱导中只需要BMPs短期存在，所以BMPs的基因治疗要防止BMPs在局部组织中的过度表达及引起的并发症。在动物模型中，利用携带BMP-2基因的腺病毒载体已显示出其促进骨折愈合以及脊柱融合的功效^{63, 64, 65, 66, 67}。携带BMP的腺病毒载体的间充质细胞可以诱导新骨形成，并且修复骨和软骨缺损^{68, 69, 70, 71}。在大鼠模型中的直接应用含BMP基因的DNA构建亦可以加强长骨缺损的修复⁷²。

3.5 其它

rhBMP-2能够抑制血管平滑肌细胞增殖，同时减少细胞外基质的合成，表明其可以用于治疗血管增生性疾病⁷³。目前认为BMP-6是一种对大脑和肌肉组织具有保护作用的物质，在缺血性大鼠模型中，BMP-6可以减少心脏和脑梗塞的面积⁷⁴。在将来BMP-6很可能作为一种保护剂用于严重的脑创伤和脑卒中的治疗。在患有慢性肾脏疾病的病人，BMPs水平下降，因为在成人肾脏是BMPs的主要来源，而肾性骨营养不良多发生在晚期肾疾病长期透析的病例，所以给患有慢性肾脏衰竭的病人系统性注射BMPs有可能恢复部分肾脏功能⁷⁴。

4. BMPs 应用中的潜在危险

由于BMPs天然存在于体内，所以它可以被耐受，而且其只能以微量存在于体内，因此BMPs的使用剂量必须认真研究。在大鼠和兔模型的毒理研究中，应用1,000倍剂量的rhBMP-2后，机体未产生任何系统性反应。可是有事实表明BMP-4过表达与纤维发育不良（FOP fibrodysplasia ossificans progressiva）中的异位骨化有关⁷⁵。最近的研究表明在FOP中BMP-4 mRNA水平的增加是由于BMP-4基因转录速率的增加⁷⁵。这一现象可能与BMP-4基因本身突变或其它基因位点的突变导致FOP病人BMP-4的过表达有关。因此，BMP-4过表达与一种致残疾病有关，那么很可能在较小范围内大剂量应用BMP-4也会引起类似的反应。目前用rhBMP-2治疗开放性胫骨骨折的推荐剂量在6毫克到12毫克之间⁴⁹。而据估计每千克研磨过的骨含有大约0.002毫克BMPs。尽管由于损伤骨以及炎症细胞的释放，骨折部位的BMPs浓度可能会更高，但与正常骨相比骨折部位BMPs的准确浓度仍然未知。但这意味目前的推荐剂量大约是正常骨折愈合时BMPs数量的1000倍以上。以每毫克rhBMP-2的市场价格大约为1000磅（2003年）来看，使用推荐剂量在经济上的可行性存在疑问。

尽管BMPs是人类蛋白，但重组蛋白仍然有可能会引发机体的免疫反应。反复应用会增加这种可能性。虽然这种潜在危险的程度仍然未知，FDA很关注潜在的免疫反应对胚胎发育的副作用以及母体免疫反应。一项研究表明应用BMPs后动物血清抗BMPs抗体显著上升，六周后恢复正常⁷⁶。以前的研究发现除noggin和gremlin外，还有一些分子可以抑制BMPs的成骨诱导活性。Fumagillin的合成类似物，TNP-470，是一种很强的体内血管形成的拮抗剂。在成骨诱导早期，TNP-470可以反向抑制rhBMP-2的生物学活性，这表明血管发生可能与一些细胞的募集有关，这些细胞是能与rhBMP-2反应的BMP受体阳性细胞，并且可以分化成软骨细胞和/或成骨细胞⁷⁷。据此可以推测TNP-470样分子可能会对BMPs产生短暂的抑制作用，从而降低BMPs的有效性，这就增加了BMPs对诱导骨发生的迟发性作用的不确定性⁷⁷。

其它存在的问题包括BMPs可能会引发骨肿瘤。这是因为有研究发现BMPs在骨肉瘤中含量偏高⁷⁴。尽管一些肿瘤表达BMP-2及其受体，肿瘤生物学上并尚未证实rhBMP-2能够引

发肿瘤。体外试验未发现任何细胞毒性或致突变活性，对于应用 rhBMP-2 后的毒性研究也未发现任何异常细胞生物学证据。对 51 株肿瘤细胞系的体外测试发现 rhBMP-2 只引起三种细胞系的生长加速（胰腺两例，前列腺一例），其余未发现任何作用。然而对 BMPs 致癌性的前临床试验仍不足以揭示这种蛋白质在肿瘤发生中的作用⁷⁴。另一个问题是如果没有合适的载体，BMPs 可能会渗漏到其它部位，引发异位成骨。如果发生在关节囊，异位骨形成可能会损害关节的活动性，进一步导致功能丧失或者恶变；如果是在肝脏或是肾脏，则会导致更为严重的代谢紊乱和干扰肾功能。但由于渗漏的 rhBMP-2 一般会被迅速从体内清除，从而保证了系统只暴露于最微量的 rhBMP-2⁷⁴。

5. 结论

尽管 100 多年前人类偶然发现了 BMPs，但对于它们的认识还处于起步阶段，许多功能还不是很清楚。我们应用转基因动物模型和动物/人类试验来研究 BMP 的正性和负性作用。我们需要对 rhBMPs 开展大量的研究工作以确保其临床的安全应用。另外的担忧则是 BMPs 可能有潜在的负作用，而且造价昂贵。目前正在进行许多有关 BMPs 信号途径的研究，希望能发现一种体积更小但更高效，造价低廉且容易应用的分子。伴随其临床的应用，所以的一切最终将归结为一场赞成者和反对者的辩论，以及对于利弊的权衡。尽管 BMPs 在临床上具有潜在的治疗性应用价值，rhBMPs 应用对于人体的长期作用仍需要进一步的研究。

参考文献

1. N. Senn, *Am. J. Med. Sci.*, 98 (1889).
2. G. Levander, *Acta. Chir. Scand.*, 74 (1934).
3. G. Levander G, *Surg. Gynecol. Obstet.*, 67 (1938).
4. W. J. Sharrard and D. H. Collins, *Proc. Roy. Soc. Med.*, 54 (1961).
5. R. D. Ray and J. A. Holloway, *J. Bone Joint Surg. Am.*, 39 (1957).
6. M. R. Urist, *Science*, 150 (1965).
7. T. K. Sampath and A. H. Reddi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 78 (1981).
8. E. E. Johnson, M. R. Urist and G. A. Finerman, *Clin. Orthop.*, 277 (1992).
9. A. T. Dudley, K. M. Lyons and E. J. Robertson, *Genes Dev.*, 9 (1995).
10. T. Sakou, *Bone*, 22 (1998).
11. J. Connors, (Springer-Verlag, Berlin, 1983), p.20-39.
12. R. Smith and J. T. Triffitt, *Q. J. Med.*, 61 (1986).
13. M. R. Urist, R. J. DeLange and G. A. Finerman, *Science*; 220 (1983).
14. A. I. Caplan in *Cell and Molecular Biology of Vertebrate Hard Tissues*, Ed. A. I. Caplan and D. G. Pechak (Ciba Foundation Symposium, 1988), p.3-21.
15. A. H. Reddi and K. E. Kuettner, *Dev. Biol.*, 82 (1981).
16. L. W. Gamer and V. Rosen, in *Osteoporosis: Genetics, Prevention and Treatment*, Ed. J. Adams and B. Lukert (Kluwer Academic, New York, 2000), p.7-23.
17. M. J. Bitgood and A. P. McMahon, *Dev. Biol.*, 172 (1995).
18. E. Laufer, C. E. Nelson, R. L. Johnson, B. A. Morgan and C. Tabin, *Cell*, 79 (1994).
19. L. Niswander and G. R. Martin, *Nature*, 361(1993).
20. K. M. Lyons, R. W. Pelton and B. L. M. Hogan, *Development*, 109 (1990).
21. G. Winnier, M. Blessing, P. A. Labosky and B. L. M. Hogan, *Genes Dev.*, 9 (1995).
22. H. Zhang and A. Bradley, *Development*, 122 (1996).
23. J. A. King, P. C. Marker, K. J. Seung and D. M. Kingsley, *Dev. Biol.*, 166 (1994).
24. D. M. Kingsley, A. E. Bland, J. M. Grubber, P. C. Marker, L. B. Russel, N. G. Copeland and N. A. Jenkins, *Cell*, 71 (1992).
25. A. Vortkamp, K. Lee, B. Lanske, G. V. Segre, H. M. Kronenberg and C. J. Tabin, *Science*, 273 (1996).
26. M. J. Solloway, A. T. Dudley, E. K. Bikoff, K. M. Lyons, B. L. Hogan and E. J. Robertson, *Dev. Genet.*, 22 (1998).

27. A. J. Dudley, K. M. Lyons and E. J. Robertson, *Genes Dev.*, 9 (1995).
28. G. Luo, C. Hofmann, A. L. J. J. Bronkers, M. Sohocki, A. Bradley and G. Karsenty, *Genes Dev.*, 9 (1995).
29. A. J. Dudley and E. J. Robertson, *Dev. Dyn.*, 208 (1997).
30. S. E. Yi, A. Daluski, R. Pederson, V. Rosen and K. M. Lyons, *Development*, 127 (2000).
31. H. Grunberg and A. J. Lee, *J. Embryol. Exp. Morphol.*, 30 (1973).
32. E. E. Storm, T. V. Huynh, N. A. Copeland, D. M. Kingsley and S. J. Lee, *Nature*, 386 (1994).
33. A. Polinkovsky, N. H. Robin, J. T. Thomas, M. Irons, A. Lynn, F. R. Goodman, W. Reardon, S. G. Kant, H. G. Brunner and I. van der Burgt, et al., *Nature Genet.*, 17 (1997).
34. J. T. Thomas, M. W. Kilpatrick, K. Lin, L. Erlacher, P. Lemessis, T. Costa, P. Tshipouras, and F. P. Lutyen, *Nature Genet.*, 17 (1997).
35. M. Weinstein, X. Yang and C. X. Deng, *Cytokine Growth Fac. Rev.*, 11 (2000).
36. A. C. McPherson, M. Lawler and S. J. Lee, *Nature Genet.*, 22 (1999).
37. L. W. Gamer and V. Rosen in *Osteoporosis: Genetics, Prevention and Treatment*, Ed. J. Adams and B. Lukert (Kluwer Academic, New York, 2000), p.7-23.
38. S. C. Manolagas and R. L. Jilka, *N. Engl. J. Med.*, 332 (1995).
39. E. Abe, M. Yamamoto, Y. Taguchi, B. Lecka-Czernick, C. A. O'Brien, A. N. Economides, N. Stahl, R. L. Jilka and S. C. Manolagas, *J. Bone Miner. Res.*, 15 (2000).
40. S. C. Manolagas and R. S. Weinstein, *J. Bone Miner. Res.*, 14 (1999).
41. E. Gazzarro, V. Ganji and E. Canalis, *J. Clin. Invest.*, 102 (1998).
42. R. C. Pereira, A. N. Economides and E. Canalis, *Endocrinology*, 141 (2000).
43. F. C. Wardle, L. M. Angerer, R. C. Angerer and L. Dale, *Dev. Biol.*, 206 (1999).
44. S. C. Manolagas and R. S. Weinstein, *J. Bone Miner. Res.*, 14 (1999).
45. M. L. Bouxsein, T. J. Turek, C. Blake, D. D'Augusta, H. Seeherman, and J. Wozney, *Trans. Orthop. Res. Soc.*, 24 (1999).
46. L. S. Popich, S. L. Salkeld, D. C. Rueger, M. Tucker and S. D. Cook, *Trans. Orthop. Res. Soc.*, 22 (1997).
47. T. J. Turek, M. P. G. Bostrum, N. Camacho, C. A. Blake, R. Palmer, H. Seeherman and J. Wozney, *Trans. Orthop. Res. Soc.*, 22 (1997).
48. R. D. Welch, A. L. Jones, R. W. Bucholz, C. M. Reinert, J. S. Tija, W. A. Pierce, J. M. Wozney and X. J. Li, *J. Bone Miner. Res.*, 13 (1998).
49. S. Govender, C. Csimma, H. K. Genant and A. Valentin-Opran, *J. Bone Joint Surg.*, 84 (2002).
50. V. Rosen and J. M. Wozney in *Skeletal Growth Factors*, Ed. E. Canalis (Lippincott and Williams and Wilkens, Philadelphia, 2000), p. 299-310.
51. S.D. Boden, P. A. Moskovitz, M. A. Morone and Y. Toribitake, *Spine*, 21 (1996).
52. S. M. David, H. E. Gruber, R. A. J. Meyer, T. Murakami, O. B. Tabor, B. A. Howard, J. M. Wozney and E. N. J. Hanley, *Spine*, 24 (1999).
53. H. S. Sandhu, L. E. Kanim, J. M. Kabo, E. N. Zeegan, D. Lui, L. L. Seeger and E. G. Dawson, *Spine*, 20 (1995).
54. H. S. Sandhu, L. E. Kanim, J. M. Kabo, E. N. Zeegan, D. Lui, R. B. Delamarter and E. G. Dawson, *Spine*, 21 (1996).
55. J. H. Schimandle, S. D. Boden and W. C. Hutton, *Spine*, 20 (1995).
56. S. D. Boden, T. A. Zdeblick, H. S. Sandhu and S. E. Heim, *Spine*, 25 (2000).
57. P. J. Boyne, *Bone*, 19 (1996).
58. D. M. Toruimi, H. S. Kotler, D. P. Luxenberg, M. E. Holtrop and E. A. Wang, *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.*, 117 (1991).
59. O. Hanisch, D. N. Tatakis, M. M. Boslovic, M. D. Rohrer and U. M. E. Wilkesjo, *Int. J. Oral Maxillofac. Implants*, 12 (1997).
60. M. D. Margolin, A. G. Cogan, M. Taylor, D. Buck, T. N. McAllister, C. Toth and B. S. McAllister, *J. Periodontol.*, 69 (1998).
61. B. S. McAllister, M. D. Margolin, A. G. Cogan, M. Taylor and J. Wollins, *Int. J. Periodontol. Restorat. Dent.*, 18 (1998).
62. M. Nevins, C. Kirker-Head, J. M. Wozney, R. Palmer and D. Graham, *Int. J. Periodontol. Restorat. Dent.*, 16 (1996).
63. T. D. Alden, D. D. Pittman, E. J. Beres, G. R. Hankins, D. F. Kallmes, B. M. Wisotsky, K. M. Kerns and G. A. Helm, *J. Neurosurg.*, 90 (1999).
64. A. W. Baltzer, C. Lattermann, J. D. Whalen, P. Wooley, K. Weiss, M. Grimm, S. C. Ghivizzani, P. D. Robbins and C. H. Evans, *Gene Ther.*, 7 (2000).

65. R. T. Franceschi, D. Wang, P. H. Krebsback and R. B. Rutherford, *J. Cell Biochem.*, 78 (2000).
66. G. A. Helm, T. D. Alden, E. J. Beres, S. B. Hudson, S. Das, J. A. Engh, D. D. Pittmann, K. M. Kerns and D. F. Kallmes, *J. Neurosurg.*, 92 (2000).
67. D. S. Musgrave, P. Bosch, S. Ghivizzani, P. D. Robbins, C. H. Evans and J. Huard, *J. Bone Miner. Res.*, 9 (1999).
68. J. R. Lieberman, L. Q. Le, L. Wu, G. A. Finerman, A. Berk, O. N. Wite and S. Stevenson, *J. Orthop. Res.*, 16 (1998).
69. J. R. Lieberman, A. Daluiski, S. Stevenson, L. Wu, P. McAllister, Y. P. Lee, J. M. Kabo, G. A. Finerman, A. J. Berk and O. N. Witte, *J. Bone Joint Surg. Am.*, 81 (1999).
70. J. M. Mason, A. S. Breitbart, M. Barcia, D. Porti, R. G. Pergolizzi and D. A. Grandle, *Clin. Orthop.*, 414 (2000).
71. K. D. Riew, N. M. Wright, S. Cheng, L. V. Avioli and J. Lou, *Calcif. Tissue Int.*, 63 (1998).
72. J. M. Fang, Y. Y. Zhu, E. Smiley, J. Bonadio, J. P. Rouleau, S. A. Goldstein, L. K. McCauley, B. L. Davidson and B. J. Roessler, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93 (1996).
73. T. Nakaoka, K. Gonda, T. Ogita, Y. Otawara-Hamamoto, F. Okabe, Y. Kira, K. Harii, K. Miyazono, Y. Takuwa and T. Fujita, *J. Clin. Invest.*, 100 (1997).
74. K. Azari, B. A. Doll, C. Sfeir, et al., *Expert Opin. Investig. Drugs*, 10 (2001).
75. T. K. Sampath, K. E. Rashka, J. S. Doctor, et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 90 (1993)
76. V. V. Viljanen, T. J. Gao, T. C. Lindholm, T. S. Lindholm, B. Kommonen, *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.*, 25 (1996).
77. S. Mori, H. Yoshikawa, J. Hashimoto, T. Ueda, H. Funai, M. Kato and K. Takaoka K, *Bone*, 22 (1998).