

综述

胸椎黄韧带骨化易感基因及蛋白质组学研究进展

Advances on genetic and proteomic research of thoracic ossification of ligamentum flavum

杨晓曦, 陈仲强

(北京大学第三医院骨科 100191 北京市)

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2018.06.11

中图分类号: R681.5 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2018)-06-0562-05

黄韧带骨化 (ossification of the ligamentum flavum, OLF) 系脊柱韧带病理性异位骨化性疾病之一, 全脊柱颈椎、胸椎和腰椎黄韧带附着部位均可发生, 其中以胸椎尤其是下胸段最为常见^[1]。脊柱 OLF 及后纵韧带骨化 (ossification of the posterior longitudinal ligament, OPLL) 是导致脊柱椎管狭窄、脊髓受压的常见原因, 严重危害患者运动神经功能^[2]。

脊柱韧带的解剖特征、局部生物应力刺激、微循环炎症免疫反应、内分泌与遗传等因素均与脊柱黄韧带骨化的发生密切相关^[3,4]。病理学上, 将 OLF、OPLL 和弥漫性特发性骨肥厚症 (diffuse idiopathic skeletal hyperostosis, DISH) 共同称为脊柱韧带骨化性疾病 (ossification of the spinal ligament, OSL)。OLF 早期病理改变为弹性纤维减少, 胶原纤维大量增生发生黏液样变, 成纤维细胞向软骨细胞分化, 随着软骨内新生血管长入和钙盐基质沉积, 逐渐形成成熟的骨组织^[5]。流行病学研究资料显示, OLF 具有明显的种族差异及性别差异, 具有家族性倾向^[6,7]。胸椎 OLF 多发生于东亚人种^[8,9], 以日本、韩国和中国等国家多见。

临床上, 由于胸椎 OLF 早期未压迫脊髓时可无明显症状, 而早期压迫也常表现为下肢乏力、间歇性跛行、腰背部疼痛或并发下肢疼痛, 其起病隐匿, 一旦出现胸脊髓压迫运动神经功能严重损害时, 致瘫率极高^[2]。对于胸椎 OLF 引起的胸椎椎管狭窄的治疗, 手术减压是目前唯一有效的治疗方法, 目前尚无有效的非手术治疗方法 and 早期筛查诊断手段。胸椎 OLF 的发病机制尚不清楚, 单一因素难以充分解释其骨化发生机制^[10]。因此, 胸椎 OLF 的发病机制是多种混合因素作用下的结果, 其中易感基因及相关蛋白质因子可能在发病过程中起到了重要作用, 针对这些易感基因和关键蛋白质分子的筛查和靶向治疗药物, 将有助于临床医生对患者患病风险的评估, 为胸椎 OLF 的诊断和治

疗提供新的思路。

目前对于 OLF 的发病机制研究主要集中于功能基因组的研究, 通过基因芯片及基因表达测序分析, 从细胞中 mRNA 角度解释其潜在的分子机制, 而蛋白质组学研究可通过高通量蛋白质鉴定分析技术, 从基因翻译后修饰及蛋白质相互作用中阐述其发生机制^[11,12]。对于胸椎 OLF 易感基因及蛋白质组学的研究, 有助于认识胸椎 OLF 的骨化规律, 评估其严重程度以及病程进展。现将该病相关基因及蛋白质组学研究进展进行综述。

1 胸椎 OLF 易感基因研究

研究发现脊柱韧带骨化性疾病 OLF 在亚洲人群中的发病率具有明确的家族倾向性, 研究证实易感基因可能在其发病过程中起着重要作用^[13,14]。人类基因组 DNA 特定位置单个核苷酸替换引起的 DNA 多态性——单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphisms, SNP), 因其广泛存在于人类基因组中, 具有遗传稳定性强、易于基因分型和快速自动化分析等特点, 近年来已作为疾病遗传因素和易感基因研究的重要方法, 并广泛应用于生物医学领域^[15,16]。

1.1 骨形态发生蛋白

骨形态发生蛋白 (bone morphogenetic protein, BMP) 是目前已知可独立参与异位骨化的多功能生长因子^[17,18]。其中可能与脊柱韧带骨化相关的基因主要为 BMP-2、BMP-4 和 BMP-7 等亚型^[19]。

为了阐明黄韧带骨化的发病机制, Hayashi 等^[20]通过免疫组织化学染色方法检测了 OLF 患者黄韧带中 BMPs 及其受体 (BMPRs) 的表达和定位。发现骨形态发生蛋白广泛存在于成熟和未成熟的软骨细胞周围钙化区和纺锤体形细胞和圆形细胞远离骨化区。BMPRs, BMP-2/-4 和成骨蛋白-1 (OP-1)/BMP-7 的配体在 OLF 患者中都存在共定位, 提示 BMPs 可能参与促进 OLF 异位骨化部位软骨内骨化, 且骨化活性持续存在。Ning 等^[21]在研究机械应力对胸椎 OLF 作用时发现机械应力能显著促进胸椎黄韧带细胞 BMP-2 的表达。Hou 等^[22]研究发现载有重组人 rh-BMP-2 的 I 型胶原可以诱导大鼠与临床相似的 OLF, 且组蛋白 3

第一作者简介: 男 (1985-), 博士研究生, 研究方向: 脊柱外科

电话: (010)82267011 Email: xiaoximd@hotmail.com

通讯作者: 陈仲强 E-mail: puh3_czq@bjmu.edu.cn

(Histone 3, H3) 修饰 (H3K9ac, H3K18ac, H3K4me3 和 H3K36me3) 可能参与其黄韧带骨化的过程。还有学者^[23]将 BMP-2 基因经腺病毒介导转染后的黄韧带细胞也可诱导新生骨形成。Qu 等^[13]基于全基因组外显子组测序的研究筛选出胸椎 OLF 患者存在的新突变位点基因, 并通过生物信息学方法对 5 个 BMP-2 变异位点的保守性及对基因的影响进行分析预测发现, BMP-2 基因外显子区域 3 个常见 SNP (RS2273073, RS1049007 和 RS235768) 在中国北方汉族人群和日本人群中的频率明显高于欧美人群。同时, 在两个新发现变异 (R154G 和 R194M) 转染胸椎黄韧带细胞中, BMP-2 在基础培养基和成骨诱导培养基中均显著表达, 而 S37A 和 R190S 转染胸椎黄韧带细胞中, BMP-2 在成骨诱导培养中的表达也显著增高。该研究还提示 BMP-2 外显子区域的常见 SNP 位点与中国汉族北方人群 OLF 发病相关, 且与长节段 OLF 患者的关联性更强。综上, 有单核苷酸变化引起的 BMP-2 表达上调可能是影响 OLF 患者胸椎黄韧带细胞成骨分化的机制之一。

位于 14q22-q23 上的 BMP-4 基因在诱导成骨分化中起着重要作用。国内学者研究^[24]发现 OLF 患者 BMP-4 的 RS17563 和 RS2855532 两个 SNP 位点带“T”基因型和等位基因型频率显著高于正常人, 其中 RS17563 是唯一位于编码区域的 SNP 位点, 说明 BMP-4 基因突变与 OLF 的发生密切相关。

1.2 胶原蛋白

Ⅵ型胶原是一种具有细胞因子活性的细胞外基质纤维蛋白, 可促进细胞分化增殖, 与成骨分化密切相关^[25, 26]。Ⅵ型胶原由 $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 和 $\alpha 3$ 三条链组成, 其中位于 21p22.3 的编码Ⅵ型胶原蛋白 $\alpha 1$ 肽链的 COL6A1 基因在 OLF 中具有重要作用。为了确定 COL6A1 多态性是否与中国汉族人群中 OLF 和 OPLL 的易感性相关, Kong 等^[14]通过 GenomeLab SNPstream 高通量基因分型系统对 338 名中国汉族人群的 COL6A1 基因 4 个已知 SNP 进行基因分型。应用卡方检验比较各基因多态性的等位基因频率和基因型分布。在所研究的 4 个 SNP 中, 启动子 (-572T) SNP 的等位基因频率在 OLF 病例组与对照组之间存在显著差异。此外, 由启动子 (-572), 内含子 32 (-29) 和内含子 33 (+20) SNPs 构建的单体型的总体频率在 OLF 患者和对照组中存在显著差异, 提示 COL6A1 的 SNP 可能是中国汉族人群 OLF 的常见易感基因。

除Ⅵ型胶原外, I 型和Ⅲ型胶原在黄韧带增生中也起着重要作用。国内学者 Xu 等^[27]对 10 例腰椎黄韧带肥厚患者和 10 例对照的腰椎黄韧带组织进行 miRNA 微阵列筛选。发现了 18 个存在表达差异的 miRNA。经 qRT-PCR 确认后, 患者的腰椎黄韧带中的 miR-221 显著低于对照组。该研究通过生物信息学检测还发现基质金属蛋白酶 (tissue inhibitor of matrix metalloproteinase 2, TIMP 2) 的组织抑制物为 miR-221 的假定靶标。此外, 荧光素酶报告基因检测证明, miR-221 直接靶向作用 TIMP-2 并影响从

腰椎黄韧带成纤维细胞中 TIMP-2 的蛋白质表达。而在从腰椎黄韧带分离的成纤维细胞中, miR-221 模拟物降低了 I 型和Ⅲ型胶原的 mRNA 和蛋白质表达。而 Chen 等^[28]研究发现 miR-155 可促进黄韧带成纤维细胞 I 型和Ⅲ型胶原的表达, 肥厚黄韧带组织中 miR-155 表达上调, 且与黄韧带纤维化程度相关。这些研究均表面 I 型和Ⅲ型胶原的基因参与 OLF 的发生。

1.3 RUNX2 基因

Runt 相关转录因子 (RUNX2) 位于 6p21 区域, 是 RUNX 转录因子家族中参与成骨细胞分化所必需的关键因子。RUNX2 可通过促进骨细胞外基质蛋白合成调节向成骨细胞分化, 促进软骨细胞和软骨内血管分化, 在骨组织形成和分化中起着重要作用^[29, 30]。国内学者^[31]研究发现中国汉族人群中 OLF 患者 6 号染色体上 RUNX2 的 RS1321075 和 RS12333172 的单核苷酸多态性基因型中的 1 个位点单倍体分型与正常人有显著差异, 与颈椎 OLF 的发病均密切相关。

RUNX2, BMP-2, COL6A1 和维生素 D 受体 (vitamin D receptor, VDR) 是可能与脊髓韧带骨化有关的四个基因。大多数亚洲人群的 OLF 已有报道^[13, 14, 31], 但这些基因的多态性位点可能在不同种族的人群中有所不同。为明确中国汉族人 OLF 基因的多态性位点, 以及与这些疾病相关的鉴定位点, Chang 等^[32]通过 Sequenom 系统分析了 200 名汉族人中 4 个 OLF 四种基因 (RUNX2, BMP-2, COL6A1 和 VDR) 的 19 个 SNP, 研究发现 RUNX2 中的 RS1321075 和 RS12333172 在患者和对照受试者之间存在显著差异。这两个位点都位于 6 号染色体上, 呈现连锁不平衡。该两个区域之一是单体型, 提示了 RUNX2 与 OLF 发病率之间的联系。

1.4 成纤维细胞生长因子

成纤维细胞生长因子 (fibroblast growth factor, FGF) 及其 FGFR 受体可通过不同信号在骨细胞增殖、分化和凋亡中起着重要作用。其中, 位于 4 号染色体 (4q25-q27) 的 FGF2 是骨和软骨分化的重要调节因子^[33, 34]。为明确本 FGF2 基因和 FGFR 基因的 SNP 是否与脊柱韧带骨化相关, Jun 等^[35]纳入总共 157 例脊柱韧带骨化患者和 222 名对照者, 进行 FGF2、FGFR1、FGFR2 和 SNP 之间关系的病例对照研究。为了鉴定 FGF2 基因、FGFR1、FGFR2 基因和脊柱韧带骨化多态性之间的关联, 该研究对 9 个 SNP (FGF2: RS1476217, RS308395, RS308397 和 RS3747676; FGFR1: RS13317 和 RS2467531; FGFR2: RS755793, RS1047100 和 RS 3135831) 进行直接测序, 发现在这些 SNP 中, FGF2 基因中的 RS1476217 与 OLF 密切相关。

1.5 人类白细胞抗原

人类白细胞抗原 (human leukocyte antigen, HLA) 系统是迄今发现最具有多肽性的抗原系统, 位于人类第六号染色体 6p21.3 区域。为了评估 OLF 的遗传背景, 国内学者采用聚合酶链式反应/序列特异引物 (PCR-SSP) 法对 30

例 OLF 患者和 51 例对照组进行 HLA-DQA1 等位基因的基因分型进行对比分析,发现 HLA-DQA1 对于 OLF 具有易感和负性调节共同作用,其中 HLA-DQA1-0401 与其易感性密切相关,而 HLA-DQA1-0201 却与其负性调节相关,提示 HLA-DQA1 的 SNP 突变位点也是引起 OLF 的重要机制之一^[36]。

1.6 其他相关基因

Notch 蛋白是广泛存在于细胞表面介导细胞信号转导的受体蛋白,该信号通路是决定骨髓间充质干细胞成骨分化的重要因素^[37]。Qu 等^[38]研究发现人胸椎黄韧带细胞成骨诱导后,Notch 信号通路关键信号分子 Notch2、Jagged1 和 HES1 表达显著增高。将携带 Notch2-shRNA 慢病毒载体转染入黄韧带细胞后,经成骨诱导培养发现转染慢病毒载体的黄韧带细胞 ALP、RUNX2、Osterix、OCN 以及 OPN 的表达均显著降低。而将 Notch2 胞内结合域(Notch intracellular domain, N2ICD) 过表达片段的慢病毒载体转染如黄韧带细胞后,成骨标志物的表达水平均明显增高,提示 Notch 信号通路关键基因 Notch2 与 OLF 密切相关。进一步研究^[39]发现其作用机制可能为 miRNA-199b-5p 结合 Jagged1 3'-UTR 端,通过靶向调控 Jagged1 来影响 Notch 信号通路,抑制其成骨分化作用。另一项研究中,Qu 等^[40]还发现 miR-132-3p 分别可与叉头转录因子(forkhead box O1, FOXO1)、生长分化因子(growth differentiation factor 5, GDF5) 和 SOX6 3'-UTR 端结合来抑制黄韧带细胞成骨分化。根据上述 miRNA 结合位点,进一步相关基因分析研究将有助于发现 OLF 易感基因,阐明其发病机制。其他学者^[41]还发现在人黄韧带细胞的成骨分化过程中检测到 miR-615-3p 的表达。通过利用单链 miR-615-3p 模拟物和抑制剂发现 miR-615-3p 可以负向调节黄韧带细胞的成骨分化,同时生物信息学分析显示,miR-615-3p 直接靶向作用 FOXO1 和 GDF5 的 3'-UTR 端抑制 FOXO1 的表达,表明 miR-615-3p 通过转录后抑制成骨调节剂 GDF5 和 FOXO1 负向调节黄韧带细胞的成骨分化。

2 胸椎 OLF 蛋白质组学研究

脊柱韧带骨化相关基因转录水平的研究在一定程度上反映了基因表达产物的变化,而脊柱韧带骨化病因不明,基因表达水平难以充分阐明其骨化机制,而蛋白质转录翻译后修饰机制复杂,从蛋白质间相互作用和整体水平可进一步发现脊柱韧带骨化的病理生理机制。

蛋白质组学的特点主要通过采用高通量、高分辨率的蛋白质分离手段结合高通量的蛋白质分析鉴定技术,结合质谱分析和 GO 分析技术,尤其是对一些低丰度和小分子量的蛋白质,可在特定条件下对参与生物进程动态变化的蛋白质组成、表达水平和修饰状态,从整体水平上研究蛋白质的组成和调控^[42,43]。

目前蛋白质组学研究主要在成骨细胞和破骨细胞的多向分化功能等方面^[44-47],对于脊柱韧带骨化相关蛋白质

组学研究较少,主要集中在 OPLL 和腰椎黄韧带肥厚相关差异蛋白研究,对于 OLF 相关的蛋白质组学研究甚少。结合既往蛋白质组学研究经验,通过发现和鉴定在病理状态下胸椎 OLF 中蛋白质的差异成分,找到疾病相关的标志性蛋白因子,将有助于胸椎 OLF 发病机制的研究。

2.1 肿瘤坏死因子

肿瘤坏死因子超家族(Tumor necrosis factor super family, TNFSF)包括 TNF- α 、TNF- β 、TNFSF14 和淋巴毒素 B(lymphotoxin-B, LT-B)等,主要参与炎症反应、免疫应答及抗肿瘤等反应。其中 TNF- α 是由单核巨噬细胞分泌的以同源三聚体折叠而成的细胞因子,根据不同细胞组织类型、生物进程以及作用时间和剂量等因素,其对成骨分化具有双重作用^[48,49]。

近来有研究^[50]通过同位素标记相对和绝对定量(isobaric tags for relative and absolute quantification, iTRAQ) 标记的定量蛋白质组学方法,在胸椎 OLF 患者中系统分析黄韧带,发现在 1285 个检测到的蛋白质中,有 282 个被鉴定为差异表达的蛋白质,其中有 10 种蛋白质与炎症相关,包括 TNF。进一步通过 ELISA 验证发现,胸椎 OLF 患者血清 TNF- α 水平显著高于对照组。为了阐明 TNF- α 对骨化相关基因表达的影响,TNF- α 刺激黄韧带细胞后,可诱导成骨细胞特异性转录因子 Osterix(OSX)在黄韧带细胞中的表达,同能还能激活 OSX 下游成骨细胞基因 OCN 和 ALP。TNF- α 是涉及许多人类疾病发病机理的促炎症细胞因子,Zhang 等^[51] 蛋白质谱分析显示,OLF 黄韧带中 TNF- α 蛋白水平升高。经细胞增殖实验表明经 TNF- α 刺激的胸椎 OLF 黄韧带原代细胞生长速度快于对照组,细胞周期中 S 期细胞比例增加,且 G1/S 特异性蛋白 cyclin D1 和 c-Myc 在 TNF- α 刺激后上调。另一方面,TNF- α 以剂量依赖性方式激活 OSX 表达,成骨细胞分化相关基因如 BMP-2 在 TNF- α 的刺激下也出现表达上调。通过特定的促分裂原活化蛋白激酶 ERK 抑制剂 U0126 可抑制 TNF- α 对 OSX 的表达活性,提示 TNF- α 通过促分裂原活化蛋白激酶 ERK 途径激活 OSX 表达,表明 TNF- α 可能是通过 cyclin D1 和 c-Myc 调节细胞增殖,并通过 OSX 促进成骨细胞分化来参与胸椎 OLF 的发生。

2.2 其他相关因子

日本学者 Kamita 等^[52]采用不同蛋白质组学技术来分析腰椎椎管狭窄患者的黄韧带。研究纳入 54 例腰椎管狭窄病例和 19 例对照组病例,通过 SCX 综合蛋白质组学技术检测到黄韧带组织中共有 1288 种蛋白,GO 分析显示超过 30% 的蛋白为细胞外基质蛋白。质谱分析 2D 图像转换分析结果显示 286 种蛋白中 1675 条肽具有差异性表达。该研究通过质谱多反应监测技术/选择反应监测(SRM/MS) 定量蛋白质组学分析首次发现了腰椎黄韧带中 4 种差异性表达蛋白,分别为纤连蛋白(Fibronectin)、丝氨酸蛋白酶 HTRA1 (Serine protease HTRA1)、肌腱蛋白(Tenascin)和无孢蛋白(Asporin)。而这些差异蛋白在 OLF

中的具体作用仍需进一步研究。

脊柱韧带骨化病的特征是病理性异位骨化,近来的蛋白质组学研究也应用于异位骨化的研究中。Edsberg 等采用 iTRAQ 标记来研究异位骨化患者血清的半定量全局蛋白质组学,首次报道了来自有和无异位骨化的个体血清的 SRM-MS 分析,并鉴定了健康人和患病者之间的血清蛋白质组谱差异^[53]。利用 iTRAQ 数据,针对 10 种筛选蛋白进行选择反应监测质谱(SRM-MS)测定,发现 ALP、OCN, α -2 型 I 型胶原,胶原 α -1(V)链同种型 2 前体蛋白,骨唾液蛋白 2,磷脂酸磷酸酶 LPIN2,骨调节蛋白,蛋白磷酸酶 1J 和 RRP12 样蛋白。其中 10 种 SRM-MS 蛋白质中的骨钙素前蛋白、骨调蛋白前体和来自血清的胶原蛋白 α -1(v)链同种型 2 前蛋白的蛋白水解肽是异位骨化的潜在的临床生物标志物。因此,后续进一步探讨这些骨化相关差异蛋白在黄韧带中的表达及其作用,可在蛋白质水平对 OLF 发病机制有更全面的了解。

综上所述,尽管在 OLF 基因组学和蛋白质组学研究方面获知了部分易感基因和差异蛋白,但目前对胸椎 OLF 的病因和发病机制还不甚了解。易感基因和蛋白质组学的研究仍需要多中心大样本量的病例进行对照分析。从蛋白质组学蛋白翻译修饰及蛋白质间相互作用的层面上,结合易感基因筛查和进一步深入研究,寻找共同的差异因子及其作用靶点,探讨基因和蛋白间的相互联系,对认识胸椎 OLF 的病理发病机制以及早期诊断和治疗具有重要意义。

3 参考文献

- Ahn DK, Lee S, Moon SH, et al. Ossification of the ligamentum flavum[J]. Asian Spine J, 2014, 8(1): 89-96.
- Feng FB, Sun CG, Chen ZQ. Progress on clinical characteristics and identification of location of thoracic ossification of the ligamentum flavum[J]. Orthop Surg, 2015, 7(2): 87-96.
- Miyasaka K, Kaneda K, Sato S, et al. Myelopathy due to ossification or calcification of the ligamentum flavum: radiologic and histologic evaluations[J]. AJNR Am J Neuroradiol, 1983, 4(3): 629-632.
- Li H, Jiang LS, Dai LY. Hormones and growth factors in the pathogenesis of spinal ligament ossification [J]. Eur Spine J, 2007, 16(8): 1075-1084.
- Yayama T, Uchida K, Kobayashi S, et al. Thoracic ossification of the human ligamentum flavum: histopathological and immunohistochemical findings around the ossified lesion[J]. J Neurosurg Spine, 2007, 7(2): 184-193.
- Hanakita J, Suwa H, Nagayasu S, et al. Clinical analysis of ossified thoracic ligaments and thoracic disc hernia[J]. Neurol Med Chir, 1991, 31(13): 936-942.
- Hou X, Sun C, Liu X, et al. Clinical features of thoracic spinal stenosis-associated myelopathy: a retrospective analysis of 427 cases[J]. Clin Spine Surg, 2016, 29(2): 86-89.
- Guo JJ, Luk KD, Karppinen J, et al. Prevalence, distribution, and morphology of ossification of the ligamentum flavum: a population study of one thousand seven hundred thirty-six magnetic resonance imaging scans[J]. Spine, 2010, 35(1): 51-56.
- Hanakita J, Suwa H, Ohta F, et al. Neuroradiological examination of thoracic radiculomyelopathy due to ossification of the ligamentum flavum[J]. Neuroradiology, 1990, 32(1): 38-42.
- Maigne JY, Ayral X, Guerin-Surville H. Frequency and size of ossifications in the caudal attachments of the ligamentum flavum of the thoracic spine. Role of rotatory strains in their development: an anatomic study of 121 spines[J]. Surg Radiol Anat, 1992, 14(2): 119-124.
- Khalilpour A, Kilic T, Khalilpour S, et al. Proteomic-based biomarker discovery for development of next generation diagnostics[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2017, 101(2): 475-491.
- Simicevic J, Deplancke B. Transcription factor proteomics—tools, applications, and challenges[J]. Proteomics, 2017, 17(3-4): 1600317.
- Qu X, Chen Z, Fan D, et al. Two novel BMP-2 variants identified in patients with thoracic ossification of the ligamentum flavum[J]. Eur J Hum Genet, 2017, 25(5): 565-571.
- 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.
- Elkon R, Agami R. Characterization of noncoding regulatory DNA in the human genome[J]. Nat Biotechnol, 2017, 35(8): 732-746.
- Altshuler D, Daly MJ, Lander ES. Genetic mapping in human disease[J]. Science, 2008, 322(5903): 881-888.
- Moeinzadeh S, Jabbari E. Morphogenic peptides in regeneration of load bearing tissues [J]. Adv Exp Med Biol, 2015, 881: 95-110.
- Siamwala JH, Rajendran S, Chatterjee S. Strategies of manipulating BMP signaling in microgravity to prevent bone loss[J]. Vitam Horm, 2015, 99: 249-272.
- 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]. J Neurosurg Spine, 2011, 15(4): 380-385.
- Hayashi K, Ishidou Y, Yonemori K, et al. Expression and localization of bone morphogenetic proteins (BMPs) and BMP receptors in ossification of the ligamentum flavum [J]. Bone, 1997, 21(1): 23-30.
- Ning S, Chen Z, Fan D, et al. Genetic differences in osteogenic differentiation potency in the thoracic ossification of the ligamentum flavum under cyclic mechanical stress[J]. Int J Mol Med, 2017, 39(1): 135-143.
- Hou XF, Fan DW, Sun CG, et al. Recombinant human bone morphogenetic protein -2 -induced ossification of the ligamentum flavum in rats and the associated global modification of histone H3[J]. J Neurosurg Spine, 2014, 21

- (3): 334–341.
23. Moon SH, Park SR, Kim H, et al. Biologic modification of ligamentum flavum cells by marker gene transfer and recombinant human bone morphogenetic protein-2[J]. *Spine*. 2004, 29(9): 960–965.
 24. 赵伟光, 刘振武, 刘利, 等. 胸椎黄韧带骨化症与骨形态发生蛋白 4 基因单核苷酸多态性的关联 [J]. *中国组织工程研究*, 2012, 16(24): 4376–4380.
 25. Bushby KM, Collins J, Hicks D. Collagen type VI myopathies[J]. *Adv Exp Med Biol*. 2014, 802: 185–199.
 26. Kang H, Aryal A C S, Marini JC. Osteogenesis imperfecta: new genes reveal novel mechanisms in bone dysplasia [J]. *Transl Res*, 2017, 181: 27–48.
 27. Xu YQ, Zhang ZH, Zheng YF, et al. MicroRNA-221 Regulates Hypertrophy of Ligamentum Flavum in Lumbar Spinal Stenosis by Targeting TIMP-2[J]. *Spine*, 2016, 41(4): 275–282.
 28. Chen J, Liu Z, Zhong G, et al. Hypertrophy of ligamentum flavum in lumbar spine stenosis is associated with increased miR-155 level[J]. *Dis Markers*, 2014, 2014: 786543.
 29. Xu J, Li Z, Hou Y, et al. Potential mechanisms underlying the Runx2 induced osteogenesis of bone marrow mesenchymal stem cells[J]. *Am J Transl Res*, 2015, 7(12): 2527–2535.
 30. Vimalraj S, Arumugam B, Miranda PJ, et al. Runx2: Structure, function, and phosphorylation in osteoblast differentiation[J]. *Int J Biol Macromol*, 2015, 78: 202–208.
 31. 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(12): 3333–3341.
 32. Chang F, Li L, Gao G, et al. Role of Runx2 polymorphisms in risk and prognosis of ossification of posterior longitudinal ligament[J]. *J Clin Lab Anal*, 2017, 31(4): e22068.
 33. Ornitz DM, Marie PJ. Fibroblast growth factor signaling in skeletal development and disease[J]. *Genes Dev*, 2015, 29(14): 1463–1486.
 34. Xie Y, Zhou S, Chen H, et al. Recent research on the growth plate: Advances in fibroblast growth factor signaling in growth plate development and disorders [J]. *J Mol Endocrinol*, 2014, 53(1): T11–34.
 35. Jun JK, Kim SM. Association study of fibroblast growth factor 2 and fibroblast growth factor receptors gene polymorphism in korean ossification of the posterior longitudinal ligament patients[J]. *J Korean Neurosurg Soc*, 2012, 52(1): 7–13.
 36. 颜廷宾, 张佐伦, 于锡欣, 等. 胸椎黄韧带骨化与 HLA-DQA1 等位基因的相关性研究[J]. *中国矫形外科杂志*, 2002, 10(S2): 1402–1404.
 37. Lin GL, Hankenson KD. Integration of BMP, Wnt, and notch signaling pathways in osteoblast differentiation [J]. *J Cell Biochem*, 2011, 112(12): 3491–3501.
 38. Qu X, Chen Z, Fan D, et al. Notch signaling pathways in human thoracic ossification of the ligamentum flavum [J]. *J Orthop Res*, 2016, 34(8): 1481–1491.
 39. Qu X, Chen Z, Fan D, et al. MiR-199b-5p inhibits osteogenic differentiation in ligamentum flavum cells by targeting JAG1 and modulating the Notch signalling pathway[J]. *J Cell Mol Med*, 2017, 21(6): 1159–1170.
 40. Qu X, Chen Z, Fan D, et al. MiR-132-3p Regulates the Osteogenic Differentiation of Thoracic Ligamentum Flavum Cells by Inhibiting Multiple Osteogenesis-Related Genes [J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(8): 1370.
 41. Yin J, Zhuang G, Zhu Y, Hu X, et al. MiR-615-3p inhibits the osteogenic differentiation of human lumbar ligamentum flavum cells via suppression of osteogenic regulators GDF5 and FOXO1[J]. *Cell Biol Int*, 2017, 41(7): 779–786.
 42. Wilkins MR, Sanchez JC, Gooley AA, et al. Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it [J]. *Biotechnol Genet Eng Rev*, 1996, 13: 19–50.
 43. Kahn P. From genome to proteome: looking at a cell's proteins[J]. *Science*, 1995, 270(5235): 369–370.
 44. McIlwraith CW, Kawcak CE, Frisbie DD, et al. Biomarkers for equine joint injury and osteoarthritis [J]. *J Orthop Res*, 2018, 36(3): 823–831.
 45. Tan H, Chen R, Li W, et al. A systems biology approach to studying the molecular mechanisms of osteoblastic differentiation under cytokine combination treatment [J]. *NPJ Regen Med*, 2017, 2: 5.
 46. Segeletz S, Hoffack B. Proteomic approaches to study osteoclast biology[J]. *Proteomics*, 2016, 16(19): 2545–2556.
 47. Blonder J, Xiao Z, Veenstra TD. Proteomic profiling of differentiating osteoblasts[J]. *Expert Rev Proteomics*, 2006, 3(5): 483–496.
 48. Magrey MN, Khan MA. The paradox of bone formation and bone loss in ankylosing spondylitis: evolving new concepts of bone formation and future trends in management [J]. *Curr Rheumatol Rep*, 2017, 19(4): 17.
 49. Osta B, Benedetti G, Miossec P. Classical and paradoxical effects of TNF- α on bone homeostasis[J]. *J Front Immunol*, 2014, 5: 48.
 50. Wang B, Chen Z, Meng X, et al. iTRAQ quantitative proteomic study in patients with thoracic ossification of the ligamentum flavum[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 487(4): 834–839.
 51. Zhang C, Chen Z, Meng X, et al. The involvement and possible mechanism of pro-inflammatory tumor necrosis factor alpha (TNF- α) in thoracic ossification of the ligamentum flavum[J]. *PLoS One*, 2017, 12(6): e0178986.
 52. Kamita M, Mori T, Sakai Y, et al. Proteomic analysis of ligamentum flavum from patients with lumbar spinal stenosis [J]. *Proteomics*, 2015, 15(9): 1622–1630.
 53. Edsberg LE, Crowgey EL, Osborn PM, et al. A survey of proteomic biomarkers for heterotopic ossification in blood serum[J]. *J Orthop Surg Res*, 2017, 12(1): 69.

(收稿日期:2018-03-20 修回日期:2018-05-14)

(本文编辑 彭向峰)