

· 综述 ·

黄韧带骨化机制与骨质疏松症治疗策略

常亚南^{1#} 舒丽^{1#} 张驰^{1,2,3*}

1.北京大学国际医院中心实验室,北京 102206

2.北京大学国际医院骨科,北京 102206

3.北京大学跨学部生物医学工程系,北京 102206

中图分类号: R681 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2021) 08-1238-07

摘要: 骨质疏松症是最常见的代谢性骨病,因成骨细胞与破骨细胞功能失衡造成。目前常见的骨质疏松症药物旨在抑制骨吸收。为了更有效地治疗骨质疏松症,刺激新骨形成将是重要策略。成骨细胞特异转录因子 Osterix (Osx) 是骨形成及成骨细胞分化必需的转录因子,被认为是骨分子开关。全基因组关联分析研究已经证实 Osx 与骨质疏松表型相关,但仍需进一步研究 Osx 的作用机制,包括探索 Osx 上游调节因子。骨质疏松症迫切需要促骨形成新药,Osx 是理想的新靶点。而临床上的另外一种疾病为寻找 Osx 上游因子提供了很好的参考,那就是黄韧带骨化(ossification of the ligamentum flavum,OLF)。黄韧带骨化是脊柱韧带病理性异位骨化性疾病,在骨外组织黄韧带里刺激了新骨的形成,其致病机制尚不明确。本文结合近年来有关黄韧带骨化的一些机制研究进行综述,包括力学因素、遗传因素、内分泌以及微量元素、Notch 信号通路、miRNA 及炎症因子等。最新发现的一些参与黄韧带骨化的相关因子能够刺激 Osx 基因的表达,希望通过对黄韧带骨化致病机制的研究,为寻找 Osx 上游调节因子进而研发促骨形成新药治疗骨质疏松症提供新的思路。

关键词: 骨质疏松症;致病机制;成骨细胞特异转录因子 Osx;黄韧带骨化

Mechanism of ossification of the ligamentum flavum and treatment strategy of osteoporosis

CHANG Yanan^{1#}, SHU Li^{1#}, ZHANG Chi^{1, 2, 3*}

1. Central Laboratory, Peking University International Hospital, Beijing 102206

2. Department of Orthopedics, Peking University International Hospital, Beijing 102206

3. Biomedical Engineering Department, Peking University, Beijing 102206, China

#; Co-first author

* Corresponding author: ZHANG Chi, Email: chi.zhang@case.edu

Abstract: Osteoporosis is the most common metabolic bone disease, which is caused by the imbalance of osteoblast and osteoclast function. Current osteoporosis drugs aim to inhibit bone resorption. In order to treat osteoporosis more effectively, stimulating new bone formation will be an important strategy. Osteoblast specific transcription factor Osterix (Osx) is an essential transcription factor for bone formation and osteoblast differentiation, and is considered as a bone molecular switch. Genome wide association analysis has confirmed that Osx is associated with osteoporosis phenotype. However, the mechanism of Osx deserves further investigation, including exploring the upstream regulatory factors of Osx. Osteoporosis urgently needs new drugs to promote bone formation, and Osx is an ideal new target. The ossification of the ligamentum flavum (OLF) is another clinical disease that provides a good reference for the search for the upstream factors of Osx. Ossification of ligamentum flavum is a pathological heterotopic ossification disease of spinal ligament. It stimulates the formation of new bone in the ligamentum flavum, and its pathogenesis is still unclear. In this review, we reviewed the mechanism of ligamentum flavum ossification in recent years, including mechanical factors, genetic factors, endocrine and trace elements, Notch signaling pathway, miRNA and inflammatory factors, and so on. Some newly discovered factors involved in ligamentum flavum ossification can stimulate the expression of Osx gene. The study on the pathogenesis of ossification of ligamentum flavum can provide a new idea for searching the upstream regulatory factors of Osx and developing new drugs for promoting bone formation in the treatment of osteoporosis.

基金项目:北京市科技重大专项基金(Z181100001818006)

#: 共同第一作者

* 通信作者: 张驰, Email: chi.zhang@case.edu

Key words: osteoporosis; pathogenesis; Osx; ossification of ligamentum flavum

骨质疏松症(osteoporosis)是最常见的代谢性骨病,其特征是骨量减少、骨组织微结构改变、骨强度降低和骨折风险增加^[1]。骨质疏松是因为成骨细胞与破骨细胞之间功能不平衡造成的。调控骨形成和吸收关键通路机制的发现,有助确定具有特异作用机制的新治疗方法^[2]。目前大多数骨质疏松治疗药物旨在抑制骨吸收,在机制上是针对破骨细胞。由于骨重建过程涉及骨形成和骨吸收,仅使用抗骨吸收类药物难以有效改善骨量及骨结构,为了更有效治疗骨质疏松,刺激新骨形成将是重要策略,在机制上针对的是成骨细胞。目前临床上还没有能直接刺激新骨形成的药物,阐明骨形成过程的基因调控分子机制对指导骨质疏松特异性促骨形成新药的研发有重要意义。

骨形成包括膜内成骨与软骨内成骨两种方式,膜内成骨是先由间充质细胞分化成为胚性结缔组织膜,然后在此膜内成骨,颅面及锁骨即以此方式形成;软骨内成骨以预先形成的软骨为模板然后被骨组织取代的过程为特征,远较膜内成骨复杂,大多数骨如四肢、躯干及颅底骨以此方式形成。成骨细胞从间充质干细胞分化而来,经历了由不同转录因子及信号蛋白调控的多个阶段。Ihh 是软骨内成骨所必需的转录因子,不参与膜内成骨,它对间充质细胞分化为成骨细胞必不可少;转录因子 Runx2 参与软骨内成骨及膜内成骨调控,表达 Runx2 的细胞能分化为成骨细胞或软骨细胞;成骨细胞特异转录因子 Osterix(Osx)是骨形成及成骨细胞分化的必要转录因子^[3],Osx 基因缺失小鼠胚胎完全没有骨形成而软骨形成不受影响。本课题组前期研究已经发现了一些重要的 Osx 下游靶基因,包括 VDR、SatB2、VEGF、Dkk1、Sost 等,进一步确认了 Osx 对骨形成的重要作用^[4]。Osx 直接调控成骨细胞标志基因骨涎蛋白(Bsp)^[5]。全基因组关联分析研究证实 Osx 与骨质疏松相关^[6]。虽然 Osx 与骨质疏松症表型有关,但仍需进一步研究以确定 Osx 在骨形成作用的分子机制,包括探索 Osx 上游调节因子。治疗骨质疏松症迫切需要促骨形成新药,Osx 作为骨分子开关是理想的新靶点。而临床上的另一种骨病为寻找 Osx 上游调节因子提供了很好的参考,那就是黄韧带骨化(ossification of the ligamentum flavum,OLF),由于尚未明确的病理性原因在骨外组织黄韧带里刺激了新骨的形成。

1 黄韧带骨化

黄韧带是脊柱椎管内维持脊柱稳定性的一个韧带组织结构。黄韧带主要由弹力纤维、胶原纤维、网状纤维和细胞基质组成^[7]。OLF 属于脊柱韧带病理性异位骨化性疾病,颈椎、胸椎和腰椎均可发生,其中最常发生在胸椎尤其是下胸段部位(T₉~T₁₂)^[8-10]。OLF 的病理学特征属于软骨内成骨过程^[11]。其组织病理学变化为:弹性纤维变性、降解;胶原纤维大量增生,局部成纤维细胞分化形成软骨细胞,进而分泌软骨基质形成软骨;随后软骨发生钙化,新生血管长入,局部的间充质细胞分化为成骨细胞,最终分泌骨基质,形成成熟骨组织骨化。

胸椎黄韧带骨化(thoracic ossification of the ligamentum flavum,TOLF)以胸椎的黄韧带异位成骨为特征,被认为是胸椎椎管狭窄和脊髓病的主要原因,会导致脊髓、神经受压。在 TOLF 早期未压迫脊髓时无明显症状,而压迫脊髓后常表现为双下肢僵硬无力、间歇性跛行、腰背部疼痛或并发下肢疼痛,其起病隐匿,但一旦出现胸脊髓压迫运动神经导致其功能严重损害时,致瘫率极高^[12]。

2 黄韧带骨化流行病学调查

流行病学调查显示,OLF 发病具有明显种族差异、性别差异和家族性倾向。OLF 主要发生于亚洲人群,集中于中、日、韩等国家,而欧美及非洲相对较少^[13-15]。种族差异提示 OLF 可能与某种遗传因素相关。OLF 被视为中老年性疾病^[16],有研究显示其平均发病年龄为 61 岁,男性多于女性。当亚洲人年龄超过 65 岁后,OLF 发病率可高达 20%,然而对于欧美人群发病情况则少有报道。在一项对中国南方 1 736 名志愿者进行的研究中发现,3.8%的志愿者患有 TOLF,但无明显症状^[8];另一组研究对 993 例因存在胸部症状而就诊患者的 CT 结果进行了分析,发现重建胸椎后有 63.9%的患者为没有明显椎管狭窄的 TOLF^[9]。明确何种类型及程度的 TOLF 会引起脊髓损害是临床诊断的关键和难题。

3 黄韧带骨化治疗现状

外科手术减压是目前对于 TOLF 所引起的胸椎椎管狭窄唯一有效的治疗方法,然而多种手术常见并发症如脊髓或神经根损伤、硬膜外血肿形成、硬脊

膜损伤及脑脊液漏、术后脊柱失稳甚至后凸畸形等仍然给临床治疗和患者预后造成巨大困难,最严重的是术中脊髓损伤或术后血肿导致患者术后截瘫。许多患者就诊时病情已较重,至今仍无有效的非手术治疗方法和早期诊断手段。

4 黄韧带骨化致病机制

OLF 致病机制尚不清楚。据报道 OLF 发生与多种因素相关,如力学因素、遗传因素、内分泌以及微量元素等,这些因素尚难以明确阐明 OLF 发病机制。

4.1 力学因素

研究显示力学异常在 OLF 发生发展中起重要作用。Maigne 等^[17]对胸椎黄韧带附着部位的骨化进行了研究,发现关节突关节的旋转幅度与 OLF 发生频率呈正相关,这表明旋转应力对 OLF 起重要的作用。有研究报道了 OLF 发生于年轻棒球投手的病例,发现在患者胸腰椎交界处单边左侧 OLF 压迫脊髓,同样证实了反复局部的旋转机械应力可能促使 OLF。研究发现胸腰椎后凸畸形的患者 OLF 的发生率较高,提示作用于黄韧带的局部机械应力会促进骨化的发生发展。细胞学研究发现机械应力会促进黄韧带细胞的成骨进程。Fan 等^[18]对 TOLF 细胞进行体外拉伸诱导,发现 Runx2、Osx、ALP 的表达增加,提示机械应力可诱导黄韧带细胞成骨分化从而促进 TOLF。研究^[19]发现作用于 OLF 细胞的周期性拉伸应力可通过 β -catenin 信号途径激活其骨化。Kim 等^[20]研究脊髓 von-Mises 应力和横截面积对脊髓压迫的不同程度和形状的影响,发现当脊髓横截面积减少 30%~40%或压缩 4 mm 发生形变时,会出现脊髓症状。

虽然关于机械应力的研究相对较多,但仍无法解释所有病例的致病机制,对于欧美、非洲等地关于机械应力导致 OLF 的报道较少。脊柱局部应力的异常影响对解释 OLF 致病机制有其局限性。

4.2 遗传易感基因

流行病学研究表明 OLF 主要发生在亚洲人群且有些患者具有家族倾向性,这些表明 OLF 可能与遗传相关^[17],研究已报道易感基因在 OLF 中起重要作用^[21-22]。单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphisms, SNP) 因其在人类基因组中分布广泛、遗传稳定性强、富有代表性、易于基因分型和快速自动化分析等特点,已作为易感基因和疾病遗传因素研究的重要方法^[23-24]。

4.2.1 Runx2 基因:Runx2 是参与成骨细胞分化所必需的关键因子。Runx2 调节成骨细胞向成骨分化,促进骨组织形成和重建,同时促进多能干细胞向软骨细胞分化。有研究发现 Runx2 中两个位点 RS1321075 和 RS12333172 在 OLF 患者和对照组之间有所不同,其中一个单倍型的位点表明与 OLF 的发病率增加有关^[25]。使用成骨培养基诱导培养韧带细胞的研究发现 Runx2 表达增强,同时软骨形成因子如结缔组织生长因子和软骨寡聚基质蛋白以及血管生成素 1 都显著升高,加入 Runx2 siRNA 后这些基因表达均受到抑制,而非骨化对照组细胞没有这些变化,提示 Runx2 参与异位骨化^[26]。

4.2.2 骨形态发生蛋白:骨形态发生蛋白 (bone morphogenetic protein, BMP) 是多功能性生长因子,在成骨过程中具有关键调控作用^[27],研究表明其参与异位骨化^[28]。BMP 家族有十多个亚型,其中与 OLF 相关的基因有 BMP-2、BMP-4 等亚型^[29]。有研究对 OLF 黄韧带的 BMPs 及其受体 BMPRs 进行了检测,发现在骨化灶周围的成熟和不成熟软骨细胞以及离骨化灶较远的纺锤体形细胞和圆形细胞中均存在 BMPRs,同时发现 BMPRs、BMP-2/-4 和成骨蛋白-1/BMP-7 的配体均共存于 OLF,表明 BMPs 可能参与促进 OLF 异位骨化位点的软骨内成骨,且 OLF 的骨化活动是持续存在^[30]。有研究在循环机械应力作用下培养原代韧带细胞,诱导其成骨,发现施加机械应力能显著提高胸椎黄韧带细胞 BMP-2 表达^[31]。Moon 等^[32]发现经腺病毒介导的 BMP-2 cDNA 基因转染后的黄韧带细胞可诱导新生骨形成,促进脊柱融合。Qu 等^[21]发现存在于 TOLF 中 BMP-2 的两个突变体,即 c.460C>G;p.(R154 G) (Novo 1) 和 c.584 G>T;p.(R195 M) (Novo 2),功能测定发现突变 BMP-2 表达促进成骨标记基因表达和成骨分化,表明遗传因素参与 TOLF,由单核苷酸替换导致的 BMP-2 表达上调可能是 TOLF 的一种机制。BMP-4 在成骨分化中起着重要作用。研究发现患者中 BMP-4 的两个 SNP 位点 RS17563 和 RS2855532 带“T”基因型和等位基因型频率明显高于正常人,提示 BMP-4 基因与 TOLF 相关^[33]。

4.2.3 COL6A1:VI 型胶原是一种存在于细胞外基质并具有细胞因子活性的纤维蛋白,可促进细胞分化、增值、迁移等,是纤维软骨分化的标志物^[34],也与成骨分化密切相关^[35]。VI 型胶原蛋白由 $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 和 $\alpha 3$ 三条链构成,其中编码 $\alpha 1$ 的 COL6A1 基因被认为是日本人群脊柱后纵韧带骨化 (OPLL) 的易感

基因,而 OLF 和 OPLL 在流行病学、病因学和病理学上都相似且共存,因此 COL6A1 很可能是 OLF 的潜在易感基因。研究发现 COL6A1 启动子 (-572 T) SNP 的等位基因频率在 OLF 患者与正常人之间表现出显著差异,此外由启动子 (-572)、内含子 33 (+20) 和内含子 32 (-29) SNP 构成的单倍型的总频率在 OLF 患者与对照之间也存在显著差异,表明 COL6A1 可能是汉族 OLF 的易感基因^[22]。然而有学者得出相反结论,发现 COL6A1 的 SNP 多态性位点与 OLF 无明显相关,可能与基因座选择、病例选择以及研究方法差异有关^[25]。

4.2.4 HLA-DQA1 基因:人类白细胞抗原 (HLA) 系统是最具有多肽性的抗原系统。有报道 HLA 单倍型与 OLF 相关^[36],对比分析发现 HLA-DQA1 * 0401 同 OLF 呈正相关,可能与 OLF 易感性相关, DQA1 * 0201 与 OLF 则呈负相关,可能与 OLF 抗性相关,表明在 HLA-DQA1 位点存在易感和抵抗双重作用,这可能是影响 OLF 发病的因素之一。但该研究样本量较小,该基因和 OLF 的相关性有待进一步核实。

4.2.5 成纤维细胞生长因子:成纤维细胞生长因子 (FGF) 及其受体 FGFR 在骨骼发育中起重要作用,调控成骨细胞增殖、分化和凋亡,其中 FGF2 是骨和软骨分化的重要调节因子^[37]。直接测序法对患者和对照者的 FGF2、FGFR1、FGFR2 和 SNP 之间的关系进行了对照研究,结果发现 FGF2 的 rs 1476217 多态性位点与 OLF 相关^[38]。基因多态性 SNP 与 OLF 的相关性研究有助于发现 OLF 易感基因。但是现在关于 OLF 易感基因的研究仍然处于探索阶段。对于同一基因同一位点的 SNP 相关性研究分析,不同学者的结果存在一定差异,其原因可能涉及多因素,因此开展大样本量研究有利于发现 OLF 易感基因位点。

4.3 内分泌因素

相关研究发现内分泌代谢异常可能与 OLF 有关。患有糖尿病、肥胖症、氟骨症、钙磷代谢异常等疾病的患者更易发生 OLF。研究发现在糖尿病小鼠中 TOLF 发生率较高,推测高血糖所致胰岛素样生长因子升高可能与 OLF 有关^[39]。瘦素是一种由脂肪组织分泌并参与体内糖、脂肪、能量代谢的肽类激素,也参与骨骼的形成。研究发现女性骨化患者体内瘦素受体表达高于对照女性,提示瘦素可能与韧带骨化的发病相关^[40]。其他学者亦证实瘦素与 OLF 相关,实验发现 STAT3、Runx2 和类固醇受体共

激活因子 1 是介导瘦素刺激 TOLF 的影响分子,解释了患有高瘦素血症的肥胖人群容易发生 OLF^[41]。尽管内分泌代谢异常可能会引起 OLF,但是研究报道较少,缺乏大量病例,仍待进一步研究。

4.4 微量元素

微量元素异常可能与 OLF 有关。有报道表明骨骼氟含量超标可引起 OLF^[42]。实验提示氟化物可能通过刺激退变黄韧带细胞向成骨细胞分化、成熟,而且在诱导黄韧带退变基础上进一步骨化^[43]。Wang 等^[44]对 OLF 黄韧带组织中微量元素进行了提取定量分析,发现 Ca、F、Zn、Mn、Mo 等含量上升,而 Cu 含量降低,提示微量元素变化可能参与 OLF。有研究表明基础代谢元素水平与 TOLF 相关^[43]。这些元素对 OLF 的影响机制尚不清楚。

4.5 Notch 信号通路

Notch 是介导细胞信号转导的受体蛋白,影响成骨细胞增殖、分化和骨化^[45]。研究发现 OLF 黄韧带细胞在成骨分化期间 JAG1、Notch2、HES1 上调,而 Notch2 过表达会促进黄韧带细胞的成骨分化,表明 Notch 参与 OLF,Notch 可能通过与 Runx2 和 Osx 相互作用影响黄韧带细胞的成骨分化^[46]。

4.6 miRNA

miRNA 是一个重要的单链非编码 RNA 家族,在多种生理和病理过程中发挥着重要作用。研究发现 miR-132-3p 通过 FOXO1、GDF5 和 SOX6 抑制黄韧带细胞成骨分化^[47]。其他研究发现在黄韧带细胞成骨分化过程中 miR-615-3p 表达降低,miR-615-3p 可以通过转录后抑制成骨调节因子 GDF5 和 FOXO1 达到负调控黄韧带细胞成骨分化的目的^[48]。最新研究发现 miR-490-3p 在胸椎黄韧带细胞成骨分化过程中表达下调,而 miR-490-3p 的过表达抑制了成骨分化。该研究揭示 miR-490-3p 通过靶向 FOXO1 抑制成骨分化参与胸椎黄韧带骨化过程^[49]。

4.7 新方向机制-炎症因子

近年来,炎症过程对新骨形成的影响越来越受到重视。骨折后观察到一个严格控制的炎症期,它触发修复级联反应,对骨重建至关重要^[50-51]。转基因动物模型已经表明肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 在骨折愈合中的重要作用^[52]。这表明肿瘤坏死因子- α 参与促进出生后骨折修复,骨骼组织发育和出生后修复过程受不同机制的高度调控。异位骨化和一些骨形成过多的疾病显示在炎症期之前^[53]。研究显示炎症因子 Cox2 参与了 TNF- α 的调控^[54]。但炎症

因子对 TOLF 的影响尚不清楚。

本课题组前期通过使用 iTRAQ 标记的定量蛋白质组学技术对 TOLF 黄韧带中的蛋白质进行了检测^[55],其中有 282 种差异表达的蛋白质,功能聚类分析显示上述蛋白质中有十种与炎症有关,包括肿瘤坏死因子(TNF)。ELISA 验证患者血清 TNF- α 含量显著高于对照组,进一步实验发现 TNF- α 能够诱导黄韧带细胞中 Osx 的表达,表明它可以促进成骨细胞分化,同时可激活 Osx 下游的成骨细胞基因 OCN 和 ALP。

TNF 主要参与炎症反应、免疫应答以及抗肿瘤等过程,家族成员主要有 TNF- α 、TNF- β 和 TNFSF14 等。其中 TNF- α 是一种由单核巨噬细胞分泌的涉及多种疾病发病机制的促炎症细胞因子,对成骨分化有双重作用^[56-57]。为了探索 TNF- α 对 TOLF 发病机制的影响,本课题组进行了深入研究^[58],首先通过蛋白质印记再次证实 OLF 黄韧带中 TNF- α 蛋白水平升高,原代细胞经 TNF- α 刺激后 G1 / S 特异性蛋白 cyclin D1 和 c-Myc 上调,同时 Bmp2 和 Osx 也表达上调,另外 ERK 抑制剂消除了 TNF- α 激活 Osx 的表达活性,提示 TNF- α 通过 ERK 途径激活 Osx,这表明 TNF- α 可能通过 G1 / S 特异性蛋白 cyclin D1 和 c-Myc 调控细胞增殖并且通过 Osx 诱导成骨细胞分化来参与 TOLF,这是首次发现 TNF- α 参与 TOLF。

5 小结

尽管对于 OLF 已有相关报道,但其发病机制仍处于探索阶段。上述所提到的相关因素如机械应力、遗传易感基因、内分泌及微量元素代谢异常,都暂时无法清楚解释 OLF 的发病机制。由于基因及分子变化往往早于影像学病理表现,如何有效防治 TOLF 是迄今为止尚未解决的医学难题。对 TOLF 分子机制的深入研究将为探索其病因及早期诊断提供线索。

前期通过蛋白质组学技术得到的差异表达蛋白质谱提示了炎症因子可能参与 TOLF 的发生。本研究发现 TNF- α 通过 cyclin D1 和 c-Myc 调控细胞增殖,同时通过 Osx 诱导成骨细胞分化参与 TOLF,揭示了 TNF- α 在胸椎 OLF 中的参与及其可能的机制,这表明炎症成分对 TOLF 病因的影响。有必要进一步研究以探讨不同炎症因子对 OLF 和 Osx 影响及其分子机制,这将使人们在蛋白质水平更全面地认识到 OLF 的病理发病机制。OLF 可能是个多因素

参与的疾病,综合考虑各方面因素的参与及其机制将有助于更全面深入地了解 OLF 的致病机制。另一方面,通过基于 RNA 测序的基因表达谱的最新研究表明,血管生成素 2 (angiopoietin-2) 参与 TOLF 的发生,该研究也显示血管生成素 2 促进了 Osx 的基因表达,是 Osx 的上游因子^[59]。综上,开展对于黄韧带骨化致病机制的研究能够为寻找 Osx 上游调节因子、进而研发促骨形成新药提供新的思路。

【 参 考 文 献 】

- [1] 张弛. 骨质疏松的基因诊断[J]. 中国骨质疏松杂志, 2010, 16(10):802-812.
- [2] Compston JE, McClung MR, Leslie WD. Osteoporosis [J]. Lancet, 2019, 393(10169):364-376.
- [3] Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, et al. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation [J]. Cell, 2002, 108(1):17-29.
- [4] Zhang C. Molecular mechanisms of osteoblast-specific transcription factor Osterix effect on bone formation [J]. Beijing Da Xue Xue Bao, 2012, 44(5):659-665.
- [5] Yang Y, Huang Y, Zhang L, et al. Transcriptional regulation of bone sialoprotein gene expression by Osx [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2016, 476(4):574-579.
- [6] Timpson NJ, Tobias JH, Richards JB, et al. Common variants in the region around Osterix are associated with bone mineral density and growth in childhood [J]. Human Molecular Genetics, 2009, 18(8):1510-1517.
- [7] Zhang K, Sun W, Liu XY, et al. Hypertrophy and fibrosis of the ligamentum flavum in lumbar spinal stenosis is associated with increased expression of LPA and LPAR1 [J]. Clinical Spine Surgery, 2017, 30(3):E189-E191.
- [8] 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.
- [9] Lang N, Yuan HS, Wang HL, et al. Epidemiological survey of ossification of the ligamentum flavum in thoracic spine: CT imaging observation of 993 cases [J]. European Spine Journal, 2013, 22(4):857-862.
- [10] Hur H, Lee JK, Lee JH, et al. Thoracic myelopathy caused by ossification of the ligamentum flavum [J]. Journal of Korean Neurosurgical Society, 2009, 46(3):189-194.
- [11] Yayama T, Uchida K, Kobayashi S, et al. Thoracic ossification of the human ligamentum flavum: histopathological and immunohistochemical findings around the ossified lesion [J]. Journal of Neurosurgery Spine, 2007, 7(2):184-193.
- [12] Feng FB, Sun CG, Chen ZQ. Progress on clinical characteristics and identification of location of thoracic ossification of the

- ligamentum flavum [J]. Orthopaedic Surgery, 2015, 7(2): 87-96.
- [13] Pascal-Moussellard H, Cabre P. Symptomatic ossification of the ligamentum flavum: A clinical series from the French Antilles [J]. Spine, 2005, 30(14):E400-405.
- [14] Xu R, Sciubba DM, Gokaslan ZL, et al. Ossification of the ligamentum flavum in a Caucasian man [J]. Journal of Neurosurgery Spine, 2008, 9(5):427-437.
- [15] Geber J, Hammer N. Ossification of the ligamentum flavum in a nineteenth-century skeletal population sample from Ireland: using bioarchaeology to reveal a neglected spine pathology [J]. Scientific Reports, 2018, 8(1):9313.
- [16] Aizawa T, Sato T, Tanaka Y, et al. Thoracic myelopathy in Japan: epidemiological retrospective study in Miyagi Prefecture during 15 years [J]. The Tohoku Journal of Experimental Medicine, 2006, 210(3):199-208.
- [17] 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]. Surgical and Radiologic Anatomy, 1992, 14(2):119-124.
- [18] Fan D, Chen Z, Wang D, et al. Osterix is a key target for mechanical signals in human thoracic ligament flavum cells [J]. Journal of Cellular Physiology, 2007, 211(3):577-584.
- [19] Cai HX, Yayama T, Uchida K, et al. Cyclic tensile strain facilitates the ossification of ligamentum flavum through beta-catenin signaling pathway: in vitro analysis [J]. Spine, 2012, 37(11):E639-646.
- [20] Kim YH, Khuyagbaatar B, Kim K. Biomechanical effects of spinal cord compression due to ossification of posterior longitudinal ligament and ligamentum flavum: a finite element analysis [J]. Medical Engineering & Physics, 2013, 35(9):1266-1271.
- [21] Qu X, Chen Z, Fan D, et al. Two novel BMP-2 variants identified in patients with thoracic ossification of the ligamentum flavum [J]. European Journal of Human Genetics, 2017, 25(5):565-571.
- [22] 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.
- [23] Elkon R, Agami R. Characterization of noncoding regulatory DNA in the human genome [J]. Nature biotechnology, 2017, 35(8):732-746.
- [24] Altshuler D, Daly MJ, Lander ES. Genetic mapping in human disease [J]. Science, 2008, 322(5903):881-888.
- [25] Liu Y, Zhao Y, Chen Y, et al. RUNX2 polymorphisms associated with OPLL and OLF in the Han population [J]. Clinical Orthopaedics and Related Research, 2010, 468(12):3333-3341.
- [26] Kishiya M, Sawada T, Kanemaru K, et al. A functional RNAi screen for Runx2-regulated genes associated with ectopic bone formation in human spinal ligaments [J]. Journal of Pharmacological Sciences, 2008, 106(3):404-414.
- [27] Chen G, Deng C, Li YP. TGF-beta and BMP signaling in osteoblast differentiation and bone formation [J]. International Journal of Biological Sciences, 2012, 8(2):272-288.
- [28] Siamwala JH, Rajendran S, Chatterjee S. Strategies of manipulating BMP signaling in microgravity to prevent bone loss [J]. Vitamins and Hormones, 2015, 99:249-272.
- [29] 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]. Journal of Neurosurgery Spine, 2011, 15(4):380-385.
- [30] 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.
- [31] 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]. International Journal of Molecular Medicine, 2017, 39(1):135-143.
- [32] 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.
- [33] 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.
- [34] Carvalho HF, Felisbino SL, Keene DR, et al. Identification, content, and distribution of type VI collagen in bovine tendons [J]. Cell and Tissue Research, 2006, 325(2):315-324.
- [35] Kang H, Aryal ACS, Marini JC. Osteogenesis imperfecta: new genes reveal novel mechanisms in bone dysplasia [J]. Translational Research, 2017, 181:27-48.
- [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, 14:1402-1404.
- [37] Ornitz DM, Marie PJ. Fibroblast growth factor signaling in skeletal development and disease [J]. Genes & Development, 2015, 29(14):1463-1486.
- [38] 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]. Journal of Korean Neurosurgical Society, 2012, 52(1):7-13.
- [39] Braddock R, Siman CM, Hamilton K, et al. Gamma-linoleic acid and ascorbate improves skeletal ossification in offspring of diabetic rats [J]. Pediatric Research, 2002, 51(5):647-652.
- [40] Shirakura Y, Sugiyama T, Tanaka H, et al. Hyperleptinemia in female patients with ossification of spinal ligaments [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2000, 267(3):752-755.

- [41] Fan D, Chen Z, Chen Y, et al. Mechanistic roles of leptin in osteogenic stimulation in thoracic ligament flavum cells[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2007, 282(41):29958-29966.
- [42] Kumar H, Boban M, Tiwari M. Skeletal fluorosis causing high cervical myelopathy [J]. Journal of Clinical Neuroscience, 2009, 16(6):828-830.
- [43] 王哲,王全平. 氟化物对人体胸椎黄韧带骨化的细胞学行为特性的影响及相关实验研究[J]. 第四军医大学, 2002: 1-116.
- [44] Wang Z, Li XD, Li MQ, et al. Changes in basic metabolic elements associated with the degeneration and ossification of ligamenta flava[J]. The Journal of Spinal Cord Medicine, 2008, 31(3):279-284.
- [45] Lin GL, Hankenson KD. Integration of BMP, Wnt, and notch signaling pathways in osteoblast differentiation [J]. Journal of Cellular Biochemistry, 2011, 112(12):3491-3501.
- [46] Qu X, Chen Z, Fan D, et al. Notch signaling pathways in human thoracic ossification of the ligamentum flavum [J]. Journal of Orthopaedic Research, 2016, 34(8):1481-1491.
- [47] 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]. Journal of Cellular and Molecular Medicine, 2017, 21(6):1159-1170.
- [48] Yin J, Zhuang G, Zhu Y, 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 Biology International, 2017, 41(7):779-786.
- [49] Yang X, Qu X, Meng X, et al. MiR-490-3p inhibits osteogenic differentiation in thoracic ligamentum flavum cells by targeting FOXO1[J]. International Journal of Biological Sciences, 2018, 14(11):1457-1465.
- [50] Claes L, Recknagel S, Ignatius A. Fracture healing under healthy and inflammatory conditions[J]. Nature Reviews Rheumatology, 2012, 8(3):133-143.
- [51] Schmidt-Bleek K, Petersen A, Dienelt A, et al. Initiation and early control of tissue regeneration - bone healing as a model system for tissue regeneration [J]. Expert Opinion on Biological Therapy, 2014, 14(2):247-259.
- [52] Gerstenfeld LC, Cho TJ, Kon T, et al. Impaired fracture healing in the absence of TNF-alpha signaling: the role of TNF-alpha in endochondral cartilage resorption [J]. Journal of Bone and Mineral Research, 2003, 18(9):1584-1592.
- [53] Lories RJ, Schett G. Pathophysiology of new bone formation and ankylosis in spondyloarthritis[J]. Rheumatic Diseases Clinics of North America, 2012, 38(3):555-567.
- [54] Xing Y, Wang R, Chen D, et al. COX2 is involved in hypoxia-induced TNF-alpha expression in osteoblast [J]. Scientific Reports, 2015, 5:10020.
- [55] Wang B, Chen Z, Meng X, et al. iTRAQ quantitative proteomic study in patients with thoracic ossification of the ligamentum flavum [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2017, 487(4):834-839.
- [56] 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]. Current Rheumatology Reports, 2017, 19(4):17.
- [57] Osta B, Benedetti G, Miossec P. Classical and paradoxical effects of TNF-alpha on bone homeostasis [J]. Frontiers in Immunology, 2014, 5:48.
- [58] Zhang C, Chen Z, Meng X, et al. The involvement and possible mechanism of pro-inflammatory tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) in thoracic ossification of the ligamentum flavum [J]. PLoS One, 2017, 12(6):e0178986.
- [59] Yang X, Chen Z, Meng X, et al. Angiopoietin-2 promotes osteogenic differentiation of thoracic ligamentum flavum cells via modulating the Notch signaling pathway[J]. PLoS One, 2018, 13(12):e0209300.

(收稿日期:2020-09-15;修回日期:2020-10-19)