

· 基础研究 ·

骨桥蛋白及其受体在人黄韧带骨化标本中的表达及意义

李学斌, 陈雄生*, 许 政, 周盛源, 王智清, 许国峰

第二军医大学附属长征医院脊柱外科, 上海 200003

【摘要】目的 探讨骨桥蛋白(OPN)及其受体CD44、整合素在人黄韧带骨化(OLF)标本中的表达及意义。**方法** 2014年6月—2016年6月, 收集8例在本院接受胸椎后路椎板切除的OLF患者的骨化黄韧带标本以及8例非黄韧带骨化患者的正常黄韧带标本。对所得标本进行脱钙、切片、免疫组织化学染色以及细胞体外培养和蛋白质印迹检测, 观察黄韧带标本中OPN及其受体CD44、整合素的表达变化。**结果** OLF标本中的弹性纤维排列杂乱无章, 同时在骨化层可见大量软骨细胞; 正常黄韧带标本中则无上述表现。OLF标本中OPN及其受体CD44呈高表达, 且多在骨化区域的软骨细胞周围, 而整合素 $\beta 1$ 的表达较弱; 正常黄韧带标本中OPN及其受体呈低表达或不表达状态。通过对体外培养细胞进行蛋白质印迹检测发现骨化黄韧带细胞OPN的表达较正常黄韧带细胞增加。免疫细胞化学染色发现骨化黄韧带细胞整合素 $\beta 3$ 染色呈阳性, 而正常黄韧带细胞整合素 $\beta 3$ 的表达呈阴性或弱阳性; 蛋白质印迹检测发现骨化黄韧带细胞整合素 $\beta 3$ 的表达明显高于正常黄韧带细胞。**结论** OPN及其受体可能在OLF的发生过程中起关键作用。

【关键词】 胸椎; 黄韧带; 骨化, 异位性; 骨桥蛋白; 抗原, CD29; 整合素 $\beta 3$; 抗原, CD44

【中图分类号】 R 686.5 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1672-2957(2017)05-0289-05

【DOI】 10.3969/j.issn.1672-2957.2017.05.007

Expressions and significance of osteopontin and its receptors in human ossified ligamentum flavum

LI Xue-bin, CHEN Xiong-sheng*, XU Zheng, ZHOU Sheng-yuan, WANG Zhi-qing, XU Guo-feng

Department of Spinal Surgery, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China

【Abstract】Objective To explore the expression and significance of osteopontin(OPN) and its receptors CD44 and integrin in the ossification of the ligamentum flavum(OLF) to pave the way for further study of the pathogenesis of OLF.

Methods From June 2014 to June 2016, sections of the thoracic ligamentum flavum were obtained from 8 patients with OLF who underwent posterior thoracic decompression surgery, and from 8 control patients free of OLF. Cultured ligamentum flavum cells were examined with Western blotting for OPN. The harvested sections were examined by immunohistochemistry for the OPN and its receptors. **Results** The elastic fibers in the OLF samples were disordered, and a large number of chondrocytes were seen in the ossification front, but not in the normal ligamentum flavum samples. OPN and its receptor CD44 were highly expressed in the OLF samples, and mostly around the chondrocytes in the ossification region, while the expression of integrin $\beta 1$ was weak. The normal ligamentum flavum samples showed low expression or no expression of OPN and its receptors. The expression of the OPN in the OLF cells was higher than the control through the Western blotting. Immunocytochemistry staining showed that the expression of integrin $\beta 3$ in the OLF cells was significantly higher than that in the normal ligamentum flavum cells, and the same to the Western blotting analysis. **Conclusion** OPN and its receptors may play a key role in the pathogenic process of OLF.

【Key Words】 Thoracic vertebrae; Ligamentum flavum; Ossification, heterotopic; Osteopontin; Antigens, CD29; Integrin $\beta 3$; Antigens, CD44

J Spinal Surg, 2017, 15(5): 289-293

黄韧带骨化(OLF)作为一种脊柱独立的异位骨化症近几年被广泛关注, 其好发于下胸椎, 常与

后纵韧带骨化伴发, 常累及多个节段, 导致脊髓和神经根不同程度的压迫^[1-2]。手术切除是目前治疗OLF最好的方法, 但由于受压节段较多, 手术节段的选择困难, 且手术风险较大, 部分患者甚至需要多次行减压手术, 造成肢体和心理的严重创伤^[3-4]。目前对OLF的发生机制研究有限, 尚无有效的药物治疗方法。黄韧带局部的机械应力、基因、细

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81171753);
上海市科委重点基础项目(15140903800)

作者简介: 李学斌(1989—), 硕士, 医师;
lixuebin_2038@126.com

***通信作者:** 陈雄生 chenxiongsheng@vip.sohu.com

胞生物因素以及某些激素的异常可能与OLF的发生相关。Wongkhantee等^[5]研究发现, 韧带组织在受到牵张力作用时, 骨桥蛋白(OPN)的表达会上升, 其在骨化早期即可明显升高, 并聚集在新生骨边缘区域。而很多骨化诱导因子, 如骨形态发生蛋白2(BMP-2)^[6]、Osterix、Runx-2^[7]、转化生长因子 β 1(TGF- β 1)^[8]等均可使OPN表达增高。目前研究虽将OPN作为重要的成骨指标^[9-11], 然而鲜有关于OPN与OLF发生关系的研究报道。本研究通过对OLF患者大体标本的切片染色以及体外细胞培养来观察OPN及其受体在OLF中的表达变化及意义。

1 材料和方法

1.1 临床诊断以及脊柱韧带标本

2014年6月—2016年6月, 收集8例在本院接受胸椎后路椎板切除术治疗的OLF患者的骨化黄韧带标本以及8例非OLF患者的正常黄韧带标本。病例均经过X线、CT及MRI等影像学检查确诊, 并排除骨性关节炎、风湿以及甲状旁腺功能亢进等疾病, 所有患者术前均未长期大剂量使用糖皮质激素治疗。OLF组男2例、女6例, 年龄(50.12 ± 7.56)岁; 正常黄韧带组男3例、女5例, 年龄(48.88 ± 9.67)岁。取下的包含OLF节段的完整胸椎椎板以及正常黄韧带立即用无菌生理盐水浸湿的纱布包裹处理。胸椎椎板存放在盛有生理盐水的标本盒内, 4℃保鲜; 正常黄韧带标本放入装有4.0%多聚甲醛的25 mL无菌瓶中, 4℃保鲜; 6 h以内转移到实验室。标本的获取及实验目的均已向患者及家属告知并获得同意, 研究相关内容经第二军医大学伦理委员会审核批准。

1.2 标本处理

骨化组织标本先用骨凿将OLF区域的基底部凿穿, 将整块的OLF区域从胸椎椎板上完整取下, 用大量生理盐水冲掉表面的骨渣和残留的血迹。然后将2组组织块分别放到装有4.0%多聚甲醛的50 mL离心管中4℃固定至少48 h。固定好的组织块浸润到0.5 mol/L EDTA以及0.5 mol/L pH值为7.6的Tris-HCl中脱钙, 脱钙至标本可用刀片切割为止, 然后再进行石蜡包埋切片。

1.3 免疫组织化学染色

将石蜡包埋处理后的黄韧带标本按照厚度为4 μ m进行切片, 然后经过脱蜡水化、PBS冲洗3次、体积分数3.0% BSA封闭30 min后, PBS漂洗, DAB显色, Harris苏木精复染, 中性树胶封固后于显微镜下观察。

1.4 细胞分离培养

采用组织块贴壁法分离黄韧带细胞。将黄韧带组织切成0.5 mm $\times$ 1.0 mm $\times$ 1.0 mm的碎块, 均匀铺于10 cm培养皿中, 以体积分数10.0%胎牛血清、100 U/mL青霉素、0.1 g/L链霉素配制的DMEM培养液(Gibco公司)作为培养基, 在条件为体积分数5.0% CO₂、恒温37℃的培养箱中培养。待细胞达到80%融合时传代。

1.5 蛋白质印迹检测

体外培养的第三代黄韧带细胞经过裂解液处理后, 收集蛋白, 用BCA法(BCATM Protein Assay Kit, Pierce, 美国)进行蛋白定量。10.0% SDS-PAGE电泳、电转膜、封闭后, 分别加入一抗(OPN、整合素 β 3、整合素 β 1、CD44多克隆抗体, 1:1 000, Sigma公司, 美国)4℃孵育过夜, 然后用相应的HRP标记的二抗室温孵育1 h。加入增强型化学发光液, X线曝光, 显影、定影。利用图像分析系统(UVPs Gel Documentation System GDS 8000和Gel works LABWORK 4.0 Analysis Software)扫描确定目的条带的光密度值。

1.6 免疫细胞化学染色

将体外培养的第三代黄韧带细胞以 5×10^4 个/孔的密度接种于铺有盖玻片的6孔板中, 至细胞约60%融合时, PBS冲洗3次, 以40.0 g/L中性多聚甲醛固定15 min, 体积分数0.3% Triton X-100作用30 min, 体积分数3.0% BSA封闭30 min, 分别加入OPN多克隆抗体(1:100, Sigma公司, 美国)、CD44多克隆抗体(1:100, Sigma公司, 美国)及整合素 β 3多克隆抗体(1:50, Sigma公司, 美国), 4℃过夜。吸取一抗, 加入HRP标记的二抗, 室温孵育50 min; PBS漂洗, DAB显色, Harris苏木精复染, 中性树胶封固。

1.7 统计学处理

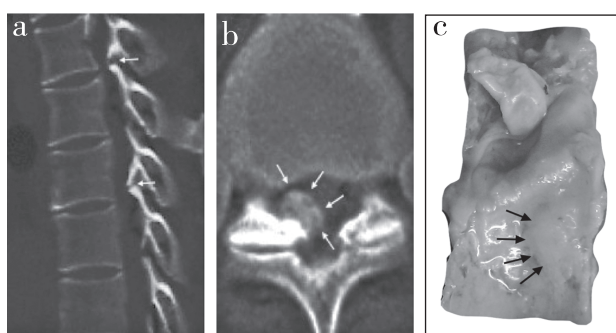
应用SPSS 19.0软件对数据进行统计学分析, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间差异比较采用 t 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 骨化物的影像学表现和大体观

OLF标本中骨化物的大体表现为类圆形, 并伴有坚硬的凸起, 靠近硬膜面较光滑平整, 矢状面CT可见骨化的黄韧带从下位椎板的上缘延伸至上位椎板的下缘, 而且在与椎板的连接处很难找到骨化物的界线(图1), 骨化物结合后突入椎管, 并导致椎管严重狭窄。同时合并硬膜囊骨化的2例患者, 大

体标本可见骨化和撕脱的硬膜囊。

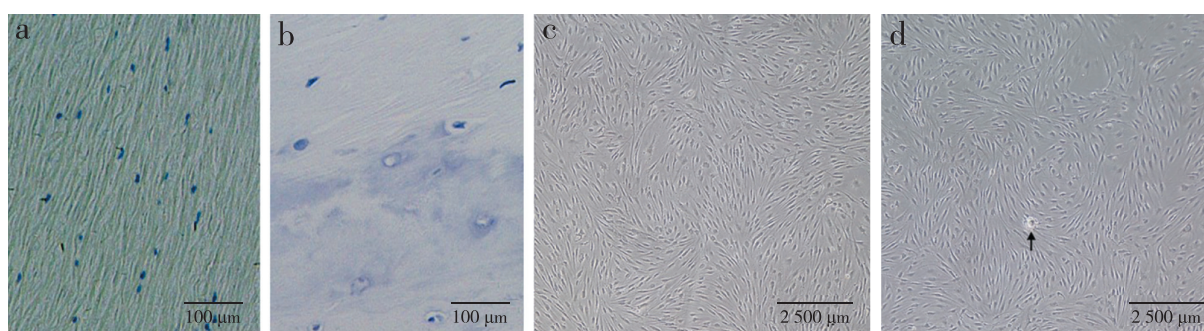


a: 矢状位CT b: 横断面CT示骨化的黄韧带(白色箭头) c: 标本示骨化的黄韧带和硬膜囊(黑色箭头)
a: Sagittal CT b: Transverse CT shows ossified ligamentum flavum (white arrows) c: General view shows ossified ligamentum flavum and dural sac (black arrows)

图1 OLF CT表现及组织标本
Fig. 1 CT and general view of OLF

2.2 纤维组织及细胞化学染色观察

正常黄韧带标本纤维排列整齐, 且少见毛细血管增生(图2a)。骨化的黄韧带标本中可见骨化层分为3层, 分别为纤维软骨层、骨化软骨层以及骨化层。在纤维软骨层, 可见纤维排列杂乱无章、纤维断裂; 在骨化软骨层, 可见大量的软骨陷窝以及增生肥大的软骨细胞, 细胞核及胞质透明; 在骨化层, 可见成骨细胞和间质细胞, 这些细胞大小不一, 排列杂乱无章, 形状不规则, 细胞核和胞质蓝染(图2b)。体外培养的正常黄韧带细胞以纺锤形纤维细胞为主, 含少量多边形细胞(图2c); 骨化黄韧带细胞以纺锤形纤维细胞为主, 含部分多边形细胞及少量较大的不规则细胞, 可见结节形成(图2d)。



a: 正常黄韧带组织 b: 骨化的黄韧带组织 c: 正常黄韧带细胞 d: 骨化的黄韧带细胞, 可见结节形成(黑色箭头)
a: Normal ligamentum flavum tissue b: Ossified ligamentum flavum tissue c: Normal ligamentum flavum cells d: Ossified ligamentum flavum cells, visible nodule formation (black arrow)

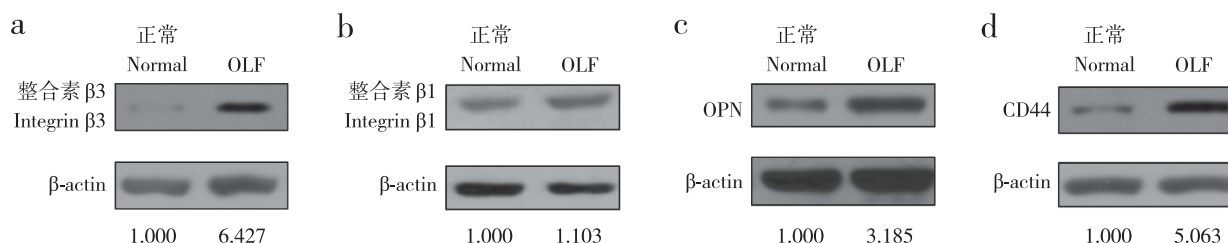
图2 正常和骨化黄韧带组织及细胞化学染色

Fig. 2 Histochemical staining of normal and ossified ligamentum flavum tissues and cells

2.3 蛋白质印迹以及免疫细胞化学染色

蛋白质印迹检查结果发现, 骨化黄韧带细胞中OPN、整合素β3以及CD44表达均较正常黄韧带细胞增加, 而整合素β1的表达未见明显增加(图3)。

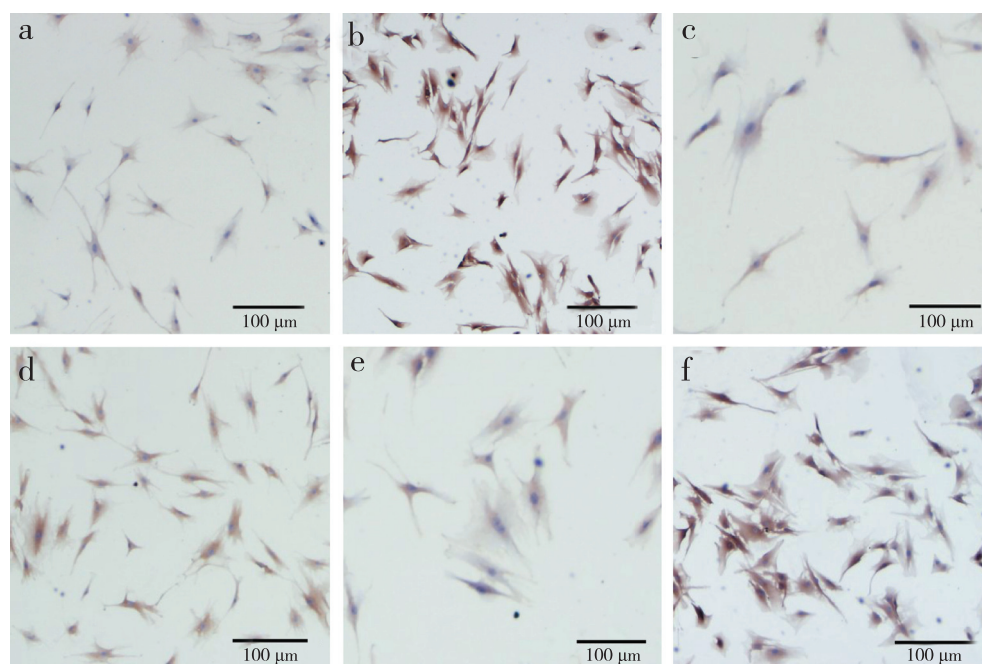
免疫细胞化学染色发现骨化黄韧带细胞中OPN及其受体整合素β3、CD44的表达呈阳性; 正常黄韧带细胞中OPN及CD44的表达呈阴性, 整合素β3的表达呈阴性或弱阳性(图4)。



a: 整合素β3 b: 整合素β1 c: OPN d: CD44
a: Integrin β3 b: Integrin β1 c: OPN d: CD44

图3 蛋白质印迹检测

Fig. 3 Western blotting detection



a: 正常黄韧带细胞整合素 $\beta 3$ 染色可见细胞核呈蓝色, 部分胞质可见淡褐色 b: 骨化黄韧带细胞整合素 $\beta 3$ 染色可见细胞核呈蓝色, 胞质呈深棕色 c: 正常黄韧带细胞 OPN 染色可见细胞核呈蓝色, 部分胞质可见淡褐色 d: 骨化黄韧带细胞 OPN 染色可见细胞核呈蓝色, 胞质呈棕色 e: 正常黄韧带细胞 CD44 染色可见细胞核呈蓝色, 部分胞质可见淡褐色 f: 骨化黄韧带细胞 CD44 染色可见细胞核呈蓝色, 胞质呈深棕色

a: Integrin $\beta 3$ staining of normal ligamentum ligament cells shows that nucleus is blue, and some cytoplasm appears pale brown b: Integrin $\beta 3$ staining of ossified ligamentum flavum cells shows blue nucleus and dark brown cytoplasm c: OPN staining of normal ligamentum ligament cells shows that nucleus is blue, and some cytoplasm appears pale brown d: OPN staining of ossified ligamentum flavum cells shows that nucleus is blue, and cytoplasm appears brown e: CD44 staining of normal ligamentum ligament cells shows that nucleus is blue, and some cytoplasm appears pale brown f: CD44 staining of ossified ligamentum flavum cells shows that nucleus blue nucleus and dark brown cytoplasm

图4 免疫细胞化学染色

Fig. 4 Immunocytochemical staining

3 讨 论

人的正常黄韧带组织共分为2层, 纵行排列构成了椎管的后壁, 限制脊柱的过屈活动并在维持脊柱稳定性上起重要作用^[12]。正常黄韧带富有弹性, 主要是因为其含有大量的弹性纤维, 弹性纤维占其干质量的60%~70%^[13]。随着年龄的增长以及体内激素水平的失衡, 弹性纤维虽依然纵行排列, 但纤维直径和黏弹性都在下降^[14-15]。而当黄韧带发生病理性退变时, 其内的弹性纤维排列会杂乱无章, 甚至出现断裂现象。本研究通过组织切片染色方法对骨化的黄韧带进行观察, 发现黄韧带排列杂乱无章, 随处可见纤维变细甚至断裂现象, 同时骨化的黄韧带明显分为骨化层、骨化软骨层以及纤维软骨层3层结构, 内部可见大量软骨陷窝以及增生肥大的软骨细胞, 纤维软骨层可见毛细血管增生。上述发现提示OLF区域局部血供丰富, 这可能是由于局

部血管生长因子的激活, 同时也解释了OLF切除手术中出血量较大的原因^[16]。

OLF的发生与多种因素相关, 激素^[17]、生物因子^[18]、局部的机械应力^[19]、糖代谢以及遗传因素^[20]等都参与其中。万玉民等^[21]研究表明, OPN能刺激成骨细胞增殖、钙化, 介导机械应力引起的骨代谢变化。OPN属于蛋白质的SIBLING家族, 其N'端区域包含精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(RGD)三肽序列, 与细胞表面上的受体整合素 $\alpha v \beta 1$ 、 $\alpha v \beta 3$ 、 $\alpha v \beta 5$ 和 $\alpha 8 \beta 1$ 相结合^[22]; 其C'端区域还可与CD44相互作用(与RGD序列无关)^[23]。在异位骨化的早期即可发现OPN的表达增加, 并且在骨化越明显的区域其沉积越多^[24], 因此OPN可能是促进OLF发生的一个重要因子。本研究通过免疫组织化学染色方法对OLF组织标本进行观察, 发现OPN呈高表达, 且在软骨层聚集, 在血管内皮细胞中表达较显著, 同时其受体CD44的表达也呈强阳性。而在正

常黄韧带组织中OPN及其受体表达较弱甚至不表达。通过文献回顾发现在间充质干细胞中的成骨过程中OPN主要是通过整合素 $\beta 1$ 相结合促进成骨转化^[22],但本实验在OLF标本中未见整合素 $\beta 1$ 的表达。但发现骨化的黄韧带细胞中整合素 $\beta 3$ 的表达明显高于正常的黄韧带细胞。研究发现整合素 $\beta 3$ 与 Ca^{2+} 介导的信号转导相关^[25]。因此,OPN可能是通过与受体CD44以及整合素 $\beta 3$ 的相互作用参与到了黄韧带异位骨化的进程中,但整合素 $\beta 1$ 受体则不参与其中。

为了进一步研究细胞水平OPN表达的变化,本研究根据前期方法^[26]体外培养了黄韧带细胞。通过对体外培养的细胞进行蛋白质印迹检测发现骨化的黄韧带细胞OPN的表达明显高于正常黄韧带细胞,再结合免疫组织化学染色结果,发现OPN可能通过与CD44受体结合对OLF的发生起关键作用。本实验提出OPN可能是介导OLF发生的关键因子。因OPN以及CD44、整合素 $\beta 3$ 都参与机体组织的修复过程^[27]以及损伤组织的血管再生,因此在黄韧带损伤修复过程中,OPN及CD44、整合素 $\beta 3$ 的参与可能会导致黄韧带向骨化方向发展,促进损伤的黄韧带中弹性纤维与胶原纤维比例的失调,并诱发生成纤维细胞成骨分化以及炎症因子的聚集,为黄韧带异位骨化的发生创造成骨微环境。但具体作用机制还需进一步实验去验证。

参考文献

- [1] Baba H, Maezawa Y, Imura S, et al. Spinal cord evoked potential monitoring for cervical and thoracic compressive myelopathy[J]. Paraplegia, 1996, 34(2): 100-106.
- [2] 贾连顺. 黄韧带骨化与胸椎椎管狭窄症[J]. 脊柱外科杂志, 2007, 5(3): 185-187.
- [3] Jia LS, Chen XS, Zhou SY, et al. En bloc resection of lamina and ossified ligamentum flavum in the treatment of thoracic ossification of the ligamentum flavum[J]. Neurosurgery, 2010, 66(6): 1181-1186.
- [4] Inamasu J, Guiot BH. A review of factors predictive of surgical outcome for ossification of the ligamentum flavum of the thoracic spine[J]. J Neurosurg Spine, 2006, 5(2): 133-139.
- [5] Wongkhanthee S, Yongchaitrakul T, Pavasant P. Mechanical stress induces osteopontin expression in human periodontal ligament cells through rho kinase[J]. J Periodontol, 2007, 78(6): 1113-1119.
- [6] Kim HN, Min WK, Jeong JH, et al. Combination of Runx2 and BMP2 increases conversion of human ligamentum flavum cells into osteoblastic cells[J]. BMB Rep, 2011, 44(7): 446-451.
- [7] 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.
- [8] 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(Phila Pa 1976), 2007, 32(25): 2834-2838.
- [9] 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.
- [10] 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.
- [11] Chan SC, Tekari A, Benneker LM, et al. Osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells is hindered by the presence of intervertebral disc cells[J]. Arthritis Res Ther, 2015, 18: 29.
- [12] Olszewski AD, Yaszemski MJ, White AA 3rd. The anatomy of the human lumbar ligamentum flavum. New observations and their surgical importance[J]. Spine(Phila Pa 1976), 1996, 21(20): 2307-2312.
- [13] Osakabe T, Hayashi M, Hasegawa K, et al. Age- and gender-related changes in ligament components[J]. Ann Clin Biochem, 2001, 38(Pt 5): 527-532.
- [14] Yayama T, Baba H, Furusawa N, et al. Pathogenesis of calcium crystal deposition in the ligamentum flavum correlates with lumbar spinal canal stenosis[J]. Clin Exp Rheumatol, 2005, 23(5): 637-643.
- [15] Blacher J, Dabire H, Pomies JP, et al. Long-term cardiovascular effects of high "osteoprotective" dose levels of 17 beta-estradiol in spontaneously hypertensive rats[J]. Cardiovasc Drugs Ther, 2000, 14(3): 303-307.
- [16] Li WJ, Guo SG, Sun ZJ, et al. Multilevel thoracic ossification of ligamentum flavum coexisted with/without lumbar spinal stenosis: staged surgical strategy and clinical outcomes[J]. BMC Musculoskelet Disord, 2015, 16: 206.
- [17] Fan D, Chen Z, Chen Y, et al. Mechanistic roles of leptin in osteogenic stimulation in thoracic ligament flavum cells[J]. J Biol Chem, 2007, 282(41): 29958-29966.

(下转第313页)

- [28] Trumm CG, Pahl A, Helmberger TK, et al. CT fluoroscopy-guided percutaneous vertebroplasty in spinal malignancy: technical results, PMMA leakages, and complications in 202 patients[J]. *Skeletal Radiol*, 2012, 41(11): 1391-1400.
- [29] Kim YJ, Lee JW, Park KW, et al. Pulmonary cement embolism after percutaneous vertebroplasty in osteoporotic vertebral compression fractures: incidence, characteristics, and risk factors[J]. *Radiology*, 2009, 251(1): 250-259.
- [30] Iliopoulos P, Korovessis P, Vitsas V. PMMA embolization to the left dorsal foot artery during percutaneous vertebroplasty for spinal metastases[J]. *Eur Spine J*, 2014, 23(Suppl 2): 187-191.
- [31] Reidy D, Ahn H, Mousavi P, et al. A biomechanical analysis of intravertebral pressures during vertebroplasty of cadaveric spines with and without simulated metastases[J]. *Spine(Phila Pa 1976)*, 2003, 28(14): 1534-1539.
- [32] Axelsen M, Thomassen LD, Bünge C, et al. Estimating risk of pulmonary neoplastic embolism during vertebroplasty[J]. *Spine(Phila Pa 1976)*, 2012, 37(7): 551-556.
- [33] 陆军, 邓敬兰, 赵海涛, 等. 脊柱转移瘤放疗联合椎体成形术治疗的前瞻性研究[J]. *中华放射肿瘤学杂志*, 2005, 14(1): 42-46.
- [34] Gasbarrini A, Boriani S, Capanna R, et al. Management of patients with metastasis to the vertebrae: recommendations from the Italian Orthopaedic Society (SIOT) bone metastasis study group[J]. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2014, 14(2): 143-150.
- [35] De la Garza-Ramos R, Benvenuti-Regato M, Caro-Orsorio E. Vertebroplasty and kyphoplasty for cervical spine metastases: a systematic review and meta-analysis[J]. *Int J Spine Surg*, 2016, 26, 10: 7.
- [36] Lee B, Franklin I, Lewis JS, et al. The efficacy of percutaneous vertebroplasty for vertebral metastases associated with solid malignancies[J]. *Eur J Cancer*, 2009, 45(9): 1597-1602.

(收稿日期: 2017-01-20)

(本文编辑: 张建芬)

(上接第293页)

- [18] Uchida K, Yayama T, Cai HX, et al. Ossification process involving the human thoracic ligamentum flavum: role of transcription factors[J]. *Arthritis Res Ther*, 2011, 13(5): R144.
- [19] 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]. *Med Eng Phys*, 2013, 35(9): 1266-1271.
- [20] Mobbs RJ, Dvorak M. Ossification of the ligamentum flavum: diet and genetics[J]. *J Clin Neurosci*, 2007, 14(7): 703-705.
- [21] 万玉民, 马永洁, 张晓铀, 等. 回转对离体大鼠成骨细胞中骨粘连蛋白及骨桥素 mRNA 的影响[J]. *生理学报*, 2005, 57(3): 384-388
- [22] Chen Q, Shou P, Zhang L, et al. An osteopontin-integrin interaction plays a critical role in directing adipogenesis and osteogenesis by mesenchymal stem cells[J]. *Stem Cells*, 2014, 32(2): 327-337.
- [23] Inoue M, Shinohara ML. Intracellular osteopontin (iOPN) and immunity[J]. *Immunol Res*, 2011, 49(1/2/3): 160-172.
- [24] Hirota S, Asada H, Kohri K, et al. Possible role of osteopontin in deposition of calcium phosphate in human pilomatricomas[J]. *J Invest Dermatol*, 1995, 105(1): 138-142.
- [25] Zimolo Z, Wesolowski G, Tanaka H, et al. Soluble alpha v beta 3-integrin ligands raise $[Ca^{2+}]_i$ in rat osteoclasts and mouse-derived osteoclast-like cells[J]. *Am J Physiol*, 1994, 266(2 Pt 1): C376-C381.
- [26] 许政, 周盛源, 李学斌, 等. 骨桥蛋白及其受体在黄韧带骨化症黄韧带细胞中的表达及其意义[J]. *中国组织工程研究*, 2016, 20(2): 179-184.
- [27] Denhardt DT, Noda M, O'Regan AW, et al. Osteopontin as a means to cope with environmental insults: regulation of inflammation, tissue remodeling, and cell survival[J]. *J Clin Invest*, 2001, 107(9): 1055-1061.

(收稿日期: 2017-05-17)

(本文编辑: 于倩)