

· 临床研究 ·

基于 MDLC-MS/MS 技术的股骨头缺血性坏死的组织蛋白质组分析

张雷¹, 杨国敬¹, 王琚², 严世贵³

(1. 温州医学院附属第三医院骨科, 浙江 温州 325200; 2. 浙江大学浙江加州国际纳米技术研究院; 3. 浙江大学医学院附属第二医院)

【摘要】 目的: 应用组织蛋白质组学方法探寻与成人非创伤性股骨头缺血性坏死(ONFH)相关的蛋白质。方法: 自 2008 年 7 月至 2009 年 2 月, 从非创伤性 ONFH(男 7 例, 女 3 例)和新鲜股骨颈骨折(男、女各 5 例)而行人工髋关节置换术的患者中随机选取 10 例, 平均年龄分别为 52 岁和 63 岁。术中取 ONFH 患者股骨头中坏死骨组织为试验组, 取股骨颈骨折患者股骨头中的正常骨组织样品为对照组。用四步溶剂法提取骨组织总蛋白, 经 SDS-PAGE 分离和酶解, 应用多维液相色谱与串联质谱联用技术分离鉴定组织蛋白, 以 TPP 软件检测两组蛋白质的差异表达水平, 并用 Turbo SEQUEST 软件鉴定差异表达蛋白质。同时 Western 免疫印迹验证质谱检测的准确性。结果: 试验组和对照组样品中分别鉴定二肽段以上的高可信度蛋白质数量 1 233 个和 999 个, 假阳性率 0.8%。试验组中共鉴定差异表达蛋白质 192 个, 其中表达量上调 3 倍以上的蛋白点 107 个, 下调 3 倍以上 53 个, 其中 34 种蛋白质与 ONFH 密切相关。Western 免疫印迹证实试验组样品中 GPCR26 和 CHST2 表达量下调, 与质谱结果一致。结论: 非创伤性 ONFH 存在复杂的病理生理学过程, 本研究发现的差异表达蛋白极有可能成为 ONFH 早期临床诊断的候选生物学标志物。

【关键词】 股骨头坏死; 蛋白质组学; 色谱法; 光谱分析, 质量

DOI: 10.3969/j.issn.1003-0034.2011.03.011

High throughput proteomic analysis of non-traumatic osteonecrosis of the femoral head ZHANG Lei*, YANG Guojing, WANG Jun, YAN Shi-gui. *Department of Orthopaedics, the 3rd Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Wenzhou 325200, Zhejiang, China

ABSTRACT **Objective:** To explore proteins associated with non-traumatic osteonecrosis of the femoral head in adults by using high throughput proteomic approach. **Methods:** From July 2008 to February 2009, 10 patients with non-traumatic osteonecrosis of the femoral head (7 males, 3 females) and 10 patients with fresh femoral head fracture (5 males, 5 females) who underwent total hip arthroplasty were enrolled randomizedly in the study. The median age was 52 years and 63 years respectively. Necrotic bone tissues were harvested as experimental group from the femoral head of patients with osteonecrosis of the femoral head, and normal bone tissues were collected as the control group from the patients with femoral head fracture. After bone tissues were demineralized, total bone proteins were extracted sequentially by using four different lysis buffers. Thereafter, SDS-PAGE, in-gel digestion and subsequent multi-dimensional liquid chromatography-tandem mass spectrometry (MDLC-MS/MS) were applied to separate and identify the extracted proteins. Different expression level of the proteins in both groups was investigated by TPP software, and different expression protein analysis was then carried out by Turbo SEQUEST. Western blot was applied finally to evaluate the accuracy of mass spectrometry. **Results:** The in-depth proteome analysis in experimental and control groups revealed 1 233 and 999 high-confidence proteins with two or more peptides respectively, and the false-positive rate was 0.8%. In total, 192 differentially expressed proteins were identified in experimental samples. At compared with the control, 107 and 53 proteins were identified with the level upregulated and downregulated at least 3 folds respectively. Among them, 34 proteins were found highly associated with osteonecrosis of the femoral head. Downregulated expression of GPCR26 and CHST2, similar with results of mass spectrometry analysis, were confirmed by Western blot in the necrotic bone tissues. **Conclusion:** The pathogenesis of the non-traumatic osteonecrosis of the femoral head has been demonstrated a complicated process and remained unknown. These identified differentially expressed proteins might be promising biomarker candidates for early diagnosis of the devastating disease. This study sheds new light on novel approach to understand the pathogenesis of osteonecrosis of the femoral head.

基金项目: 浙江省医药卫生科学研究基金(编号: 2007B207)

Fund program: Supported by Medical Scientific Research Foundation of Guangdong Province (NO: 2007B207)

通讯作者: 张雷 Tel: 0577-65866110 E-mail: denzel_zhang@163.com

KEYWORDS Femoral head necrosis; Proteomics; Chromatography; Spectrum analysis, mass

Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2011, 24(3): 213-217 www.zggszz.com

股骨头缺血性坏死 (osteonecrosis of the femoral head, ONFH) 是骨科临床上的常见病, 目前已成为最常见的中青年髋关节疾病^[1]。近年来研究发现 ONFH 存在极高的遗传背景和基因多态性^[1-3], 少数血清蛋白质组学研究发现 ONFH 与多种蛋白的高表达密切相关^[4-5]。然而, 人类对骨组织蛋白的研究还处于起步阶段, 大部分实验技术仅限于单个或数个蛋白质的鉴定。蛋白质组学研究大多基于双向凝胶电泳 (2-DE) 和基质辅助激光解析电离飞行时间质谱 (MALDI-TOF MS) 技术, 存在低通量、低分子量检测和低丰度蛋白质的灵敏性不高等缺点。此外, 骨组织特殊的矿化结构也严重限制了骨组织蛋白的研究。多维液相色谱与串联质谱联用 (MDLC-MS/MS) 技术可避免上述缺点, 并能用于大规模的蛋白质分离和鉴定, 该技术已在动物骨组织蛋白的研究中取得了重大突破^[6], 但目前还未见在 ONFH 中的应用。为此, 本试验采用鸟枪法 (shotgun) 和 MDLC-MS/MS 高通量的蛋白质组分析技术, 对成人非创伤性 ONFH 的组织蛋白进行分析, 现报告如下。

1 资料与方法

1.1 临床样品收集和分组 自 2008 年 7 月至 2009 年 2 月住院手术的 23 例符合标准并因非创伤性 ONFH 而行全髋关节置换术的患者中随机抽取 10 例纳入试验组。纳入标准: 所有由非创伤性因素引起, 术前影像学提示 ARCO 1~3 期^[7] 的 ONFH 患者。剔除标准: 外伤因素引起, 既往有髋关节手术史, 或合并全身代谢性疾病, 如 Paget 病、骨质疏松症、肿瘤伴骨转移的患者。试验组中女 3 例, 男 7 例; 平均年龄 52 岁; ARCO 1 期 4 例, 2 期 3 例, 3 期 3 例。于同期 63 例新鲜股骨颈骨折中随机选取 10 例作为对照组, 其中女 5 例, 男 5 例, 平均年龄 63 岁。

术中根据术前影像在试验组股骨头坏死区域和对照组股骨头中获取骨组织块 (10 mm×10 mm×2 mm)。取样后立即经液氮速冻, -80 °C 保存, 并在术后病理组织检测证实采样准确无误。

1.2 仪器与试剂 Ettan 多维色谱 nanoflow/capillary 层析系统, Finnigan LTQ-Orbitrap 质谱仪及 BioBasic SCX 离子交换柱 (0.3 mm×30 mm), 均购自美国热电公司。Trap 柱 (Dionex/LC Packings μ -Pre-column Cartridge P/N 160454 C18 PepMap 100, 5 μ m, 100Å, 300 μ m i.d.×5 mm) 和 RPC 柱 (Dionex/LC Packings P/N 160321 150×0.075 mm i.d., C18 PepMap, 3 μ m, 100Å) 均为美国 Dionex 公司产品。Amicon ultra-15 过滤离心管 (ultracel-3 超滤膜) 购自

美国 Millipore 公司。

HPLC 级乙腈 (ACN) 购自韩国 Burdick & Jackson 公司; 盐酸胍和碳酸氢铵均购自于日本 FLUKA 公司; 蛋白酶抑制剂混合物购自德国罗氏公司; 三羧乙基磷 (TCEP)、考马斯亮蓝 G-250 和碘乙酰胺 (I-AA) 购自美国 Sigma 公司; 测序级胰蛋白酶购自于美国 Promega 公司; ECL 超敏发光液购自美国 Pierce 公司。Isoform 1 of Carbohydrate sulfotransferase 2 (CHST2) 抗体试剂盒购自瑞典 Atlas 公司, Probable G-protein coupled receptor 26 (GPCR26) 抗体购自英国 Abcam 公司。PVDF 膜购自瑞典 Amersham Pharmacia 公司。

1.3 试验方法

1.3.1 组织蛋白提取和酶解 四步溶剂法提取骨组织蛋白: 取 150 mg 骨样品, 含蛋白酶抑制剂的 PBS 液 (pH 7.4) 冲洗去杂质, 4 °C 冰箱过夜。1.2 M HCl 脱矿, 4 °C 冰箱过夜, 离心后取上清液为提取物 1。剩余液加入含蛋白酶抑制剂的 100 mM Tris, 6 M 盐酸胍 (pH 7.4) 4 °C 培育 72 h。离心后取上清液为提取物 2。剩余液再加入 pH 7.4 含蛋白酶抑制剂的 100 mM Tris, 6 M 盐酸胍, 0.5 M 乙二胺四醋酸四钠, 4 °C 培育 72 h, 离心后取上清液为提取物 3。最后残余液加入 6 M HCl 4 °C 过夜, 离心后取上清液为提取物 4。收集所有提取物, 由 Amicon Ultra-15 离心过滤器收集并浓缩, BCA 法蛋白定量。

取 40 μ g 样品以 SDS-PAGE 分离蛋白质。凝胶考马斯亮蓝 G-250 染色, 室温振摇脱色。将凝胶斑点切成 1 mm³ 小胶块, 加入 30 μ l 200 mmol/L IAA, 室温避光反应 1 h。加入 50 μ l CAN, Speedvac 加热干燥。加入 2 μ l 测序级胰蛋白酶室温静置 15 min, 37 °C 温育过夜。加入 50 μ l 蛋白提取液 (50% ACN, 5% 甲酸) 超声波振荡 10 min, 离心后收集并保存上清液。重复上述操作 3 次, 取上清液浓缩干燥后 -20 °C 保存。

1.3.2 质谱分析 重悬样品于 0.1% 甲酸的 30 μ l 水中, 15 000 r/min 离心 5 min, 用二维液相色谱串联质谱 (2D-LC-MS/MS) 技术实现多肽的分离和鉴定。在 2D-LC 的离线设置中, 样品吸附在 SCX 离子交换柱, 逐级增加的盐酸浓度梯度 (10, 50, 100, 500 mM of NH₄Cl) 依次洗脱到 Trap 柱上并在 RPC 柱上分离。分离所得的肽段转入 LTQ-Orbitrap 质谱仪进行蛋白质分析鉴定。在 LTQ 对 m/z 400 的离子富集到 1×10⁶ 个的目标数后, Orbitrap 质量分析器在分辨率 60 000 的条件下进行全扫描 (m/z 300-2000)。挑选 5 个最高峰值的离子打碎扫描, 所得离子碎片由 Orbitrap

质量分析器在分辨率 15 000(m/z 400)的条件下记录。

1.3.3 Western 免疫印迹 试验组和对照组样品中提取的蛋白于 SDS-PAGE 凝胶上分离并转移到 PVDF 膜。25 ml 含 5% 脱脂奶的 TBST 缓冲液封闭, 室温摇匀, 加入 CHST2 和 GPCR26 等一抗 4 °C 培育过夜。再用 TBST 缓冲液室温洗涤 3 次, 加入 1:1 500 的辣根过氧化物酶标记的二抗, 室温培育 1 h。ECL 超敏发光液显色, 凝胶成像系统分析结果, 并与内参照 β -actin 的蛋白表达水平比较。

1.4 观察指标和数据处理方法 用 Xcalibur Qual Browser 2.0 软件 (Thermo Finnigan, Bremen, Germany) 计算肽段的峰值目录。所得串联质谱数用 BioWorks3.2 软件组套 (Thermo Electron, Inc., Waltham, MA USA) 中的 Turbo SEQUEST 软件在人类 ipi.HUMAN.v3.34.fasta 数据库 (<http://www.ebi.ac.uk/IPI/IPIhuman.html>) 中查询蛋白种类。Turbo SEQUEST 软件的参数中 “Fragment Mass Tolerance” 设置为 “1Da”; “Xcorr” 最小值在设置为 “1.5”、“2.0” 和 “2.5” 时分别被认为单电荷肽段、双电荷肽段和三电荷肽段, 设置 “ ΔCn ” 临界值为 “0.1”。在 “Mascot Search” 中选择 “Decoy 随机序列数据库” 以计算检测的假阳性率。

LTQ–Orbitrap 鉴定所得的 MS/MS 数据通过 TPP 网络界面工具转换为 mzXML 格式。用 TPP 软件包中的 PeptideProphet 和 ProteinProphet 软件检测试验组和对照组样品中蛋白质的差异表达水平, 用 Turbo SEQUEST 软件鉴定样品中的差异表达蛋白质。

2 结果

2.1 蛋白提取数量 试验组和对照组样品中在单位骨组织提取的蛋白量分别为 768 mg/g 和 5.82 mg/g。试验组和对照组样品中二肽段以上的高可信度蛋白质数分别为 1 233 个和 999 个 (见表 1、图 1), 假阳性率为 0.8%。

2.2 差异蛋白质数量和功能 共鉴定差异表达蛋白质 192 个, 其中在试验组中相对于对照组表达量上调 3 倍以上的蛋白点 107 个, 下调 3 倍以上的 53 个。经生物信息学分析, 这些差异表达蛋白属分泌蛋白, 大多数为机体组织和细胞分泌并脱落到血液中的功能蛋白质。结合 ONFH 的生理和病理变化特点, 发现其中 34 种蛋白质与 ONFH 密切相关 (表 2)。

2.3 Western 印迹验证 GPCR26 和 CHST2 在试验组表达量降低。Western 印迹结果也显示试验组样品的 GPCR26 和 CHST2 表达量也明显下调, 与质谱分析结果一致, 证实质谱检测数据的可靠性。

表 1 四步溶剂法提取所得的骨组织蛋白量、肽段数及二肽段以上蛋白数

Tab.1 Amounts of extracted proteins and their peptide and protein identifications after proteomics analysis

分组	蛋白 提取物	蛋白质量/骨组 织质量 (mg/g)	肽段数 (个)	蛋白数 (个)*
试验组	提取物 1	3.01	1 664	708
	提取物 2	2.88	1 246	314
	提取物 3	0.44	642	232
	提取物 4	1.35	733	183
对照组	提取物 1	1.63	2 308	811
	提取物 2	2.04	458	174
	提取物 3	0.23	310	72
	提取物 4	1.92	216	32

注: *Xcorr 在单、双、三电荷肽段最小值设置为 1.5、2.0 和 2.5, ΔCn 为 0.1, 假阳性率小于 5%, 二肽段以上的蛋白质

Note: *Accepted partly tryptic peptides only. Xcorr at least 1.5, 2.0, and 2.5 for singly, doubly, and triply charged peptide ions, respectively. $\Delta Cn = 0.1$. False-positive rate less than 5% and with at least two peptides per protein

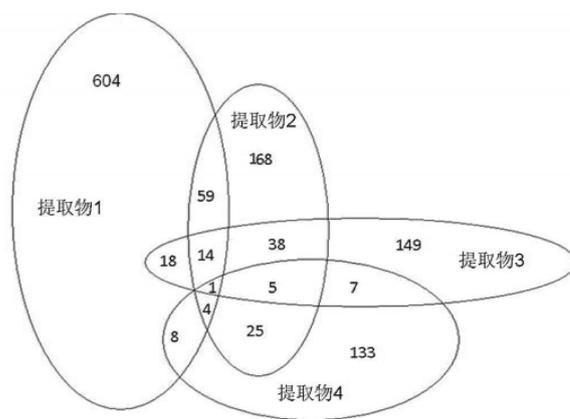


图 1 表 1 中试验组 4 部分提取物中分离得到的蛋白数示意图

Fig.1 Venn-diagram showing the amount of extracted protein as listed in Tab.1

3 讨论

3.1 高通量质谱技术的发展 随着离子化技术和联用技术的开发和不断完善, 现代质谱技术开始应用于生物大分子的分析, 2002 年获诺贝尔化学奖的 MALDI 和 ESI 软电离技术的发明使生物质谱的发展和推广使用尤为迅速^[8]。这两项技术具有高灵敏度和高质量检测范围, 使得在 pmol (10^{-12}) 甚至 fmol (10^{-15}) 的水平上准确地分析分子量高达几万到几十万的生物大分子成为可能, 从而使质谱技术真正走入了生命科学的研究领域^[9-10]。然而, 生命科学所采用的蛋白分离鉴定技术大多为 MALDI-TOF MS 和 SELDI-TOF MS, 尽管可以克服 2-DE 存在的低分子量、低丰度蛋白质检测的灵敏性等缺点, 能够直接地

表 2 与非创伤性股骨头缺血性坏死高度相关的差异表达蛋白质

Tab. 2 Differentially expressed proteins highly associated with non-traumatic necrosis of femoral head

IPI 代码	差异表达蛋白质	所属基因
IPI00045337	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 13C	TNFRSF13C
IPI00759542	Isoform 8 of Titin	TTN
IPI00307223	IL1B Interleukin-1 beta precursor	IL1B
IPI00107433	Isoform 3 of Bcl-2/adenovirus E1B 19 kDa-interacting protein 2-like protein	BNIPL
IPI00007109	Zinc finger protein 409	ZNF409
IPI00168597	Probable G-protein coupled receptor 26	GPCR26
IPI00021891	Isoform Gamma-B of Fibrinogen gamma chain precursor	FGG
IPI00166504	Isoform 2 of PX domain-containing protein SNX29	LOC92017
IPI00045512	Hemicentin 1	HMCN1
IPI00292300	Contactin associated protein-like 5 isoform 1	CNTNAP5
IPI00297224	Sushi domain-containing protein 5	SUSD5
IPI00022434	Lumican precursor	LUM
IPI00014592	Chondroadherin precursor	CHAD
IPI00554648	Keratin, type II cytoskeletal 8	KRT8
IPI00297646	Collagen alpha-1(I) chain precursor	COL1A1
IPI00418169	Annexin A2 isoform 1	ANXA2
IPI00020987	Prolargin precursor	PRELP
IPI00007960	Isoform 1 of Periostin precursor	POSTN
IPI00000940	Parathyroid hormone precursor	PTH
IPI00179357	Isoform 7 of Titin	TTN
IPI00219018	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GAPDH
IPI00744115	Propionyl-Coenzyme A carboxylase, alpha polypeptide precursor	PCCA
IPI00098769	Isoform 1 of Carbohydrate sulfotransferase 2	ChST2
IPI00021841	Apolipoprotein A-I precursor	APOA1
IPI00451401	Isoform 2 of Triosephosphate isomerase	TPI1
IPI00296099	Thrombospondin-1 precursor	THBS1
IPI00553177	Alpha-1-antitrypsin precursor	SERPINA1
IPI00032179	Antithrombin III variant	SERPINC1
IPI00006114	Pigment epithelium-derived factor precursor	SERPINF1
IPI00398715	Neuropilin 1	NRP1
IPI00412224	Bromodomain and WD repeat domain-containing protein 2	BRWD2
IPI00018246	Isoform 1 of Hexokinase-1	HK1
IPI00303343	Serine arginine-rich pre-mRNA splicing factor SR-A1	SCAF1
IPI00328091	Isoform 1 of Netrin-4 precursor	NTN4

从没有预处理的样品中发现生物标志物及蛋白质质谱,样品体积也可低到 0.5 μl,却不能进行高通量的蛋白检测,无法获得详细的序列结果。此外,MALDI-TOF MS 由于没有经 HPLC 系统去除杂质,对样品污染等问题尤为敏感,因此数据可信度明显下降。MDLC-MS/MS 技术可有效地克服上述缺点,作为识别和鉴定一些通常难以使用其他方法分离的蛋白质(例如低丰度蛋白、疏水膜蛋白、极小和极大蛋白以及极碱和极酸蛋白)的一种可靠技术,正在被迅速广泛地接受。同时,MDLC-MS/MS 提供了低浓度蛋白质混合物的胰酶酶解肽段的高通量分离,既可提供高工作循环纳升级液相色谱,又能对复杂样品混合物进行高效的预分离,在生命科学尤其在骨科疾病的探索中具有广泛的研究前景。

3.2 骨组织蛋白的提取 骨组织存在特殊的矿化结构,组织蛋白被严密包裹于大量无机成分中,有效完整地提取骨组织蛋白十分困难。传统的研磨等物理方法容易破坏蛋白质结构造成试验数据丢失,因此,骨组织蛋白的有效提取已成为 ONFH 蛋白质组学研究的瓶颈。国内 Jiang 等^[6]利用 4 种不同的溶剂提取骨组织蛋白质的方法在狗的颅骨组织中鉴定了二肽段以上的高可信度蛋白质 816 个。笔者未查阅到人体骨组织蛋白质组分离鉴定的相关报道。本研究在 ONFH 的坏死组织样品和正常组织样品中分别鉴定了 1 233 和 999 个蛋白质,远远高于上述报道的结果,假阳性率仅 0.8%,试验重复性和可信度良好。两项研究中蛋白质数量的差异可能是由不同物种之间骨组织结构的不同所致。笔者在比较两项研究试验数据时也发现骨组织蛋白成分及蛋白含量均存在一定差别,这说明不同种类动物和负重方式可导致骨生长发育和结构特点的明显变化。

3.3 与 ONFH 高度相关的部分差异表达蛋白 Carbohydrate sulfotransferase 家族是由 CHST 基因表达的高尔基相关硫转移酶,在骨髓、血管内皮细胞以及发育中的软骨中高度表达。CHST3 可催化软骨素发生磺基化产生硫酸软骨素,而后者又是构成软骨的主要成分,具有调节软骨细胞生长发育、修复损伤软骨等作用。CHST3 缺乏可以引起先天性关节脱位、Omani 型脊椎骨骺发育不良和骨发育不良^[11-13]。而同属 CHST 家族的 CHST2 被认为在血管内皮细胞迁移过程中起调控作用。本研究中 ONFH 的 CHST2 表达水平降低,笔者推测早期 ONFH 由于 CHST2 下调导致抑制血管内皮细胞迁移、增殖,血管新生作用减少,同时由于股骨头特殊的局部血供特点,最终诱导坏死发生。

Chondroadherin 是软骨细胞的主要成分蛋白,一

般只能从软骨中分离得到。但最近有学者通过免疫学方法在骨基质中检测到 Chondroadherin, 并已于去矿化骨组织中提取得到^[14]。Mizuno 等^[15]发现 Chondroadherin 还与胶原蛋白的代谢有关, 可与骨组织中的胶原纤维结合。Lumican 是富含亮氨酸低分子蛋白多糖, 最初发现于角膜。但近来发现 Lumican 基因在骨细胞外基质及成熟成骨细胞中也有表达, 它与细胞因子和胶原蛋白结合, 组织胶原空间^[16-17]。ONFH 中两者表达量降低, 与 I、II 型胶原结合减少并影响胶原蛋白代谢, 最终导致细胞外基质中胶原纤维空间结构变化, 骨与软骨组织形态异常而引起 ONFH。

II 型胶原基因 (COL2A1) 被发现为遗传性 ONFH 的致病基因^[1], 而笔者在所有样品中并未发现 II 型胶原蛋白表达, 这可能与 II 型胶原为主要基质成分的软骨成份在取样时被完全剔除有关。笔者在坏死骨组织中发现 COL1A1 合成减少, 而在对照组 COL1A1 和 COL1A2 的表达水平明显增高, 这表明参与骨空间结构的 I 型胶原基因在 ONFH 发病过程中与 Chondroadherin 和 Lumican 起协同作用。

综上所述, 本研究成功地鉴定了数十个与 ONFH 的生物学功能高度相关的差异表达蛋白, 这些蛋白质极有可能作为 ONFH 早期诊断的生物学标志物, 该方法也为组织蛋白质组学在骨与关节疾病中的进一步应用奠定了基础。

参考文献

- [1] Liu YF, Chen WM, Lin YF, et al. Type II collagen gene variants and inherited osteonecrosis of the femoral head[J]. N Engl J Med, 2005, 352(22): 2294-2301.
- [2] Chang JD, Hur M, Lee SS, et al. Genetic background of nontraumatic osteonecrosis of the femoral head in the Korean population[J]. Clin Orthop Relat Res, 2008, 466(5): 1041-1046.
- [3] Lee HJ, Choi SJ, Hong JM, et al. Association of a polymorphism in the intron 7 of the SREBF1 gene with osteonecrosis of the femoral head in Koreans[J]. Ann Hum Genet, 2009, 73(1): 34-41.
- [4] Tan X, Cai D, Wu Y, et al. Comparative analysis of serum proteomes; discovery of proteins associated with osteonecrosis of the

- femoral head[J]. Transl Res, 2006, 148(3): 114-119.
- [5] Wu RW, Wang FS, Ko JY, et al. Comparative serum proteome expression of osteonecrosis of the femoral head in adults[J]. Bone, 2008, 43(3): 561-566.
- [6] Jiang X, Ye M, Liu G, et al. Method development of efficient protein extraction in bone tissue for proteome analysis[J]. J Proteome Res, 2007, 6(6): 2287-2294.
- [7] Association Research Circulation Osseous (ARCO); Committee on terminology and classification[R]. ARCO News, 1992; 41-46.
- [8] Domon B, Aebersold R. Mass spectrometry and protein analysis[J]. Science, 2006, 312(5771): 212-217.
- [9] Johnson RS, Davis MT, Taylor JA, et al. Informatics for protein identification by mass spectrometry[J]. Methods, 2005, 35(3): 223-236.
- [10] Aebersold RH, Mann M. Mass spectrometry-based proteomics[J]. Nature, 2003, 422(6928): 198-207.
- [11] Rajab A, Kunze J, Mundlos S. Spondyloepiphyseal dysplasia omani type; a new recessive type of SED with progressive spinal involvement[J]. Am J Med Genet A, 2004, 126A(4): 413-419.
- [12] Thiele H, Sakano M, Kitagawa H, et al. Loss of chondroitin 6-O-sulfotransferase-1 function results in severe human chondrodysplasia with progressive spinal involvement[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101(27): 10155-10160.
- [13] Hermanns P, Unger S, Rossi A, et al. Congenital joint dislocations caused by carbohydrate sulfotransferase 3 deficiency in recessive larsen syndrome and humero-spinal dysostosis [J]. Am J Hum Genet, 2008, 82(6): 1368-1374.
- [14] Larsson T, Sommarin Y, Paulsson M, et al. Cartilage matrix proteins. A basic 36-kDa protein with a restricted distribution to cartilage and bone[J]. J Biol Chem, 1991, 266(30): 20428-20433.
- [15] Mizuno M, Fujisawa R, Kuboki Y. Bone chondroadherin promotes attachment of osteoblastic cells to solid-state substrates and shows affinity to collagen[J]. Calcif Tissue Int, 1996, 59(3): 163-167.
- [16] Raouf A, Ganss B, McMahon C, et al. Lumican is a major proteoglycan component of the bone matrix[J]. Matrix Biol, 2002, 21(4): 361-367.
- [17] Svensson L, Närlid I, Oldberg A. Fibromodulin and lumican bind to the same region on collagen type I fibrils[J]. FEBS Lett, 2000, 470(2): 178-182.

(收稿日期: 2010-10-13 本文编辑: 连智华)

第三届全国脊柱非融合学术会议通知

为总结我国脊柱外科非融合技术近年来的临床与基础研究成果, 推动脊柱外科不断创新与发展, 由中国康复医学会骨与关节及风湿病专业委员会脊柱非融合学组主办, 宁波市第六医院承办的“第三届全国脊柱非融合学术会议”将于 2011 年 4 月 8-10 日在宁波开元名都大酒店召开。

欢迎各位同仁踊跃参加并积极投稿。来搞请将结构式摘要(800 字以内)或论文全文(3000 字以内)以电子版(Word 文档或 PDF 文档)形式发送至大会电子邮箱 huyong610@163.com 进行投递, 内容为脊柱非融合技术的基础及临床研究、手术适应证、并发症及长期随访疗效观察等。会议将邀请国内脊柱外科领域著名专家进行专题报告。大会截稿日期为 2011 年 3 月 28 日。授予 I 类学分 8 分。注册费: 人民币 800 元/人(包括资料费)。联系人: 胡勇 13291909168; 郑晨颖 13581655316; 联系电话/传真: 0574-87996165。