

· 论著 ·

基于生物信息学分析的先天性胫骨假关节血清来源外泌体蛋白质组学研究



全文二维码

黄一勇 杨戈 刘尧喜 谭谦 刘昆 朱光辉 唐进 梅海波

湖南省儿童医院骨科,长沙 410007

通信作者:梅海波,Email:meihaibo@sohu.com

【摘要】 目的 比较先天性胫骨假关节 (congenital pseudarthrosis of tibia, CPT) 和正常儿童血清外泌体中蛋白的表达差异,寻找 CPT 的可能致病机制。**方法** 收集湖南省儿童医院 6 例 CPT 患儿和 4 例正常儿童的静脉血,通过分离出静脉血清、提取血清外泌体,使用串联质谱标签 (tandem mass tag, TMT) 标记定量蛋白质组学技术,确定 CPT 患儿和正常儿童血清外泌体中的差异表达蛋白,并对差异蛋白进行 GO 分析、KEGG 分析、DisGeNET 富集分析及 PPI 分析。**结果** 与正常儿童血清中外泌体蛋白相比,CPT 来源的血清外泌体中表达上调的蛋白共 121 个,表达下调的蛋白共 289 个。KEGG 分析结果显示,差异蛋白在补体系统富集最为显著;糖代谢在 GO 分类中的生物进程中富集;DisGeNET 富集分析结果显示,排名前五的疾病中有 3 种和骨质疏松症有关;PPI 富集分析结果显示糖代谢为差异蛋白富集模块之一。**结论** 补体系统紊乱和细胞能量代谢异常可能是 CPT 的潜在致病机制。本研究为探索先天性胫骨假关节的病因及发病机制提供了新的思路。

【关键词】 先天性胫骨假关节;胫骨/畸形;假关节/先天性;蛋白质组学/分类;蛋白质组学/方法;外泌体

基金项目:湖南省重点研发计划 (2020SK2113);湖南省儿童肢体畸形临床医学研究中心 (2019SK4006);湖南省出生缺陷协同防治科技重大专项 (2019SK1010)

DOI:10.3760/cma.j.cn101785-202102043-010

Proteomic analysis of serum-derived exosomes from congenital pseudarthrosis of tibia

Huang Yiyong, Yang Ge, Liu Yaoxi, Tan Qian, Liu Kun, Zhu Guanghui, Tang Jin, Mei Haibo

Department of Orthopedics, Hunan Children's Hospital, Changsha 410007, China

Corresponding author: Mei Haibo, Email: meihaibo@sohu.com

【Abstract】 Objective To explore the possible pathogenesis of congenital pseudarthrosis of tibia (CPT) through compare the differential protein expression in serum-derived exosomes (SDEs) between CPT and normal children. **Methods** SDEs were extracted from venous plasma of 6 CPT children and 4 normal controls. Then differentially expressed proteins were examined by tandem mass tag (TMT)-based proteomics. And proteomic information was acquired through Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway, gene ontology (GO) classification, DisGeNET enrichment analysis and protein-protein interaction (PPI) enrichment analysis. **Results** Based upon proteomics analysis, 121 up-regulated and 289 down-regulated proteins were identified. Complement & coagulation cascade was the most obvious enrichment in KEGG pathway. Monosaccharide metabolic process was one of enriched process during the biological process of gene ontology (GO) classification. DisGeNET enrichment analysis indicated that three of top five diseases were associated with osteoporosis. And glycolysis/gluconeogenesis was a part of enriched terms during PPI enrichment analysis. It hinted that complement and glycolysis/gluconeogenesis were abnormal in CPT. **Conclusion** Abnormality of complement and glycolysis/gluconeogenesis might be a potential pathogenic mechanism of CPT. Also this study may provide new rationales for exploring the etiology and pathogenesis of CPT.

【Key words】 Congenital Pseudarthrosis of Tibia; Tibia/AB; Pseudarthrosis/CN; Proteomics/CL; Proteomics/MT; Exosomes

Fund program: Key Research and Development Program of Hunan Province (2020SK2113); Clinical Re-

search Center for Limb Deformity of Children in Hunan Province(2019SK4006);Major science and technology projects for collaborative prevention and control of birth defects in Hunan Province(2019SK1010)

DOI:10.3760/cma.j.cn101785-202102043-010

先天性胫骨假关节(congenital pseudarthrosis of tibia,CPT)是一种罕见的小儿骨科疾病,发病率为 $1/250\,000 \sim 1/140\,000$ ^[1]。主要临床特征为:出生时即有胫骨缺损,形成假关节;或出生时伴有先天性胫骨前弓畸形,外伤后骨折不愈合而形成假关节^[2]。自1891年Paget首次报道CPT以来,距今已有100余年的历史,但其病因及发病机制仍不明确^[3-5]。CPT由于病灶假关节处难以实现骨性愈合而成为临床治疗的难点,通常骨的发育和骨折的愈合与间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)的成骨分化以及成骨细胞、破骨细胞的活性密切相关^[6-7]。有研究表明,CPT患儿假关节部位骨髓中MSCs的成骨能力比正常人差,且其假关节部位破骨细胞活性增强,提示CPT的发生可能与假关节局部骨代谢异常有关^[8-10]。

外泌体是细胞分泌的一种直径30~100 nm的小囊泡,其中包含多种蛋白质,这些蛋白质在免疫调节、细胞迁移以及介导细胞分化等方面起着重要的作用^[11]。近年来血清来源的外泌体(serum-derived exosomes, SDEs)在骨重建领域引起了广泛关注,并证明其与一些骨骼系统疾病的发生有关,如骨质疏松症或成骨不全^[12]。本团队前期研究发现,CPT患儿血清来源外泌体具有抑制成骨、促进破骨代谢的能力,提示CPT血清外泌体中包含的蛋白分子与正常儿童存在差异^[13]。

虽然SDEs对骨代谢的影响越来越受到重视,但至今尚没有关于CPT患儿和正常儿童SDEs蛋白质组学的研究。本研究使用液相色谱串联质谱(liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)结合TMT标记定量技术,进行CPT患儿和正常儿童的SDEs蛋白质谱分析,寻找CPT和正常儿童SDEs之间的差异蛋白,并使用生物信息学方法对差异蛋白进行分析,以期对CPT的病理生物学机制研究奠定基础。

材料与方法

一、研究对象和样品处理

采集湖南省儿童医院2017年6月至2019年8月收住院的6例合并I型神经纤维瘤病(neurofibro-

matosis type 1, NF1)的Crawford IV型CPT患儿(男3例,女3例,平均年龄18.5个月)和4例正常儿童(男3例,女1例,平均年龄37.5个月)静脉血。CPT的诊断基于临床表现和影像学特征^[14]。将获取的静脉血即刻在4℃离心机中以5 000 rpm/min离心5 min,取上清液于冻存管中放于-80℃冻存以备后续研究。本研究经湖南省儿童医院伦理委员会批准(编号:HCHLL-2019-36),且获得患儿父母知情同意。

二、血清中外泌体分离

先将全血样品离心(4℃, 3 000 xg, 30 min),取上清液(即血清)。然后使用等体积的PBS(phosphate buffered saline)稀释血清,并用0.22 μm筛网过滤后再次离心(4℃, 25 000 xg, 90 min),取上清液,之后加入ExoQuick-TC agentia(System Biosciences, Palo Alto, CA, USA),于4℃环境下过夜后离心(4℃, 1 500 xg, 30 min),去除上清液后即可获得外泌体。用200 μL的PBS重悬后,将所有外泌体储存在-80℃环境下或用于进一步的研究^[13]。

三、外泌体中蛋白提取、酶解及TMT标记

将外泌体从-80℃冰箱取出,离心(4℃, 12 000 xg, 15 min)后取上清液,并用0.22 μm微孔滤膜过滤上清液,再用PTM公司生产的PTM-EVs试剂盒分离外泌体。加入终浓度为8 mol/L的Urea以及蛋白酶抑制剂超声裂解,使用BCA试剂盒测定蛋白浓度。加二硫苏糖醇调节蛋白浓度为5 mmol/L,并还原30 min(56℃)。再加入碘代乙酰胺调节蛋白浓度至11 mmol/L并孵育15 min(室温、避光),再将样品的尿素浓度稀释至2 mol/L以下。蛋白溶液中加入胰酶(胰酶与蛋白的质量比为1:50)后,37℃酶解过夜。再按1:100的胰酶与蛋白质量加入胰酶,37℃酶解4 h。酶解之后的肽段用Strata X C18(Phenomenex)除盐、真空冷冻干燥,再以0.5 mol/L TEAB溶解肽段,然后按照TMT试剂盒操作说明标记肽段(标记试剂解冻后用乙腈溶解,与肽段混合后室温孵育2 h,标记后的肽段混合后除盐,真空冷冻干燥)。肽段用Agilent 300Extend C18进行反向浓缩、真空冷冻干燥,并用液相色谱流动相A相(0.1%甲酸和2%乙腈的水溶液)溶解后使用EASY-nLC 1200超高效液相系统进行分离。

四、Q Exactive HF-X 质谱分析

分离后的肽段被注入 NSI 离子源中电离,然后使用 Q Exactive HF-X 质谱分析仪进行分析。设置离子源电压为 2.0 kV,并使用高分辨 Orbitrap 检测和分析肽段母离子及其二级碎片。设置扫描范围(一级质谱为 350 ~ 1 600 m/z,二级质谱则固定起点为 100 m/z)和扫描分辨率(一级质谱为 120 000,二级质谱为 30 000)。使用数据依赖型扫描(DDA)程序采集质谱数据。

五、生物信息学分析

本研究使用 Maxquant (v1.5.2.8) 处理质谱数据,并在 Homo_sapiens_9606_SP_20190513 (20422 条序列)数据库中进行检索。以 1.3 倍为差异表达变化阈值,以统计学检验 $P < 0.05$ 为显著性阈值,得到差异表达蛋白,并对差异蛋白进行以下分析。

(一) GO 注释及富集分析

Gene Ontology (GO) 即基因本体论,主要从生物过程 (biological process)、细胞组成 (cellular component) 和分子功能 (molecular function) 三个不同角度对差异蛋白进行分析。本研究运用 GO 分析从上述 3 个方面对差异蛋白进行注释,并行 GO 富集分析。

(二) KEGG 通路富集分析

KEGG 是连接已知分子间相互作用的信息网络,如代谢通路、复合物、生化反应。KEGG 途径主要包括:代谢、遗传信息处理、环境信息处理、细胞过程、人类疾病、药物开发等。为确定最明显的差异途径,本研究对差异蛋白进行 KEGG 通路富集分析。

(三) DisGeNET 富集分析

DisGeNET (即疾病相关的基因与突变位点数据库)是一个收集人类疾病相关基因的数据库,可用于分析人类疾病的分子基础、疾病基因的性质分析、疾病候选基因的验证等。本研究对差异蛋白进行 DisGeNET 富集分析,识别差异蛋白与其他疾病的关系。

(四) 蛋白互作网络分析

蛋白互作网络 (protein interaction network, PPI

network) 分析有助于从系统的整体的角度研究生物分子机制、原理和预测蛋白质相互间功能影响。本研究采用 Metascape 对差异蛋白进行分析,并使用 MCODE 算法识别密集连接的网络聚类。

结 果

一、血清外泌体的蛋白质组学概况

本研究一共鉴定到 1 417.0 个可定量蛋白 (至少一个比较组有定量信息)。以 1.3 倍为差异表达变化阈值,以统计学检验 $P < 0.05$ 为显著性阈值,共得到 410 个差异蛋白。CPT 患儿与正常儿童相比,有 121 个蛋白表达发生上调,289 个蛋白表达发生下调。

二、GO 注释

GO 注释结果表明,差异蛋白涉及的生物进程包括细胞过程、单生物过程及生物调节等。在细胞组成中,差异蛋白主要存在于细胞、细胞器及胞外区等。在分子功能上,差异蛋白明显集中在分子结合和分子催化活性 2 个区域。见图 1。

三、KEGG 通路富集分析

KEGG 通路富集分析表明,补体系统、阿尔茨海默病、氧化磷酸化是富集最明显的 3 个途径。图 2 列出了最显著富集的前 20 个分类的结果。

四、DisGeNET 富集分析

DisGeNET 富集分析结果表明,在排名前五的疾病中,有 3 种疾病与骨质疏松症有关。进一步研究发现,差异蛋白中与骨质疏松有关的蛋白共有 22 个。表 1 列出了所有与骨质疏松相关的差异蛋白及差异蛋白所对应的基因名称和注释。

五、蛋白互作网络分析

本研究使用 Cytoscape 软件制作了差异蛋白 PPI 图,并对参与糖酵解/糖异生模块的差异蛋白进行了分析 (图 3)。根据 MCODE 分析显示,有 11 种 MCODE 组分蛋白质密集连接 (表 2),糖酵解/糖异生模块为差异蛋白富集模块之一。

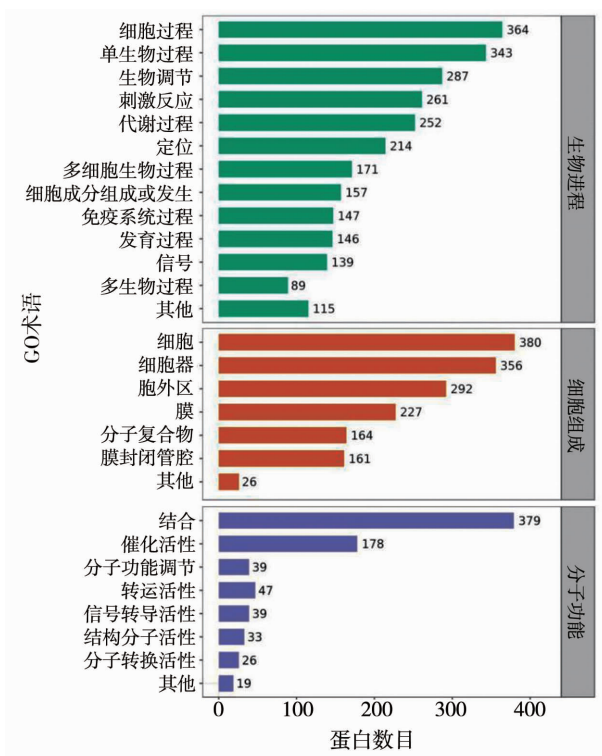


图1 差异蛋白在生物学过程、细胞组成和分子功能的主要 GO 注释结果 横轴为蛋白数量,纵轴为 GO 术语

Fig.1 Main GO annotation results of differentially expressed proteins during biological process, cellular component and molecular function

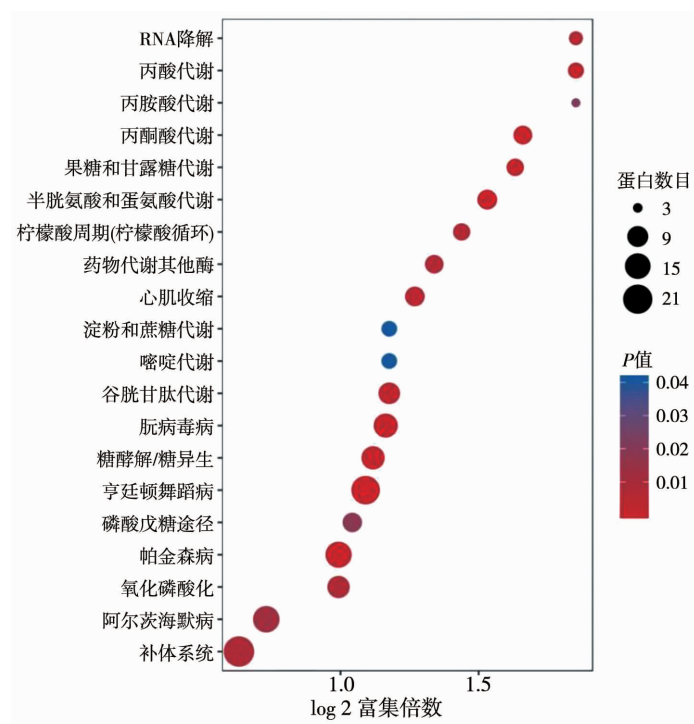


图2 差异表达蛋白在 KEGG 通路中富集分布气泡图 横轴为 log2 富集倍数 (以 2 为底的对数变换),纵轴为通路名称,圆圈大小代表蛋白数目,颜色表示富集程度

Fig.2 KEGG pathway enrichment of differentially expressed proteins

表 1 与骨质疏松相关的 22 个差异蛋白及其对应的基因名称和注释

Table 1 The Serial numbers of 22 differentially expressed proteins, genes and its annotations associated with osteoporosis					
蛋白序号	基因名称	注释	蛋白序号	基因名称	注释
P63261	<i>ACTG1</i>	肌动蛋白 1	P00491	<i>PNP</i>	嘌呤核苷磷酸化酶
P00918	<i>CA2</i>	碳酸酐酶 2	P14618	<i>PKM</i>	丙酮酸激酶 M1/2
P06733	<i>ENO1</i>	烯醇酶 1	P04179	<i>SOD2</i>	超氧化物歧化酶 2
P02671	<i>FGA</i>	纤维蛋白原 α 链	P60174	<i>TPH</i>	磷酸丙糖异构酶 1
P02675	<i>FGB</i>	纤维蛋白原 β 链	P67936	<i>TPM4</i>	原肌球蛋白 4
P04406	<i>GAPDH</i>	甘油醛-3-磷酸脱氢酶	P18206	<i>VCL</i>	连接蛋白
P43304	<i>GPD2</i>	甘油-3-磷酸脱氢酶 2	Q01518	<i>CAP1</i>	环化酶相关肌动蛋白细胞骨架调节蛋白 1
P07203	<i>GPX1</i>	谷胱甘肽过氧化物酶 1	P78371	<i>CCT2</i>	含有 TCP1 亚单位 2 的伴侣蛋白
P06396	<i>GSN</i>	凝胶	P30048	<i>PRDX3</i>	过氧化物酶还原蛋白 3
P48735	<i>IDH2</i>	异柠檬酸脱氢酶(NADP(+)) 2	Q99497	<i>PARK7</i>	帕金森病相关脱糖酶
P02788	<i>LTF</i>	乳铁蛋白	P01019	<i>AGT</i>	血管紧张肽原

表 2 应用 MCODE 算法识别 11 个密集连接的网络聚类

Table 2 Eleven densely connected network clusters identified through MCODE algorithm

模块	GO	注释	Log10(P)
MCODE_1	GO:0006457	蛋白质折叠	-24.8
MCODE_1	CORUM:126	CCT 复合物(含有 TCP1 复合物的伴侣蛋白)	-22.3
MCODE_1	GO:1904851	端粒蛋白质定位建立的正调控	-20.7
MCODE_2	R-HSA-375276	肽配体结合受体	-10.6
MCODE_2	R-HSA-418594	G α (i) 信号事件	-10.1
MCODE_2	R-HSA-373076	A/1 类(视紫红质样受体)	-9
MCODE_3	R-HSA-166665	补体末端通路	-18.5
MCODE_3	R-HSA-977606	补体级联调节	-12.9
MCODE_3	R-HSA-166658	补体级联	-12.3
MCODE_4	GO:0071456	细胞对缺氧的反应	-7.4
MCODE_4	GO:0036294	细胞对氧水平降低的反应	-7.3
MCODE_4	GO:0071453	细胞对氧水平的反应	-7.1
MCODE_5	ko00010	糖酵解/糖异生	-5.7
MCODE_5	hsa00010	糖酵解/糖异生	-5.4
MCODE_5	GO:0043687	翻译后蛋白质修饰	-5.1
MCODE_6	GO:0046496	烟酰胺核苷酸代谢过程	-10.7
MCODE_6	GO:0019362	吡啶核苷酸代谢过程	-10.7
MCODE_6	GO:0072524	含吡啶化合物代谢过程	-10.6
MCODE_7	R-HSA-140875	纤维蛋白凝块形成的共同途径	-15.7
MCODE_7	GO:0072378	血液凝固, 纤维蛋白凝块形成	-15.2
MCODE_7	R-HSA-140877	纤维蛋白凝块的形成(凝血级联反应)	-14.4
MCODE_8	GO:0051186	辅助因子代谢过程	-4.4
MCODE_10	GO:0006123	线粒体电子传递	-9.4
MCODE_10	GO:0019646	有氧电子传递链	-9.4
MCODE_10	ko04260	心肌收缩	-7.7
MCODE_11	R-HSA-8856825	网格蛋白介导内吞的物质识别	-7.3
MCODE_11	GO:0046718	病毒进入宿主细胞	-7
MCODE_11	R-HSA-8856828	内吞作用	-6.9

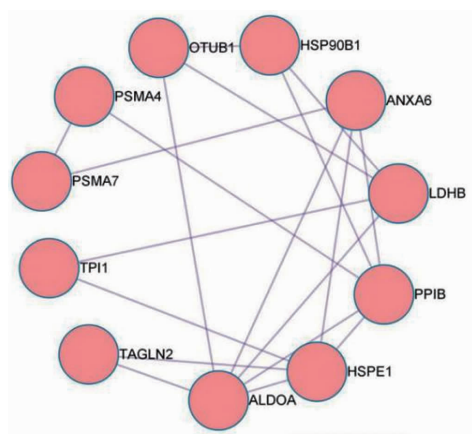


图3 糖酵解/糖异生相关蛋白的相关作用图

Fig.3 Protein-protein interaction map of glycolysis/gluconeogenesis related proteins

讨论

本研究对 CPT 患儿和正常儿童的血清来源外泌体内蛋白质进行鉴定,共得到 410 个差异表达蛋白。与正常儿童相比,CPT 患儿有 121 个蛋白表达上调,有 289 个蛋白表达下调。差异蛋白的 KEGG 富集分析结果表明,补体系统是差异蛋白富集最明显的通路。补体主要在肝脏合成,然后释放入血。一些肝外的组织和细胞(如成纤维细胞、内皮细胞、免疫细胞)也可以在相应部位产生补体成分。补体在骨骼的生长、修复过程中起着重要的作用。有研究表明,在骨的生长发育过程中,生长板中的 C3、C5、C9 在生长板的软骨骨化过程中起重要作用^[15]。动物研究表明,缺乏 C3 和 C5 会导致骨的生长板变厚,使软骨骨化延迟。补体除对软骨细胞有影响外,还影响间充质干细胞的募集和增殖分化,进而影响骨的发育和修复。本研究中发现差异蛋白中有 C3、C5、C9 等补体的存在,表明补体系统紊乱可能与 CPT 的发生有关。

PPI 富集分析显示,糖酵解和糖异生(即 MCODE 5)为差异蛋白富集过程之一,糖酵解和糖异生是细胞获得能量的两个重要途径,提示 CPT 可能存在能量代谢异常。在生物体中,糖的氧化分解主要有 3 条途径:糖的有氧氧化、糖酵解和磷酸戊糖途径,其中糖酵解是所有生物体进行葡萄糖分解代谢所必须经过的共同阶段。最近有研究表明,间充质干细胞的能量代谢异常会影响其增殖及分化,进而导致成骨细胞减少,造成骨质疏松^[16]。已有研究表明 CPT 病变骨膜中干细胞的增殖分化异常^[17]。本研究发现糖酵解和糖异生均为差异蛋白的 PPI 富

集过程,提示 CPT 可能存在间充质干细胞的能量代谢异常。

DisGeNET 分析发现,DisGeNET 富集的前 5 种疾病中,有 3 种疾病与骨质疏松症有关。骨质疏松的原因复杂,其中干细胞的增殖分化减弱是其机制之一^[18]。2008 年,Cho 等^[9]对 7 例先天性胫骨假关节合并 NF1 患儿的病变骨膜和 3 例对照组患儿的正常胫骨骨膜进行了研究,发现病变骨膜中的细胞在一定程度上保持间质细胞系细胞表型,但是没有在 BMP 诱导下产生成骨分化。2016 年,Madhuri 等^[8]研究发现 CPT 患儿病变骨膜中的 MSCs 分化潜能及成骨潜能较正常儿童差。2018 年,Dilogo 等^[19]通过对 6 例 CPT 患儿胫骨骨髓及假关节病变部位 MSCs 进行对比研究发现,与胫骨骨髓相比,CPT 病变部位的 MSCs 更容易衰老。由于 CPT 病变骨膜中 MSCs 的成骨能力较正常儿童差,Tikkanen 等^[17]在 2010 年将含有 MSCs 的培养液置于假关节局部来治疗 CPT,并取得了成功。因此,CPT 病变骨膜中干细胞的增殖分化异常可能是其发病机制之一。

综上所述,补体系统紊乱和细胞能量代谢异常可能是 CPT 的潜在发病机制。本研究为探索 CPT 的发病机制提供了新的思路,但仍存在一定的局限性。首先,本研究不仅鉴定出补体和能量代谢的相关差异蛋白,还发现许多其他差异蛋白(如氨基酸代谢相关蛋白),这些蛋白也可能与 CPT 的发生有着重要的关系;另外,本研究选择的研究对象是血清外泌体,如选择组织外泌体可能更具有实际意义;第三,本研究采用初级的生物信息学分析方法,且未进行组织学验证,研究结论可能存在一定的偏差。对于上述不足,我们将在下一步的研究中去弥补。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

作者贡献声明 文献检索为黄一勇、刘尧喜,论文调查设计为黄一勇、杨戈、朱光辉、梅海波,数据收集与分析黄一勇、刘尧喜,论文结果撰写为黄一勇、杨戈,论文讨论分析为黄一勇、刘尧喜、谭谦、刘昆、朱光辉、唐进、杨戈、梅海波

参考文献

- [1] Kesireddy N, Kheireldin RK, Lu A, et al. Current treatment of congenital pseudarthrosis of the tibia: a systematic review and meta-analysis[J]. J Pediatr Orthop B, 2018, 27(6): 541-550. DOI: 10.1097/BPB.0000000000000524.
- [2] Pina ME, Veiga F. The influence of diluent on the release of theophylline from hydrophilic matrix tablets[J]. Drug Dev Ind Pharm, 2000, 26(10): 1125-1128. DOI: 10.1081/ddc-100100279.

- [3] Zhu G, Zheng Y, Liu Y, et al. Identification and characterization of NF1 and non-NF1 congenital pseudarthrosis of the tibia based on germline NF1 variants: genetic and clinical analysis of 75 patients[J]. *Orphanet J Rare Dis*, 2019, 14(1): 221. DOI: 10.1186/s13023-019-1196-0.
- [4] 汤用波, 梅海波. 先天性胫骨假关节的病因学研究进展[J]. *临床小儿外科杂志*, 2013, 12(3): 234-236, 254. DOI: 10.3969/j.issn.1671-6353.2013.03.023.
- Tang YB, Mei HB. Research etiological advances of congenital pseudarthrosis of tibia[J]. *J Clin Ped Sur*, 2013, 12(3): 234-236, 254. DOI: 10.3969/j.issn.1671-6353.2013.03.023.
- [5] 朱光辉, 梅海波, 刘昆, 等. OPG 及 RANKL 在儿童先天性胫骨假关节病变骨与骨髓中的表达研究[J]. *临床小儿外科杂志*, 2019, 18(4): 331-334. DOI: 10.3969/j.issn.1671-6353.2019.04.017.
- Zhu GH, Mei HB, Liu K, et al. Expressions of OPG and RANKL in tibia bone and periosteum of congenital tibial pseudarthrosis of the tibia in children[J]. *J Clin Ped Sur*, 2019, 18(4): 331-334. DOI: 10.3969/j.issn.1671-6353.2019.04.017.
- [6] Cheng C, Shoback D. Mechanisms underlying normal fracture healing and risk factors for delayed healing[J]. *Curr Osteoporosis Rep*, 2019, 17(1): 36-47. DOI: 10.1007/s11914-019-00501-5.
- [7] Bahney CS, Zondervan RL, Allison P, et al. Cellular biology of fracture healing[J]. *J Orthop Res*, 2019, 37(1): 35-50. DOI: 10.1002/jor.24170.
- [8] Madhuri V, Mathew SE, Rajagopal K, et al. Does pamidronate enhance the osteogenesis in mesenchymal stem cells derived from fibrous hamartoma in congenital pseudarthrosis of the tibia? [J]. *Bone Rep*, 2016, 5: 292-298. DOI: 10.1016/j.bonr.2016.10.003.
- [9] Cho TJ, Seo JB, Lee HR, et al. Biologic characteristics of fibrous hamartoma from congenital pseudarthrosis of the tibia associated with neurofibromatosis type 1[J]. *J Bone Joint Surg Am*, 2008, 90(12): 2735-2744. DOI: 10.2106/JBJS.H.00014.
- [10] Ippolito E, Corsi A, Grill F, et al. Pathology of bone lesions associated with congenital pseudarthrosis of the leg[J]. *J Pediatr Orthop B*, 2000, 9(1): 3-10. DOI: 10.1097/01202412-200001000-00002.
- [11] Meldolesi J. Exosomes and ectosomes in intercellular communication[J]. *Curr Biol*, 2018, 28(8): R435-R444. DOI: 10.1016/j.cub.2018.01.059.
- [12] Xie Y, Gao Y, Zhang L, et al. Involvement of serum-derived exosomes of elderly patients with bone loss in failure of bone remodeling via alteration of exosomal bone-related proteins[J]. *Aging Cell*, 2018, 17(3): e12758. DOI: 10.1111/ace1.12758.
- [13] Yang G, Yu H, Liu Y, et al. Serum-derived exosomes from neurofibromatosis type 1 congenital tibial pseudarthrosis impaired bone by promoting osteoclastogenesis and inhibiting osteogenesis[J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2021, 246(2): 130-141. DOI: 10.1177/1535370220962737.
- [14] Eisenberg KA, Vuillemin CB. Management of congenital pseudoarthrosis of the tibia and fibula[J]. *Curr Rev Musculoskelet Med*, 2019, 12(3): 356-368. DOI: 10.1007/s12178-019-09566-2.
- [15] Andrades JA, Nimmi ME, Becerra J, et al. Complement proteins are present in developing endochondral bone and may mediate cartilage cell death and vascularization[J]. *Exp Cell Res*, 1996, 227(2): 208-213. DOI: 10.1006/excr.1996.0269.
- [16] Lee AR, Moon DK, Siregar A, et al. Involvement of mitochondrial biogenesis during the differentiation of human periosteum-derived mesenchymal stem cells into adipocytes, chondrocytes and osteocytes[J]. *Arch Pharm Res*, 2019, 42(12): 1052-1062. DOI: 10.1007/s12272-019-01198-x.
- [17] Tikkanen J, Leskelä HV, Lehtonen ST, et al. Attempt to treat congenital pseudarthrosis of the tibia with mesenchymal stromal cell transplantation[J]. *Cytotherapy*, 2010, 12(5): 593-604. DOI: 10.3109/14653249.2010.487898.
- [18] Antebi B, Pelled G, Gazit D. Stem cell therapy for osteoporosis [J]. *Curr Osteoporosis Rep*, 2014, 12(1): 41-47. DOI: 10.1007/s11914-013-0184-x.
- [19] Dilogu IH, Mujadid F, Nurhayati RW, et al. Evaluation of bone marrow-derived mesenchymal stem cell quality from patients with congenital pseudoarthrosis of the tibia[J]. *J Orthop Surg Res*, 2018, 13(1): 266. DOI: 10.1186/s13018-018-0977-9.

(收稿日期: 2021-02-14)

本文引用格式: 黄一勇, 杨戈, 刘尧喜, 等. 基于生物信息学分析的先天性胫骨假关节血清来源外泌体蛋白质组学研究[J]. *临床小儿外科杂志*, 2022, 21(6): 551-557. DOI: 10.3760/cma.j.cn101785-202102043-010.

Citing this article as: Huang YY, Yang G, Liu YX, et al. Proteomic analysis of serum-derived exosomes from congenital pseudarthrosis of tibia[J]. *J Clin Ped Sur*, 2022, 21(6): 551-557. DOI: 10.3760/cma.j.cn101785-202102043-010.