

基于生物信息学分析骨峰值及骨质疏松症相关基因

樊萍,冯秀媛,胡楠,蒲丹,何岚

(西安交通大学第一附属医院,陕西 西安 710061)

【摘要】 目的:基于生物信息学探讨与女性骨峰值(peak bone mass, PBM)及骨质疏松症(osteoporosis, OP)相关的基因并进行验证。方法:通过基因表达数据库(gene expression omnibus database, GEO),利用 DNA 微阵列技术对高 PBM 和低 PBM 成年女性的单核细胞进行全基因组范围内的基因差异表达研究,通过聚类分析、GO 富集和京都基因与基因组百科全书(kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)分析差异基因,并进一步分析差异表达基因间的相互作用网络。建立 OP 大鼠模型,进行股骨颈组织染色,进一步验证差异基因的表达。结果:差异基因筛选共得到 283 个基因,与高 PBM 样本相比,低 PBM 样本中有 135 个基因表达上调,148 个基因表达下调,总共有 7 个通路及 12 个差异基因被富集,涉及矿物质吸收与转运、细胞免疫等方面的多个基因表达存在差异。其中, CACNA1D 基因编码的 L 型钙离子通道蛋白 1.3(voltage-gated Ca^{2+} channel 1.3, CaV1.3)在 OP 大鼠模型股骨颈组织中表达显著增强。结论:以上结果提示 CaV1.3 基因表达水平的差异可能导致低 PBM 女性发生 OP,提供了 OP 防治的潜在靶点。

【关键词】 骨质疏松; 骨峰值; 钙通道; 生物信息学

中图分类号:R681

DOI:10.12200/j.issn.1003-0034.2023.09.014

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Analysis of genes related to female bone peak and osteoporosis based on bioinformatics

FAN Ping, FENG Xiu-yuan, HU Nan, PU Dan, HE Lan (The First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, Shanxi, China)

ABSTRACT **Objective** To explore and verify the genes related to female peak bone mass (PBM) and osteoporosis (OP) based on bioinformatics. **Methods** Using GEO data, DNA microarray technology to conduct genome-wide analysis of adult female monocytes with high and low PBM. Cluster analysis, GO enrichment and KEGG analysis were used to analyze the differential genes, and the interaction network of differential genes was further analyzed. OP rat model was established and femur neck tissue staining was performed to further verify the expression of differential genes. **Results** A total of 283 genes were obtained by differential gene screening. Compared with the high PBM samples, 135 genes were up-regulated and 148 genes were down-regulated in the low PBM samples. A total of 7 pathways and 12 differential genes were enriched, and there were differences in the expression of several genes involved in mineral absorption and transport, cellular immunity and other aspects. Among them, voltage-gated Ca^{2+} channel 1.3 (CaV1.3) encoded by CACNA1D gene was significantly enhanced in the femoral neck tissue of OP rat model. **Conclusion** The above results suggest that the difference in the expression level of CaV1.3 gene may lead to the occurrence of OP in women with low PBM, which provides us with a potential target for the prevention and treatment of OP.

KEYWORDS Osteoporosis; Peak bone mass; Calcium channel; Bioinformatics

骨质疏松症(osteoporosis, OP)是以骨量减少、骨组织微观结构退化为特征,导致骨的脆性增高而骨折危险性增加的一种全身性骨病^[1]。骨质疏松症是威胁中老年人以及绝经后女性健康的常见病,其发病率随我国社会老龄化而迅速上升^[2]。截至 2012 年,

我国 OP 患者已达 8 600 万人,预计到 2050 年,我国 OP 患者将达到 2.12 亿^[3]。骨质疏松导致的脆性骨折是世界范围内的重大公共卫生问题,2004 年美国卫生局报道,>50 岁的女性中几乎有一半会在余生遭受骨质疏松性骨折,而男性的比例为 1/5^[4]。在 OP 发生发展的分子机制方面目前已有大量的深入研究,但是其确切病理机制仍不十分清楚,如何对其进行有效的靶向治疗仍然是目前基础与临床面临的关键问题。

骨峰值(peak bone mass, PBM)是指人体骨骼在

基金项目:陕西省科技计划项目(编号:2019JM-560)

Fund program: Provided by Natural Science basic Research Project of Shaanxi Province (No.2019JM-560)

通讯作者:何岚 E-mail: xajdh187@mail.xjtu.edu.cn

Corresponding author: HE Lan E-mail: xajdh187@mail.xjtu.edu.cn

25~30 岁时获得的最大的骨密度。每个人患骨质疏松的风险取决于其在成年后获得的 PBM 以及之后因为衰老、绝经、疾病等失去骨量的速度, PBM 也是发生脆性骨折的有力预测指标^[5]。骨重塑过程中, 骨吸收相对骨形成增强, 导致骨丢失, 是骨质疏松症重要的发病机制。而破骨细胞(osteoclast, OC)是负责骨吸收的主要细胞, 被认为是抗骨质疏松治疗的重要靶点, 很多新的治疗策略旨在抑制破骨细胞的分化、防止破骨细胞导致的过度的骨吸收^[6]。

本研究利用 DNA 微阵列技术对高 PBM 和低 PBM 成年女性单核细胞进行全基因组范围内基因差异表达的研究, 检测在高低 PBM 样本中表达量发生显著变化的基因, 通过研究这些基因本身的特点及基因之间的关联, 找出影响 PBM 高低的关键基因, 同时选择个别基因在动物模型上进行验证, 从而进一步探究防治骨质疏松症的关键靶点。

1 材料与方法

1.1 动物与试剂

SD 大鼠购买自辽宁长生生物技术公司[动物合格证编号: SCXK(辽)2020-0001], 小鼠抗大鼠 CACNA1D 基因编码的 L 型钙离子通道蛋白 1.3(voltage-gated Ca²⁺ channel 1.3, CaV1.3) 一抗购自 NOVUS 公司(编号: NBP2-12893), 兔抗大鼠抗酒石酸酸性磷酸酶(tartrate resistant acid phosphatase, TRAP)一抗购自 Abcam 公司(编号: ab191406), Cy3 标记羊抗兔 IgG 及 Cy3 标记羊抗小鼠 IgG 购自武汉博士德公司(编号: BA1032, BA1101), 4', 6-二脒基-2-苯基吲哚二盐酸盐(4', 6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)购自碧云天生物技术公司(编号: C1002), 苏木素购自 Sigma 公司(编号: H9627), 伊红 Y 购自国药集团(编号: 71014544)。

1.2 研究方法

1.2.1 数据收集 全基因组基因表达数据来源于基因表达数据库(gene expression omnibus database, GEO)(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>), 下载基因表达芯片 GSE7158, 芯片平台为 GPL570 [HG-U133_Plus_2] Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array, 共设计 54 675 个探针。该组数据根据健康女性 PBM 的分布, 分别从倒数 100 名和前 100 名中选取 12 名和 14 名具有极低和极高受试者, 从单核细胞中提取总 RNA。根据 RNA 降解曲线的离群值, 选择低 PBM 和高 PBM 组中离群值最小芯片数据各 8 例进行下一步分析。

1.2.2 数据预处理 本研究中的芯片原始数据均为 CEL 格式, 用 R 软件中的 affy 包(<http://www.bioconductor.org/packages/2.12/bioc/html/affy.html>)

对数据进行预处理。采用微阵列(micro array suite, MAS)法^[7]进行, 并将芯片噪声去除、数据标准化、探针 3 个步骤合并, 得到高 PBM 组和低 PBM 组基因表达值, 后续分析的基因表达值均是基于此结果。

1.2.3 骨质疏松大鼠模型建立 选取雌性 SD 大鼠 3 只, 采用外科手术方法切除卵巢, 手术后 12 周可建立骨质疏松模型, 同时选取正常 SD 大鼠 3 只作为对照。

1.3 观察指标与方法

1.3.1 差异基因筛选 差异基因筛选采用 R 软件包 Linear^[8], 首先提供 1 个矩阵给 Linear, 矩阵用来描述各样本, Linear 根据矩阵信息建立线性模型, 并进行分组比较和 P 值校正, 校正采用 Bonferroni 法。最后根据差异表达倍数和 P 值筛选差异表达基因。本研究中设置差异表达倍数 2 倍以上, P<0.01 的基因为差异表达基因。根据基因表达值的相似性对差异表达基因和样本进行二维聚类, 聚类采用 Cluster 软件(版本 3.0), 聚类方法选择层次聚类。

采用 Cytoscape 软件(版本 3.0.2)的插件 BiNGO(版本 2.44)进行基因本体(gene ontology, GO)功能富集分析^[9], GO 功能富集分析采用 DAVID 在线提交(<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>)。富集分析应用超几何检验, 选取校正后 P<0.05 的 Term 作为差异基因富集条目(GO terms)。差异基因通路分析(通路)采用 cytoscape 软件(版本 3.0.2)的插件 ClueGO(版本 2.0.7)^[10], 通路信息来自基因组信息(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)的通路数据库(<http://www.genome.jp/kegg/通路.html>), 该步骤的检验方法与 GO 富集分析方法相同。

1.3.2 差异表达基因 PPI 网络分析和关键基因筛选 为了研究差异基因之间的相互关系, 对筛选到的差异基因做蛋白质相互作用(protein protein interaction, PPI)网络分析, 分析采用在线工具 FunCoup(<http://funcoup.sbc.su.se/search/>)^[11-12], FunCoup 中的 PPI 数据来源于 irefindex(<http://irefindex.org/wiki/index.php?title=iRefIndex>)和已发表的文献。

1.3.3 骨质疏松大鼠模型基因验证 两组大鼠处死后, 取下肢股骨颈标本, 经过脱水、包埋等步骤, 苏木素-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色法对两组股骨颈标本进行染色鉴定。此外, 同时行 TRAP 及 CaV1.3 的免疫荧光染色, 标本经抗原修复, 血清封闭处理后, 分别用兔抗大鼠 TRAP 一抗(1:100 稀释)和小鼠抗大鼠 CaV 1.3 一抗(1:100 稀释)标记, 于 4℃湿盒中孵育过夜, 加入荧光二抗(1:100 稀释), 最后经 DAPI 复染核等处理。使用 IPP 6.0 软件对免疫荧光照片进行光密度分析, 每只大鼠取 3 个标本, 每

个标本取 2 个 400 倍视野分析,取平均光密度。

1.4 统计学处理

应用 SPSS 26.0 软件进行统计分析,平均荧光强度为定量资料,以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 student *t* 检验进行两组间比较,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 高 PBM 与低 PBM 差异基因分析

差异基因筛选共得到基因 283 个,与高 PBM 样本相比,低 PBM 样本中有 135 个基因表达量上调,148 个基因表达量下调。基因水平上,表达量上调基因和下调基因聚为两类,没有功能注释的差异基因根据表达值被聚到各个类别;样本水平上低 PBM 样本和高 PBM 样本被聚为两类(图 1)。GO 功能富集分析结果显示,共 4 个 GO Terms 符合条件(表 1),4 个 GO Terms 都属于“细胞组成”类别,均与细胞质膜的组成相关(图 2)。

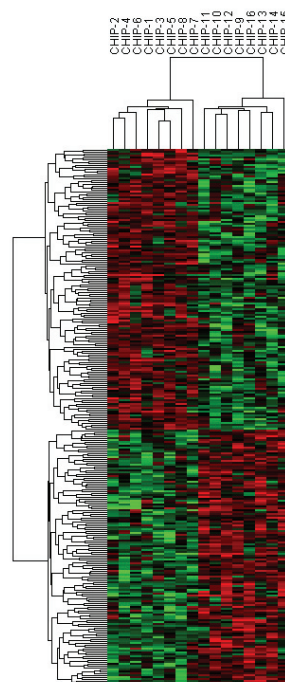


图 1 高 PBM 与低 PBM 差异基因聚类结果

Fig.1 Result of differentially expressed genes clustering between high and low PBM

表 1 GO 功能富集分析富集结果

Tab.1 GO enrichment results of differentially expressed genes

GO ID	GO Term	基因数目	P 值
GO:0005886	plasma membrane	95	0.017
GO:0044459	plasma membrane part	63	0.011
GO:0031226	intrinsic to plasma membrane	40	0.017
GO:0005887	integral to plasma membrane	38	0.034

KEGG 分析结果显示,共 7 个通路 与 12 个 差异 基因 被 富 集 (表 2)。在 富 集 到 的 7 个 通路 中,有 2 个 通路 与 细胞 免疫 相 关:mTOR signaling pathway 和 Regulation of autophagy,这也是单核细胞作为免疫组织组成部分具备的基本功能。另有 3 个通路 与 矿 物 质 吸 收 和 运 输 有 着 直 接 或 间 接 关 系。其中,Mineral absorption,Proximal tubule bicarbonate reclamation 通路 直 接 参 与 矿 物 质 代 谢,Carbohydrate digestion and

absorption 通路则是间接参与矿物质代谢。通过对差异基因的 GO 富集和通路分析,筛选出了一些与单核细胞基本功能以及矿物质代谢相关的通路和基因,由于各个通路之间存在相互关系,同一个基因也会在不同通路中起作用,根据差异基因通路富集结果,结合数据库中的通路内容,将这些差异基因的相互关系绘制到一幅图上(图 3)。

2.2 网络分析和关键基因筛选

PPI 网络分析结果显示,本研究中筛选到的差异基因中有 35 个与其他基因有潜在相互作用(图 4),其中有 11 个差异表达基因互相间存在蛋白相互作用(表 3)。

2.3 骨质疏松大鼠关键基因的验证

HE 染色结果可见,较之正常组,建模 12 周大鼠

表 2 高 PBM 与低 PBM 差异基因通路富集结果

Tab.2 Pathway enrichment results of differentially expressed genes between high PBM and low PBM

KEGG 通路编号	通路描述	通路相关基因	P 值
KEGG:04964	Proximal tubule bicarbonate reclamation	ATP1A4 SLC4A4	0.0196
KEGG:04512	ECM-receptor interaction	COL5A2 LAMB3 TNXB	0.0462
KEGG:04973	Carbohydrate digestion and absorption	ATP1A4 CACNA1D	0.0368
KEGG:04150	mTOR signaling pathway	PRKAA2 RPS6KA2	0.0087
KEGG:04970	Salivary secretion	ADRB3 ATP1A4 PRKG1 TRPV6	0.0098
KEGG:04978	Mineral absorption	ATP1A4 TRPV6	0.0084
KEGG:04140	Regulation of autophagy	IFNA4 PRKAA2	0.0408

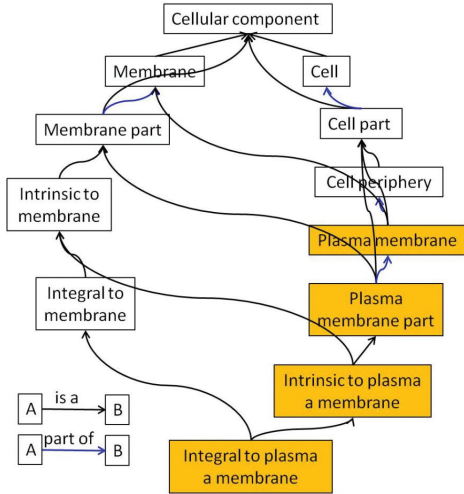


图 2 富集的上-下游基因。黄色背景表示显著富集的 GO Terms

Fig.2 Up and down-streams of enriched GO terms. Yellow background indicates significantly enriched GO terms

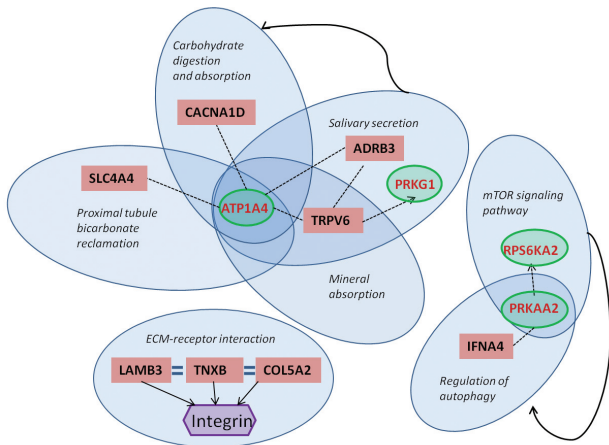


图 3 高 PBM 与低 PBM 差异基因通路图。浅蓝色椭圆区域表示特定 KEGG 通路,此区域内的斜体字表示该通路名称;红色背景黑色字表示基因简称,绿色背景红色字表示酶的简称,紫色背景黑色字表示基因共同作用产物;黑色无箭头虚线表示同处一个通路中的基因,但互相之间无直接联系,黑色有箭头虚线表示在通路中属于上下游的关系,但不是直接作用。黑色有箭头实线表示直接产物或上下游的关系;外围黑色有箭头曲实线表示通路之间有上下游关系

Fig.3 Differentially expressed genes relationship in pathways between high PBM and low PBM. The light blue oval region represents a specific KEGG pathway, and the italics within this region represent the pathway name. Red background black word refers to gene abbreviation, green background red word refers to enzyme abbreviation, purple background black word refers to gene interaction product. Black dotted lines without arrows indicate genes in the same pathway, but not directly related to each other. Black dotted lines with arrows indicate upstream and downstream relationships in the pathway, but not directly involved. Black arrows straight solid lines indicate direct products or upstream and downstream relationships. The black outer curved lines with arrows indicate upstream and downstream relationships between paths

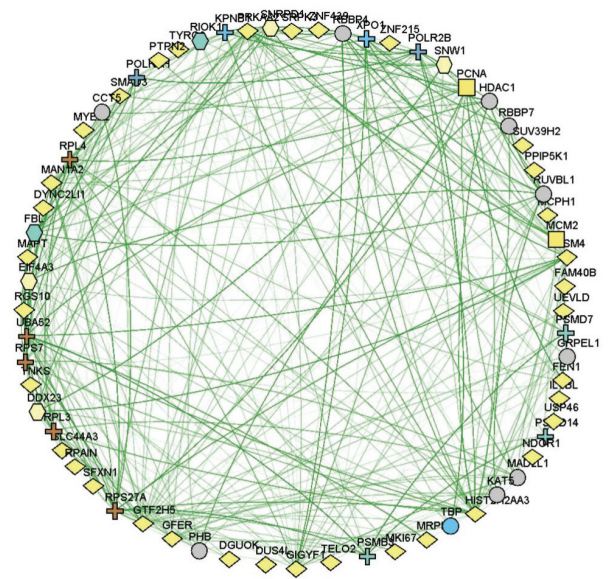


图 4 差异表达基因互相关存在 PPI 网络。黄色菱形:筛选出的差异表达基因;灰色圆圈:other 基因;蓝色圆圈:转录因子;黄色方块:类胡萝卜素生物合成;绿色加号:蛋白酶;橙色加号:蛋白质输出;蓝色加号:嘧啶代谢;亮蓝色加号:RNA 转运;绿色六边形:真核生物核糖体生物合成

Fig.4 Differentially expressed genes PPI network. Yellow diamonds represent screening of differentially expressed genes. Grey circles represent other genes. Blue circle represents transcription factors. Yellow square represents carotenoid biosynthesis. Green plus represents protease. Orange plus represents protein output. Blue plus sign represents pyrimidine metabolism. Bright blue plus signs represents RNA transhipment. Green hexagons represents eukaryotes ribosome biosynthesis

表 3 存在蛋白相互作用差异表达基因
Tab.3 PPI of differentially expressed genes

Gene1	Gene2
PRKAA2	PPIP5K1, MAN1A2, TYRO3
LSM4	HIST2H2AA3
GTF2H5	MAN1A2
GFER	UEVLD
IGLC1	IGHA1
MAN1A2	PRKAA2, GTF2H5

股骨颈骨小梁间隙明显增宽, 呈现骨质疏松病理改变(图 5a-5b)。免疫荧光染色结果显示, 骨质疏松大鼠股骨颈组织中 TRAP(图 5c-5d)、电压门控钙离子通道 1.3(CaV 1.3)表达均明显增强(图 5e-5f)。骨质疏松组与对照组的 TRAP 及 CaV 1.3 荧光强度差异均有统计学意义(见表 4、图 6)。

3 讨论

3.1 OC 在骨质疏松的发病中的作用

骨骼是一种动态的、不断新陈代谢的活组织, 也就是骨重塑的过程。在此过程中, 有新骨形成、旧骨

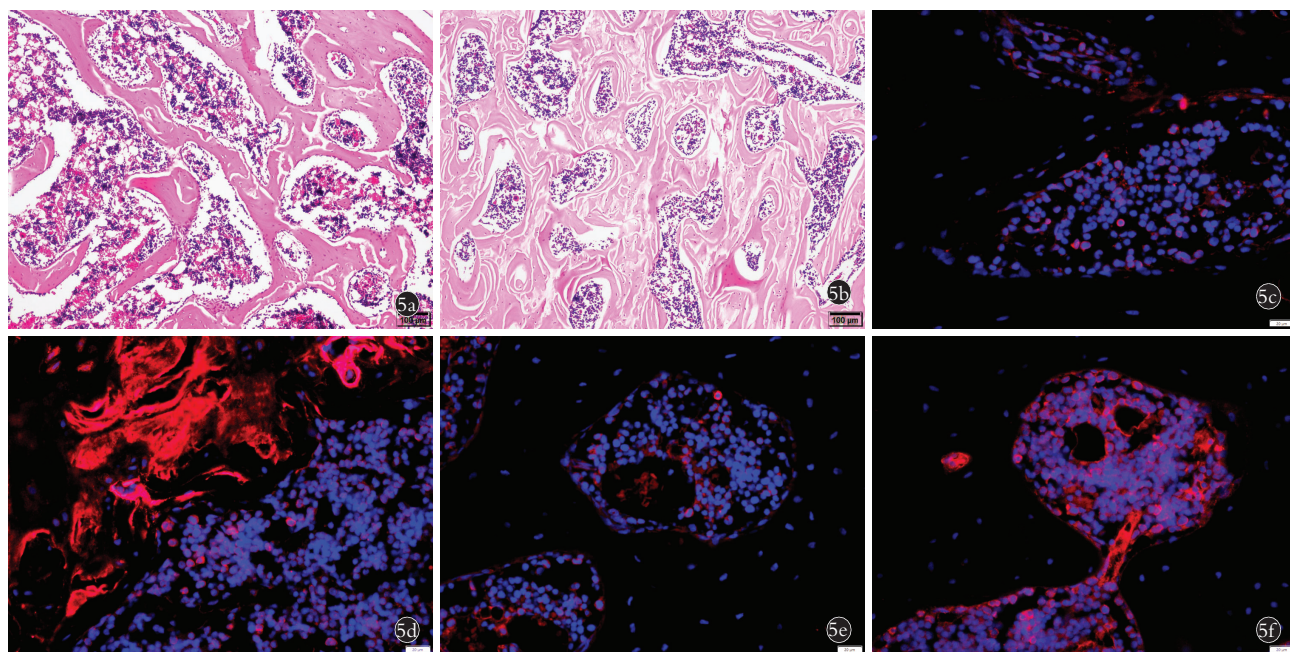


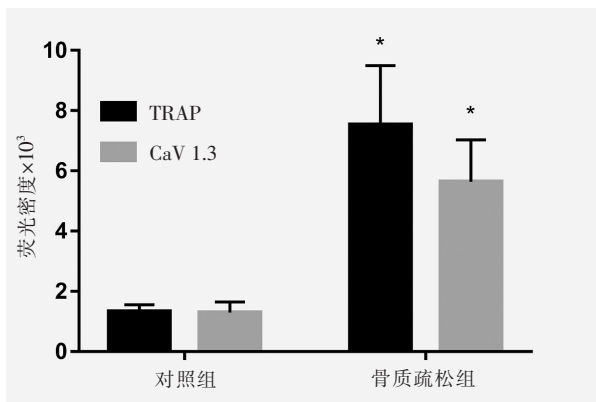
图 5 骨质疏松大鼠模型建立及 CaV 1.3 表达的检测 5a,5b. 正常和骨质疏松大鼠股骨颈组织 HE 染色(400×) 5c,5d. 免疫荧光染色检测正常和骨质疏松大鼠股骨颈组织 TRAP 表达(400×) 5e,5f. 免疫荧光染色检测正常和骨质疏松大鼠股骨颈组织 CaV 1.3 表达(400×)

Fig.5 Establishment of osteoporosis rat model and detection of CaV 1.3 expression 5a,5b. HE staining of normal and osteoporotic femoral neck tissues of rats (400×) 5c,5d. Immunofluorescence staining was used to detect TRAP expression in the femoral neck tissues of normal and osteoporosis rats (400×) 5e,5f. The expression of CaV 1.3 in femoral neck tissues of normal and osteoporosis rats was detected by immunofluorescence staining (400×)

表 4 两组大鼠股骨颈组织中 TRAP 和 CaV 1.3 表达荧光强度(̄±s)

Tab.4 Fluorescence intensity of TRAP 和 CaV 1.3 expression in the femoral neck tissues of the two groups(̄±s)
单位:×10³

组别	鼠数	TRAP 荧光密度	CaV1.3 荧光密度
骨质疏松组	3	5.14±1.85	4.21±0.69
对照组	3	0.86±0.22	0.91±0.28
t 值		9.406	9.047
P 值		<0.001	<0.001



注: * 与对照组相比, P<0.05

图 6 TRAP 和 CaV 1.3 表达荧光强度

Fig.6 Fluorescence intensity of TRAP 和 CaV 1.3 expression

吸收,并保持平衡,衰老、绝经、疾病等情况可使得骨重塑失衡,骨吸收增强,导致骨丢失增加,这是骨质疏松症重要的发病机制。而 OC 是负责骨吸收的主要细胞,这些多核巨细胞由来源于骨髓造血干细胞系的单核细胞前体融合而成,活化的 OC 可通过分泌蛋白水解酶等酶、H⁺等,溶解骨矿盐、降解有机质。因此 OC 被认为是抗骨质疏松治疗的重要靶点^[13],很多新的治疗策略旨在抑制 OC 的分化、防止 OC 导致的过度的骨吸收^[6]。本实验结果也验证了这一点,在骨质疏松大鼠骨组织中,OC 特异性标志物 TRAP 表达明显增强,提示 OC 分化明显增多,OC 的分化或其功能改变所导致的骨重塑失衡是骨质疏松症重要的病理基础^[14]。

OC 的生成、分化主要由巨噬细胞集落刺激因子

和 RANKL/RANK 介导,其中核因子-κB 配体受体活化因子配体 (receptor activator of nuclear factor-κB ligand,RANKL)是特异性诱导 OC 生成的最重要的调节性细胞因子^[15]。RANKL 与 OC 前体表面表达的 RANK 结合后,活化的 RANK 招募肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor,TNF)受体相关因子家族^[16],并最终激活 OC 分化的主要转录因子-活化 T 细胞核因子受体 c1 (nuclear factor of activated T-cells,cytoplasmic 1,NFATc1)^[17]。活化的 NFATc1 进一步促进 OC 特异性基因的表达,如抗酒石酸酸性

磷酸酶、组织蛋白酶 K、降钙素受体等^[18]。NFATc1 在 RANKL 诱导的 OC 分化过程的转录程序中起着不可或缺的作用。而 Ca^{2+} 信号被认为是有助于维持 NFATc1 的持久转录激活。事实上,研究发现,在 OC 形成的任何阶段,如果没有 Ca^{2+} 信号,OC 的生成、活化都会受到抑制^[19-20]。因此,对 OC 活化所必需的 NFATc1 诱导来说, Ca^{2+} 信号是必不可少的。目前已知 OC 中多种细胞膜和细胞内元件参与调节细胞内 Ca^{2+} 浓度,包括瞬时受体电位通道、浆膜蛋白 G 蛋白信号调节因子 12、 K^{+} 通道、 Ca^{2+} -ATP 酶和 Na^{+} - Ca^{2+} 交换器以及胞内储存 Ca^{2+} 的细胞器内质网、溶酶体等^[21]。

3.2 钙通道相关基因与女性 PBM 的关系

本研究通过对高低 PBM 两组共 16 个成年女性的单核细胞进行全基因组范围内的差异基因筛选,共找到了 283 个差异表达基因。对这些差异基因进行功能和代谢通路研究发现,这些差异基因中与细胞质膜功能相关的基因被显著富集,细胞质膜在人体中除了构成细胞屏障外,最主要的功能是运输,如离子和蛋白产物的运送等。进一步的代谢通路研究发现,与钙和碳酸氢盐运输相关的蛋白或酶被显著富集,如 TRPV6 和 CACNA1D 基因。其中 TRPV6 编码的 TRP 通道是目前已知的参与调节细胞内 Ca^{2+} 浓度的细胞元件,研究证实 TRPV6 缺失促进破骨细胞的分化和功能,导致骨质减少^[22]。而 CACNA1D 是属于 L 型电压门控钙通道(voltage-gated calcium channels, VGCC) 的 $CaV1.3$ 的 α 亚单位的编码基因^[23],它与 OC 分化的相关性尚无相关报道。

VGCC 由 $\alpha 1$ 、 β 、 γ 和 $\alpha 2\delta$ 亚基构成,按照 $\alpha 1$ 亚基的基因型,可分为 $CaV1$ (按照电流门控特性分类为 L 型 VGCC)、 $CaV2$ 、 $CaV3$ 这 3 个家族。 $CaV1$ 家族编码 4 个不同的亚型,即 $CaV1.1$ 、 $CaV1.2$ 、 $CaV1.3$ 和 $CaV1.4$, 表现为激发和持续的电流时间较长,对二氢吡啶拮抗剂和激动剂敏感^[23]。 $CaV1.3$ 的 $\alpha 1$ 亚基基因型为 $\alpha 1 D$,由 1992 年 WILLIAMS 等^[24]在脑组织中克隆鉴定发现。 $CaV1.3$ 被归类为高电压激活通道(high voltage activated channels, HVA),但与其它 HVA CaV 相比, $CaV1.3$ 可以在更低电压下工作,这使得其能够参与听觉、心脏、内分泌和神经系统相关的特殊功能。已知 $CaV1.3$ 表达于多种组织,如窦房结和心房,神经元,嗜铬细胞和胰岛。最初的研究来源于基因敲除小鼠和基因突变的人类,发现 $CaV1.3$ 功能丧失主要表现为耳聋和窦房结功能障碍^[25]。近年来大规模的人群基因测序发现,CACNA1D($CaV1.3 \alpha 1$) 变异可引起严重的神经发育综合征或不伴内分泌症状、自闭症谱系病,以及内分泌疾

病-原发性醛固酮增多症^[26]。目前,对 $CaV1.3$ 相关的功能和药物研究主要集中在神经精神系统疾病,后来的研究揭示了 $CaV1.3$ 更多的生理功能,比如 $CaV1.3$ 也表达于 T 细胞,用反义寡核苷酸抑制 Th2 细胞中 $CaV1.3$ 的表达,会导致 T 细胞抗原受体刺激后 Ca^{2+} 内流受阻和细胞因子的分泌^[27]。但是 $CaV1.3$ 与骨质疏松的相关性目前却鲜有研究报道。多个研究显示,L 型 VGCC 抑制剂具有抗骨质疏松的作用^[28-30],其作用可能是直接或间接抑制 OC 的分化和活性,具体涉及何种钙通道蛋白尚不十分清楚。本研究结果显示 $CaV1.3 \alpha 1$ 亚基的编码基因在高低 PBM 女性中的表达存在差异,提示 $CaV1.3$ 介导的 Ca^{2+} 变化可能与 OP 的发生及发展有密切关系。此外,本研究结果显示,不同的 PBM 女性除了矿物质代谢相关的基因表达有差异,还有细胞自噬、mTOR 信号通路相关的基因表达有差异,这在其他一些研究中也都有所报道^[31]。对差异基因的 PPI 网络分析,发现了 11 个差异基因存在潜在的蛋白间相互作用,这些基因的功能多样,亚细胞定位也不一致,这些相互作用的基因与女性 OP 的关系目前还没有直接证据证明,这也是下一步研究的方向之一。

3.3 钙通道相关基因与骨质疏松关系的验证

本实验研究结果显示 OP 大鼠骨组织中, $CaV1.3$ 的表达强度显著增强,这也进一步验证了 $CaV1.3$ 与 OP 的关系。值得注意的是,从表达的部位看,TRAP 集中表达于骨小梁,提示 OC 主要集中在骨小梁周围,而 $CaV1.3$ 却表达于骨髓腔中,提示 $CaV1.3$ 并未高表达于 OC。笔者推测 $CaV1.3$ 可能表达于骨髓腔中的单核细胞,促进其分化为 OC。目前关于 $CaV1.3$ 在 OC 的分化和功能中的作用尚不明了, $CaV1.3$ 在 OP 中的作用也不十分清楚,它有可能通过独立于经典途径之外的通路调控 OC,也可能通过 Ca^{2+} 通路信号转导影响经典的 OC 分化通路,这些都需要进一步研究证实。

综上所述,高 PBM 和低 PBM 女性之间存在多种基因表达差异,部分基因可能是导致 OP 发生与发展的关键基因,如 $CaV1.3$ 的基因表达水平的差异可能导致低 PBM 女性发生 OP,目前的动物实验也在一定程度上证实了这一点,提供了 OP 防治的潜在靶点,针对钙离子通道蛋白的抑制剂可能成为 OP 新的治疗手段。

参考文献

- [1] HENDRICKX G,BOUDIN E,VAN HUL W. A look behind the scenes: the risk and pathogenesis of primary osteoporosis[J]. Nat Rev Rheumatol, 2015, 11(8): 462-474.
- [2] 中华医学会骨质疏松和骨矿盐疾病分会. 原发性骨质疏松症诊疗指南(2017)[J]. 中国骨质疏松杂志, 2019, 25(3): 51.

- OSTEOPOROSIS AND BONE MINERAL DISEASE BRANCH OF THE CHINESE MEDICAL ASSOCIATION. Guidelines for the diagnosis and management of primary osteoporosis(2017)[J]. Chin J Osteoporos, 2019, 25(3):51. Chinese.
- [3] LIN X, XIONG D, PENG Y Q, et al. Epidemiology and management of osteoporosis in the People's Republic of China: current perspectives[J]. Clin Interv Aging, 2015, 10:1017-1033.
- [4] CURTIS E M, MOON R J, DENNISON E M, et al. Recent advances in the pathogenesis and treatment of osteoporosis[J]. Clin Med (Lond), 2016, 16(4):360-364.
- [5] BONJOUR J P, CHEVALLEY T, FERRARI S, et al. The importance and relevance of peak bone mass in the prevalence of osteoporosis[J]. Salud Publica Mex, 2009, 51(Suppl 1):S5-S17.
- [6] RACHNER T D, KHOSLA S, HOFBAUER L C. Osteoporosis: now and the future[J]. Lancet, 2011, 377(9773):1276-1287.
- [7] HUBBELL E, LIU W M, MEI R. Robust estimators for expression analysis[J]. Bioinformatics, 2002, 18(12):1585-1592.
- [8] SMYTH G K. Linear models and empirical Bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments[J]. Stat Appl Genet Mol Biol, 2004, 3: Article3.
- [9] MAERE S, HEYMANS K, KUIPER M. BiNGO: a Cytoscape plugin to assess overrepresentation of gene ontology categories in biological networks[J]. Bioinformatics, 2005, 21(16):3448-3449.
- [10] BINDEA G, MLECNIK B, HACKL H, et al. ClueGO: a Cytoscape plug-in to decipher functionally grouped gene ontology and pathway annotation networks [J]. Bioinformatics, 2009, 25(8):1091-1093.
- [11] ALEXEYENKO A, SCHMITT T, TJÄRNBERG A, et al. Comparative interactomics with funcoup 2.0[J]. Nucleic Acids Res, 2012, 40(Database issue):D821-D828.
- [12] ALEXEYENKO A, SONNHAMMER E L. Global networks of functional coupling in eukaryotes from comprehensive data integration [J]. Genome Res, 2009, 19(6):1107-1116.
- [13] 赵有顺, 林平, 涂迎春, 等. 慢病毒介导 siRNA hsa-circ-0000885 转染 BMSCs 与破骨细胞共培养体系对细胞分化、增殖和凋亡相关研究[J]. 中国骨伤, 2021, 34(10):978-984.
- ZHAO Y S, LIN P, TU Y C, et al. Lentivirus-mediated siRNA hsa-circ-0000885 transfection of BMSCs and osteoclast co-culture system on cell differentiation, proliferation and apoptosis [J]. China J Orthop Traumatol, 2021, 34(10):978-984. Chinese.
- [14] TEITELBAUM S L. Bone resorption by osteoclasts[J]. Science, 2000, 289(5484):1504-1508.
- [15] YASUDA H, SHIMA N, NAKAGAWA N, et al. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95(7):3597-3602.
- [16] WONG B R, JOSIEN R, LEE S Y, et al. The TRAF family of signal transducers mediates NF- κ B activation by the TRANCE receptor[J]. J Biol Chem, 1998, 273(43):28355-28359.
- [17] KOBAYASHI N, KADONO Y, NAITO A, et al. Segregation of TRAF6-mediated signaling pathways clarifies its role in osteoclastogenesis[J]. EMBO J, 2001, 20(6):1271-1280.
- [18] NAKASHIMA T, HAYASHI M, TAKAYANAGI H. New insights into osteoclastogenic signaling mechanisms [J]. Trends Endocrinol Metab, 2012, 23(11):582-590.
- [19] SHINOHARA M, KOGA T, OKAMOTO K, et al. Tyrosine kinases Btk and Tec regulate osteoclast differentiation by linking RANK and ITAM signals[J]. Cell, 2008, 132(5):794-806.
- [20] YANG S Y, LI Y P. RGS10-null mutation impairs osteoclast differentiation resulting from the loss of $[Ca^{2+}]_i$ oscillation regulation [J]. Genes Dev, 2007, 21(14):1803-1816.
- [21] OKADA H, OKABE K, TANAKA S. Finely-tuned calcium oscillations in osteoclast differentiation and bone resorption[J]. Int J Mol Sci, 2020, 22(1):180.
- [22] CHEN F J, NI B, YANG Y O, et al. Knockout of TRPV6 causes osteopenia in mice by increasing osteoclastic differentiation and activity[J]. Cell Physiol Biochem, 2014, 33(3):796-809.
- [23] 宋方俊, 郭江涛. 电压门控离子通道结构生物学研究进展[J]. 浙江大学学报(医学版), 2019, 48(1):25-33.
- SONG F J, GUO J T. Progress on structural biology of voltage-gated ion channels [J]. J Zhejiang Univ Med Sci, 2019, 48(1):25-33. Chinese.
- [24] WILLIAMS M E, FELDMAN D H, MCCUE A F, et al. Structure and functional expression of alpha 1, alpha 2, and beta subunits of a novel human neuronal calcium channel subtype [J]. Neuron, 1992, 8(1):71-84.
- [25] BAIG S M, KOSCHAK A, LIEB A, et al. Loss of Cav1.3 (CACNA1D) function in a human channelopathy with bradycardia and congenital deafness [J]. Nat Neurosci, 2011, 14(1):77-84.
- [26] ORTNER N J, KASERER T, COPELAND J N, et al. De novo CACNA1D Ca^{2+} channelopathies: clinical phenotypes and molecular mechanism [J]. Pflugers Arch, 2020, 472(7):755-773.
- [27] CABRAL M D, PAULET P E, ROBERT V, et al. Knocking down Cav1 calcium channels implicated in Th2 cell activation prevents experimental asthma [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2010, 181(12):1310-1317.
- [28] KOIDE M, KINUGAWA S, NINOMIYA T, et al. Diphenylhydantoin inhibits osteoclast differentiation and function through suppression of NFATc1 signaling [J]. J Bone Miner Res, 2009, 24(8):1469-1480.
- [29] GRADOSOVA I, ZIVNA H, PALICKA V, et al. Protective effect of amlodipine on rat bone tissue after orchidectomy [J]. Pharmacology, 2012, 89(1/2):37-43.
- [30] WANG B X, BI M, ZHU Z, et al. Effects of the antihypertensive drug benidipine on osteoblast function in vitro [J]. Exp Ther Med, 2014, 7(3):649-653.
- [31] FAN P, PU D, LV X H, et al. Cav 1.3 damages the osteogenic differentiation in osteoporotic rats by negatively regulating Spred 2-mediated autophagy-induced cell senescence [J]. J Cell Mol Med, 2020, 24(23):13863-13875.

(收稿时间:2022-05-28 本文编辑:朱嘉)