

· 研究论文 ·

DOI: 10.16605/j.cnki.1007-7847.2020.02.003

GWGS 芯片整合分析识别外周血细胞中与骨质疏松症相关的枢纽基因

黎海霞, 许 阳, 邓凯丽, 李 然, 肖苏妹*

(中山大学 公共卫生学院, 中国广东 广州 510030)

摘要: 为了对骨质疏松症基因芯片数据集进行整合分析并识别出外周血细胞中与骨质疏松症相关的枢纽基因, 通过检索 GEO 和 ArrayExpress 数据库获得骨质疏松症相关的表达谱芯片数据集; 运用 GWGS (genome-wide global significance) 方法对纳入的数据集进行整合分析, 筛选出差异表达基因 (differentially expressed genes, DEGs); 然后, 运用 GO (gene ontology) 富集分析和 KEGG (kyoto encyclopedia of genes and genomes) 通路富集分析对差异表达基因进行功能注释, 并建立蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络, 筛选出骨质疏松症相关的枢纽基因。公共数据库检索得到 3 个符合纳入排除标准的研究集, GWGS 整合分析筛选出排序前 200 的 DEGs, 这些基因主要富集的 GO 条目为脂多糖的细胞反应、凋亡过程和炎症反应, 与骨质疏松症相关的 KEGG 富集通路为破骨细胞分化等。PPI 分析进一步检测到与骨质疏松症相关的 10 个枢纽基因, 其中 9 个基因已有研究报道和骨质疏松症的发生发展相关, 而 *ELANE* 基因还未有研究报道与骨质疏松症有关。*ELANE* 基因同时在人的骨髓组织、小鼠骨髓和骨组织中高表达, 这个基因很可能与骨质疏松症有潜在的联系。本研究的结果将有助于进一步理解骨质疏松症的分子致病机理。

关键词: 骨质疏松症; 外周血细胞; 表达谱; 基因芯片; GWGS 方法; 差异表达基因 (DEGs)

中图分类号: Q75

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2020)02-0102-07

Identification of Osteoporosis Related Hub Genes in Peripheral Blood Cells by Integration Analysis of Microarray Data Using GWGS Method

LI Hai-xia, XU Yang, DENG Kai-li, LI Ran, XIAO Su-mei*

(School of Public Health, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510030, Guangdong, China)

Abstract: To identify hub genes of osteoporosis by integration analysis using microarray data, the osteoporosis-related gene expression data were collected from public databases, i.e. GEO and ArrayExpress, and then the genome-wide global significance (GWGS) method was applied to integrate the identified data and screen the differentially expressed genes (DEGs). GO and KEGG pathway analysis of the DEGs were used for the functional annotation. Protein-protein interaction (PPI) network was constructed to find the hub genes. Three datasets that met the inclusion and exclusion criteria were included in the analysis. The top 200 DEGs were selected according to the GWGS values. These genes were mainly enriched in three GO terms, including cellular response to lipopolysaccharide, apoptotic process, and inflammatory response. Osteoporosis related signaling pathway, i.e. osteoclast differentiation, was enriched in KEGG pathway analysis. The PPI network

收稿日期: 2019-12-15; 修回日期: 2020-01-18

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81400857); 广东省自然科学基金资助项目(2017A030313697); 广州市珠江科技新星计划项目(201610010093)

作者简介: 黎海霞(1993—), 女, 广东茂名, 硕士研究生; *通信作者: 肖苏妹(1981—), 女, 湖南娄底人, 博士, 中山大学副教授, 主要从事慢性病流行病学研究, Tel: 020-87335498, E-mail: xiaosm3@mail.sysu.edu.cn.

analysis identified 10 hub genes of osteoporosis. Nine of them have been reported to be related to the development of osteoporosis, while the gene *ELANE* has not been reported to be related to osteoporosis. *ELANE* was found to have high expression in human bone marrow, mouse bone marrow and bone. This indicates that it could be involved in the pathogenesis of osteoporosis. Results from this study may be helpful for further understanding the molecular pathogenesis of osteoporosis.

Key words: osteoporosis; peripheral blood cells; gene expression profiles; microarray; genome-wide global significance (GWGS); differentially expressed genes (DEGs)

(*Life Science Research*, 2020, 24(2): 102~108)

骨质疏松症是一种由于骨密度(bone mineral density, BMD)降低和骨微结构退化,引起骨强度降低,使得骨折风险增加的常见疾病^[1]。目前世界上约 2 亿人患有该疾病,其中 80%是年龄大于 60 岁的女性^[2]。在中国,骨质疏松症在过去 10 年中的发病率显著升高,从 2008 年之前的 14.9%增加至 2012-2015 年间的 27.9%,而且相同年龄组中女性的发病率显著高于男性^[3-4]。

骨质疏松症是一种由遗传因素、环境因素以及它们的相互作用共同决定的复杂疾病。遗传因素对骨质疏松症的发生发展有着重要影响。BMD 是骨质疏松症临床诊断的重要指标,也是最常用的研究表型。研究证实 BMD 具有较高的遗传率(0.5~0.85)^[5]。低 BMD 的病理机制包括破骨细胞的寿命延长和成骨细胞、骨细胞的过早凋亡^[6]。外周血单核细胞(peripheral blood monocytes, PBMs)和 B 淋巴细胞是骨质疏松症相关研究的重要细胞类型,均参与形成破骨细胞。体外研究显示, PBMs 在合适的微环境中可以分化为有功能的破骨细胞^[7-8]; B 淋巴细胞能通过 RANKL (receptor activator of NF- κ B ligand) 通路促进破骨细胞的形成^[9]。PBMs 及 B 淋巴细胞与破骨细胞关系密切,通过参与破骨细胞生成,最终影响骨吸收和骨形成之间的平衡。

现在已有一些基于表达谱芯片鉴定骨质疏松症相关基因的研究报道^[10-12]。但是这些研究的结论并不一致,原因可能是单个研究样本量太少使得统计学功效不足,而对芯片数据展开整合分析能增加研究样本量,提高结果的稳健性。由于不同研究间的 *P* 值差异可能较大,其中 *P* 值最小的研究会很大程度上决定整合 *P* 值的结果,所以传统的基于 *P* 值的 meta 分析对于整合小样本量的研究并不合适。基于基因组的总体显著性(genome-wide global significance, GWGS)的整合分析方法则是首先将不同数据集差异表达基因(differentially

expressed genes, DEGs)的表达倍数绝对值由大到小进行排序,再根据整合后的序号对基因进行排序筛选,这种方式消除了因不同研究的 *P* 值差异很大对结果产生的影响,因此更适合用于整合小样本量的研究^[13]。本研究应用 GWGS 方法来整合分析公共数据库中可获得的 PBMs 及 B 淋巴细胞的基因表达谱芯片数据,以鉴定外周血细胞中与骨质疏松症相关的枢纽基因。

1 材料与方法

1.1 基因表达数据集的筛选

从 GEO (Gene Expression Omnibus, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geoquery/>)和 ArrayExpress (<http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/>)数据库中寻找骨质疏松症相关的表达谱芯片数据。分别用关键词“骨质疏松症”“骨密度”“BMD”进行检索,然后根据以下纳入排除标准进行筛选。纳入标准: 1) 研究对象为成年女性; 2) 研究类型为病例-对照研究,且样本量大于 10; 3) 研究样本来自全血组织。排除标准: 1) 研究对象为继发性骨质疏松症患者,或患有影响骨代谢的疾病; 2) 公共数据库上无法获得基因表达谱芯片原始数据。

1.2 数据预处理及差异表达基因的获得

下载纳入研究的原始文件后,用 R 语言(v3.3.3)中的 Bioconductor 包进行数据处理。原始数据用 Affy 包进行读取^[14],用 RMA (Robust Multichip Average)进行背景校正^[15],并在 R 中用层次聚类和主成分分析进行质量控制。探针编号转为对应的基因后,如果多个探针对应同一个基因,则用这些探针的平均值代表这个基因的表达值。纳入的研究用 limma 包识别 DEGs^[16]。

1.3 GWGS 整合分析

将不同数据集中的 DEGs 根据病例组和对照组之间表达倍数的绝对值由大到小进行排序,基因表达倍数越大,序号越小。假设有 *n* 个数据集,

m 个基因, 可得到一个 $m \times n$ 的矩阵 R , 矩阵中第 i 列第 j 行的数 r_{ij} 表示第 i 个数据集第 j 个基因的排序序号。计算第 i 个数据集第 j 个基因的 GWGS 值 S_{ij} 的公式为 $S_{ij} = -2(\log \frac{r_{ij}}{m})$, 基因表达倍数的绝对值越大, r_{ij} 值越小, S_{ij} 值越大。对于每个基因, n 个数据集整合的 GWGS 值 S_j^r 的计算公式

$$S_j^r = \sum_{i=1}^n \omega_i S_{ij}, \omega_i \text{ 表示第 } i \text{ 个数据集的权重, 由数据集样本量决定。}$$

最终选出整合 GWGS 值最高的 200 个 DEGs 进行后续分析。以上公式均可于文献[13]中直接获得。

1.4 基因功能注释和蛋白质相互作用网络的构建

对筛选出的 200 个基因通过 DAVID 数据库 (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery, v6.8, <https://david.ncifcrf.gov/>) 进行 GO (gene ontology) 富集分析和 KEGG (kyoto encyclopedia of genes and genomes) 通路分析。用 STRING (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins, v11, <https://string-db.org/>) 进行蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络的构建^[17], 并用 Cytoscape 进行可视化处理^[18]。PPI 中的节点 (node) 代表相应的蛋白质, 边 (edge) 代表两个蛋白质之间存在相互作用, 度 (degree) 代表某蛋白质与网络中其他蛋白质存在直接相互作用的个数。度的数值越大代表该基因越可能是骨质疏松症相关的枢纽基因 (hub gene)。

2 结果

2.1 纳入研究的基本情况

根据筛选流程和纳入排除标准, 本研究共纳入 3 个涉及骨质疏松症研究的表达谱基因芯片数据集 (GSE56815、GSE7429 和 GSE7158)。具体信息如表 1 所示, 其中 2 个研究来自 PBMs, 相应的芯片平台是 Affymetrix Human Genome U133A Array;

1 个研究来自 B 淋巴细胞, 相应的平台是 Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA)。纳入的 3 个研究的研究对象均为成年女性, 年龄范围为 20~60 岁。经过质量控制, 把层次聚类中与总体距离最远以及在主成分分析结果中明显偏离总体的样本剔除, 最终的高低 BMD 样本数分别为 60 例和 59 例。根据世界卫生组织对 BMD 的定义, 这 60 例高 BMD 样本可归类为骨量正常人群, 59 例低 BMD 样本可归类为骨质疏松症或骨量减少人群^[19]。

2.2 GWGS 整合分析

进行数据预处理后, 共获得 12 420 个共同基因。针对每一个数据集, 采用 limma 包筛选出 DEGs, 剔除重复 DEGs 后, 共获得 4 069 个 DEGs。基于 GWGS 方法计算获得 DEGs 的整合 GWGS 值, 最终选出整合 GWGS 值最大的 200 个基因。表 2 列出了 GWGS 值排序为前 20 的基因的简称、全称及其在染色体中的位置。

2.3 功能注释和 PPI 分析

对 GWGS 值排序前 200 的 DEGs 进行 GO 富集分析和 KEGG 通路分析。GO 分析结果显示, 富集最显著的前 3 个条目分别为脂多糖的细胞反应 (cellular response to lipopolysaccharide, GO: 0071-222, $P=3.30E-05$)、凋亡过程 (apoptotic process, GO: 0006915, $P=1.60E-04$) 和炎症反应 (inflammatory response, GO: 0006954, $P=2.69E-04$)。表 3 展示了排序前 10 的 GO 富集条目的具体信息。KEGG 通路分析显示, 筛选出的基因富集于骨质疏松症相关信号通路。其中, 最显著的通路为破骨细胞分化通路 (osteoclast differentiation, hsa04380, $P=2.54E-03$)。表 4 展示了排序前 10 的 KEGG 富集通路条目的具体信息。由 200 个 DEGs 构建的 PPI 网络结果如图 1 所示, 该网络由 196 个节点和 511 条边组成。图中深色的节点代表枢纽基因, 节点越大, 代表连接度越大。结果显示其中 10 个基因的连接度大于 20, 提示为与骨质疏松症相关的枢纽

表 1 纳入研究的基本特征 ($n=3$)

Table 1 Basic characteristics of the included study ($n=3$)

ID	Platform	Sample size (low : high)	Outlier removed (low : high)	Age (years)	Sex	Tissue type
GSE56815	GPL96[HG-U133A]	40 : 40	4 (2 : 2)	54~60	Female	PBMs
GSE7429	GPL96[HG-U133A]	10 : 10	1 (1 : 0)	50~60	Female	B cells
GSE7158	GPL570[HG-U133_Plus_2]	12 : 14	2 (0 : 2)	20~45	Female	PBMs

注: “low”代表低 BMD, “high”代表高 BMD; PBMs 代表外周血单核细胞。

Notes: “low” represents low BMD, and “high” represents high BMD; PBMs are peripheral blood monocytes.

表 2 GWGS 值最大的前 20 个基因
Table 2 The top 20 genes with the highest GWGS values

Rank	Gene	Full name	Chromosome location
1	<i>EGR2</i>	<i>E3 SUMO-protein ligase EGR2</i>	10q21.3
2	<i>CEACAM8</i>	<i>Carcinoembryonic antigen related cell adhesion molecule family</i>	19q13.2
3	<i>LTF</i>	<i>Lactotransferrin</i>	3p21.31
4	<i>DEFA4</i>	<i>Neutrophil defensin 4</i>	8p23.1
5	<i>CAMP</i>	<i>Cathelicidin antimicrobial peptide</i>	3p21.31
6	<i>LCN2</i>	<i>Neutrophil gelatinase-associated lipocalin</i>	9q34.11
7	<i>FOLR3</i>	<i>Folate receptor gamma</i>	11q13.4
8	<i>MMP8</i>	<i>Neutrophil collagenase</i>	11q22.2
9	<i>GZMB</i>	<i>Granzyme B</i>	14q12
10	<i>CD24</i>	<i>Signal transducer CD24</i>	6q21
11	<i>ZEB2</i>	<i>Zinc finger E-box-binding homeobox 2</i>	2q22.3
12	<i>CRISP3</i>	<i>Cysteine rich secretory protein family</i>	6p12.3
13	<i>IFI44L</i>	<i>Interferon-induced protein 44-like</i>	1p31.1
14	<i>HLA-DQA1</i>	<i>Major histocompatibility complex, class II, DQ alpha 1</i>	6p21.32
15	<i>ZFP36</i>	<i>mRNA decay activator protein ZFP36</i>	19q13.2
16	<i>ELANE</i>	<i>Neutrophil elastase</i>	19p13.3
17	<i>ZNF652</i>	<i>Zinc finger protein 652</i>	17q21.32-q21.33
18	<i>HP</i>	<i>Haptoglobin</i>	16q22.2
19	<i>JUNB</i>	<i>Transcription factor jun-B</i>	19p13.13
20	<i>CTSD</i>	<i>Cathepsin D</i>	11p15.5

基因(表 5)。枢纽基因中具有最大度值的基因是位于 14 号染色体上的 *AKT1* 基因(度=44)。

3 讨论

本研究应用 GWGS 方法整合分析了 3 个骨质疏松症相关的表达谱芯片数据,对获得的 4 069 个 DEGs 展开分析,选出 GWGS 值最大的前 200 个基因,通过构建 PPI 网络,筛选出 10 个外周血细胞中与骨质疏松症相关的枢纽基因。

对于筛选到的这 10 个枢纽基因,既往研究

已发现其中 9 个基因参与骨代谢过程。*AKT1* 基因是度最大的枢纽基因,影响着破骨细胞和成骨细胞的功能。小鼠模型的研究显示 *Akt1* 可以控制破骨细胞和成骨细胞的分化^[20]。在小鼠研究中,降低 *Akt1* 的表达可同时影响破骨细胞和成骨细胞的功能,使得骨转换降低,从而引起骨量减少^[21]。另外有研究表明,*Akt1* 缺乏导致小鼠股骨 BMD、股骨皮质厚度和体积以及小梁厚度的降低^[22]。以上证据显示,*AKT1* 可能在骨质疏松症中起重要作用。但是,现阶段针对 *AKT1* 在人体内的功能研

表 3 GO 分析排序前 10 的条目
Table 3 Top 10 items of GO analysis

GO	Gene number	P value	Genes
GO: 0071222~cellular response to lipopolysaccharide	9	3.30E-05	<i>ZFP36, LCN2, ARG1, CAMP, PDE4B, CX3CR1, CD180, ADAM9, CXCL10</i>
GO: 0006915~apoptotic process	18	1.60E-04	<i>ITGB3BP, PTPN6, MZB1, S100A9, NFKBIA, GZMB, ZBTB16, PMAIP1, GZMH, STAT1, AIM2, LCN2, MAP1S, CD2, MFSD10, XAF1, PPP1R15A, C1D</i>
GO: 0006954~inflammatory response	14	2.69E-04	<i>AKT1, ITGAL, PTGER2, CCR1, HCK, S100A9, PTX3, PF4V1, TNIP1, AIM2, CD180, CXCL10, S100A12, BLNK</i>
GO: 0006955~immune response	14	7.32E-04	<i>IL1R2, CRIP1, CCR1, PGLYRP1, HLA-DMB, PF4V1, GZMH, AIM2, HLA-DQA1, CXCL10, CEACAM8, DPP8, IFI6, GBP2</i>
GO: 0045638~negative regulation of myeloid cell differentiation	4	1.08E-03	<i>ZFP36, NFKBIA, ITPKB, ZBTB16</i>
GO: 0031295~T cell costimulation	6	1.62E-03	<i>AKT1, PTPN6, PDPK1, CD247, CD24, HLA-DQA1</i>
GO: 0050832~defense response to fungus	4	3.07E-03	<i>DEFA4, S100A9, IL17RA, S100A12</i>
GO: 0019221~cytokine-mediated signaling pathway	7	3.13E-03	<i>CEBPA, IL1R2, IL2RB, FLT3, CCR1, HCK, IL17RA</i>
GO: 0009612~response to mechanical stimulus	5	3.90E-03	<i>BTG2, JUNB, STAT1, JUNB, CITED2</i>
GO: 0060337~type I interferon signaling pathway	5	5.21E-03	<i>EGR1, XAF1, STAT1, GBP2, IFI6</i>

表 4 KEGG 富集通路排序前 10 的条目
Table 4 Top 10 items of KEGG enrichment pathway

KEGG	Gene number	P value	Genes
hsa04380: osteoclast differentiation	8	2.54E-03	AKT1, LILRA5, JUND, NFKBIA, FCGR2A, STAT1, JUNB, BLNK
hsa05166: HTLV-I infection	11	3.17E-03	ZFP36, EGR1, AKT1, IL1R2, ITGAL, IL2RB, EGR2, NFKBIA, HLA-DMB, HLA-DQA1, CTNNB1
hsa05140: leishmaniasis	6	3.28E-03	PTPN6, NFKBIA, FCGR2A, HLA-DMB, STAT1, HLA-DQA1
hsa04062: chemokine signaling pathway	9	4.85E-03	AKT1, CCR1, HCK, CX3CR1, NFKBIA, FOXO3, STAT1, PF4V1, CXCL10
hsa05145: toxoplasmosis	6	2.00E-02	AKT1, PDPK1, NFKBIA, HLA-DMB, STAT1, HLA-DQA1
hsa05202: transcriptional misregulation in cancer	7	3.15E-02	CEBPA, IL1R2, IL2RB, FLT3, ELANE, GZMB, ZBTB16
hsa04640: hematopoietic cell lineage	5	3.51E-02	IL1R2, FLT3, CD2, CD1C, CD24
hsa05213: endometrial cancer	4	3.75E-02	AKT1, PDPK1, FOXO3, CTNNB1
hsa05152: tuberculosis	7	4.01E-02	AKT1, CAMP, CTSD, FCGR2A, HLA-DMB, STAT1, HLA-DQA1
hsa05150: staphylococcus aureus infection	4	4.12E-02	ITGAL, FCGR2A, HLA-DMB, HLA-DQA1

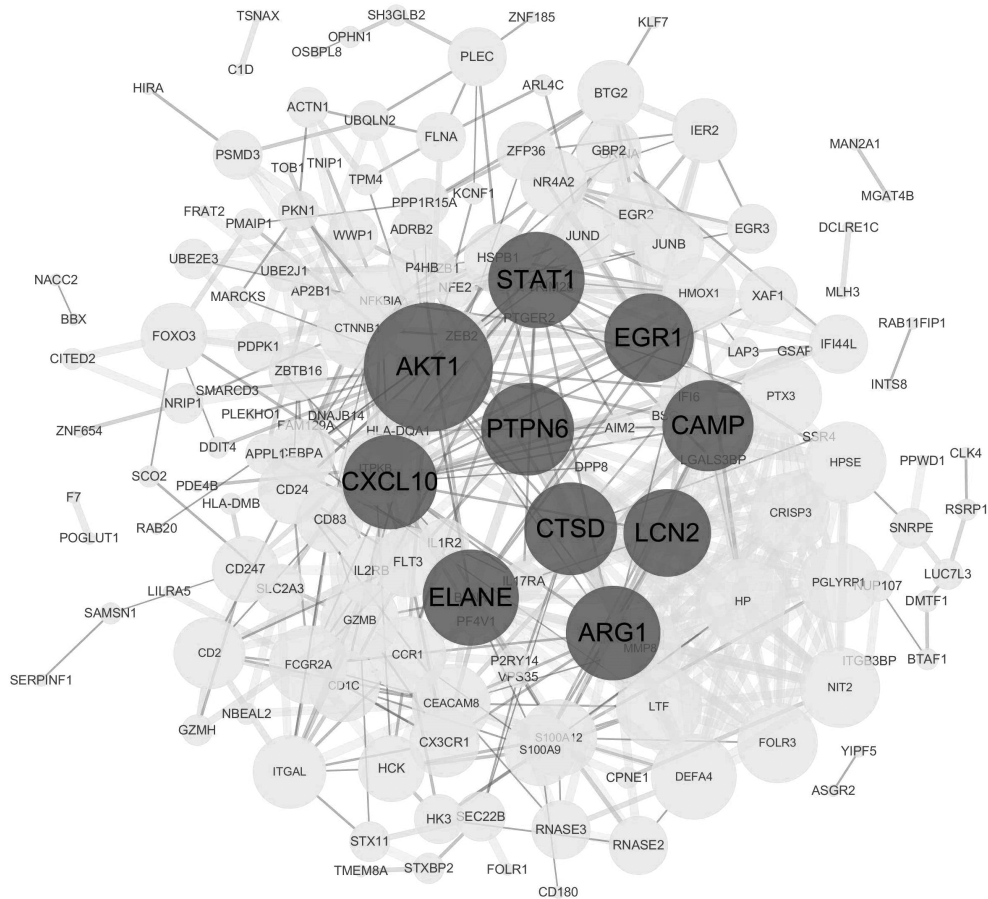


图 1 PPI 网络分析结果

节点越大, 代表度越大; 深色节点代表枢纽基因, 浅色节点代表其他基因。

Fig.1 PPI network analysis results

A larger node means a greater degree; the dark nodes are the hub genes, and the light nodes are the other genes.

究相对较少。因此, 需要进一步的研究来证实AKT1在人类骨质疏松症中的潜在作用。STAT1基因在骨代谢中扮演着重要的角色。研究发现在骨质疏松症的小鼠模型中, Stat1的表达显著上调^[23-24]。Kwak

等^[25]发现, RANKL可通过 p38 MAPK 通路促进 Stat1编码的蛋白质的磷酸化, 影响 PBMs 的迁移和黏附。小鼠研究发现, Cxcl10基因在 T 细胞和巨噬细胞向炎症关节浸润并导致骨破坏中起关键作

表 5 枢纽基因基本信息($n=10$)
Table 5 Basic information of the hub genes ($n=10$)

Gene	Degree	Full name	Chromosome location
<i>AKT1</i>	44	<i>RAC-alpha serine/threonine-protein kinase</i>	14q32.33
<i>ELANE</i>	25	<i>Neutrophil elastase</i>	19p13.3
<i>STAT1</i>	25	<i>Signal transducer and activator of transcription 1-alpha/beta</i>	2q32.2
<i>CXCL10</i>	24	<i>C-X-C motif chemokine 10</i>	4q21.1
<i>ARG1</i>	24	<i>Arginase-1</i>	6q23.2
<i>PTPN6</i>	23	<i>Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 6</i>	12p13.31
<i>CTSD</i>	23	<i>Cathepsin D</i>	11p15.5
<i>CAMP</i>	22	<i>Cathelicidin antimicrobial peptide</i>	3p21.31
<i>EGR1</i>	21	<i>Early growth response protein 1</i>	5q31.2
<i>LCN2</i>	20	<i>Neutrophil gelatinase-associated lipocalin</i>	9q34.11

用, 它能部分逆转 PRMT5 (protein arginine methyltransferase 5) 抑制剂对破骨细胞生成的抑制作用^[26]。Lee 等^[27]的研究发现 *CXCL10* 能促进破骨细胞的分化, 在成骨细胞和骨髓细胞的共培养中 *CXCL10* 以剂量依赖的方式诱导破骨细胞的形成。*Arg1* 基因在破骨细胞分化过程中下调, 可能通过调节一氧化氮的产生, 负性调节破骨细胞分化^[28]。*Ptpn6* (也叫作 *Shp-1*) 基因参与调节破骨细胞的存活, 抑制 *Ptpn6* 可上调破骨细胞存活的基础水平, 降低活性氧对破骨细胞存活的影响^[29]。Zhang 等^[30]的研究发现 *Ptpn6* 通过向含有 Traf6 (TNF receptor associated factor 6) 的复合物聚集来调节 RAN-KL 诱导的破骨细胞生成。Chodynicky 等^[31]的研究发现, *CTSD* 基因能激活破骨细胞并在胆脂瘤引起的骨组织破坏中起主要作用。*CAMP* 基因编码的蛋白质是一种抗菌肽, 具有多种生物学功能和促进成骨的潜力。有研究表明 *Camp* 通过 P2X7R (purinergic ligand-gated ion channel 7 receptor) 和 MAPK (mitogen-activated protein kinase) 信号途径抑制炎症及破骨细胞骨吸收功能^[32]。*EGR1* 基因的表达下降可导致前列腺癌病人的骨转移, 溶骨性骨损伤面积减少, 以及骨和肿瘤界面的破骨细胞数量减少^[33]。*LCN2* 基因可抑制破骨细胞的增殖和分化, 导致破骨细胞的形成受损。在骨髓源性巨噬细胞中, 如果 *Lcn2* 过表达或加入重组 *Lcn2* 蛋白, 会抑制多核破骨细胞的形成^[34]。

此外, 有 1 个枢纽基因 *ELANE* (*neutrophil elastase*), 目前并未有研究报道其参与骨质疏松症的发生发展。基于 79 个人类组织和细胞类型的芯片数据 (Geneal U133A, <http://biogps.org/>) 的研究结果显示, *ELANE* 基因在大体的骨髓组织中高表达^[35]。基于 96 个小鼠组织和细胞类型的芯片数据 (Geneal MOE430) 的研究结果显示, *Elane* 基因

同时在小鼠骨髓和骨中有高表达^[36]。这些研究结果提示, *ELANE* 基因很可能与骨质疏松症有潜在的联系, 对其可以进一步展开相关研究。

当然, 本研究也存在一些局限性。首先, 研究组织的样本来源不完全一致, 虽然 3 个研究的样本均来自外周血细胞, 但有 2 个为 PBMs, 1 个为 B 淋巴细胞; 其次, 数据集研究对象均为女性, 而且研究对象年龄跨度较大, 从 20 岁到 60 岁。此外, 本研究也仅进行了表达谱芯片数据的分析, 相关基因与骨质疏松症的确切关系还需要实验证据的支持。

4 结论

本研究通过对 3 个骨质疏松症相关表达谱芯片数据的 GWGS 整合分析, 检测到 10 个外周血细胞中与骨质疏松症相关的枢纽基因。其中 9 个基因已有研究报道与骨质疏松症相关, 另外 1 个基因 *ELANE* 和骨质疏松症的关系有待进一步探索。本研究结果将有助于进一步理解骨质疏松症的分子致病机理。

参考文献(References):

- [1] BULLAMORE J R, WILKINSON R, GALLAGHER J C, *et al.* Effect of age on calcium absorption[J]. *Lancet*, 1970, 2(7672): 535-537.
- [2] LEWIECKI E M, SILVERMAN S L. Redefining osteoporosis treatment: who to treat and how long to treat[J]. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, 2006, 50(4): 694-704.
- [3] CHEN P, LI Z, HU Y. Prevalence of osteoporosis in China: a meta-analysis and systematic review[J]. *BioMed Central Public Health*, 2016, 16: 1039.
- [4] CHENG X, YANG D, ZHOU Q, *et al.* Age-related bone mineral density, bone loss rate, prevalence of osteoporosis, and reference database of women at multiple centers in China[J]. *Journal of Clinical Densitometry*, 2007, 10(3): 276-284.

- [5] RECKER R R, DENG H. Role of genetics in osteoporosis[J]. *Endocrine*, 2002, 17(1): 55–66.
- [6] BOYCE B F, HUGHES D E, WRIGHT K R, *et al.* Recent advances in bone biology provide insight into pathogenesis of bone diseases[J]. *Laboratory Investigation*, 1999, 79(2): 83–94.
- [7] QUINN J M W, NEALE S, FUJIKAWA Y, *et al.* Human osteoclast formation from blood monocytes, peritoneal macrophages, and bone marrow cells[J]. *Calcified Tissue International*, 1998, 62(6): 527–531.
- [8] UDAGAWA N, TAKAHASHI N, AKATSU T, *et al.* Origin of osteoclasts: mature monocytes and macrophages are capable of differentiating into osteoclasts under a suitable microenvironment prepared by bone marrow-derived stromal cells[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 1990, 87(18): 7260–7264.
- [9] MANABE N, KAWAGUCHI H, CHIKUDA H, *et al.* Connection between B lymphocyte and osteoclast differentiation pathways[J]. *The Journal of Immunology*, 2001, 167(5): 2625–2631.
- [10] REPPE S, REFVEM H, GAUTVIK V T, *et al.* Eight genes are highly associated with BMD variation in postmenopausal Caucasian women[J]. *Bone*, 2010, 46(3): 604–612.
- [11] MA M, LUO S, ZHOU W, *et al.* Bioinformatics analysis of gene expression profiles in B cells of postmenopausal osteoporosis patients[J]. *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology*, 2017, 56(2): 165–170.
- [12] YAN B, LI J, ZHANG L. Identification of B cells participated in the mechanism of postmenopausal women osteoporosis using microarray analysis[J]. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 2015, 8(1): 1027–1034.
- [13] LIU W, PENG Y, TOBIN D J. A new 12-gene diagnostic biomarker signature of melanoma revealed by integrated microarray analysis[J]. *PeerJ*, 2013, 1: e49.
- [14] GAUTIER L, COPE L, BOLSTAD B M, *et al.* Affy-analysis of Affymetrix GeneChip data at the probe level[J]. *Bioinformatics*, 2004, 20(3): 307–315.
- [15] IRIZARRY R A, HOBBS B, COLLIN F, *et al.* Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data[J]. *Biostatistics*, 2003, 4(2): 249–264.
- [16] RITCHIE M E, PHIPSON B, WU D, *et al.* Limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies[J]. *Nucleic Acids Research*, 2015, 43(7): e47.
- [17] SZKLARCZYK D, GABLE A L, LYON D, *et al.* STRING v11: Protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets[J]. *Nucleic Acids Research*, 2019, 47(D1): D607–D613.
- [18] KOHL M, WIESE S, WARSCHIED B. Cytoscape: software for visualization and analysis of biological networks [M]//HAMACHER M, EISENACHER M, STEPHAN C. *Data Mining in Proteomics: From Standards to Applications*. Totowa: Humana Press, 2011: 291–303.
- [19] Prevention and management of osteoporosis[J]. *World Health Organ Technical Report Series*, 2003, 921: 1–164.
- [20] MUKHERJEE A, ROTWEIN P. Selective signaling by Akt1 controls osteoblast differentiation and osteoblast-mediated osteoclast development[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2012, 32(2): 490–500.
- [21] KAWAMURA N, KUGIMIYA F, OSHIMA Y, *et al.* Akt1 in osteoblasts and osteoclasts controls bone remodeling[J]. *PLoS One*, 2007, 2(10): e1058.
- [22] MUKHERJEE A, LARSON E A, KLEIN R F, *et al.* Distinct actions of Akt1 on skeletal architecture and function[J]. *PLoS One*, 2014, 9(3): e93040.
- [23] ORLIC I, BOROVECKI F, SIMIC P, *et al.* Gene expression profiling in bone tissue of osteoporotic mice[J]. *Arhiv Za Higijenu Rada I Toksikologiju*, 2007, 58(1): 3–11.
- [24] CHEN X D, XIAO P, LEI S F, *et al.* Gene expression profiling in monocytes and SNP association suggest the importance of the *STAT1* gene for osteoporosis in both Chinese and Caucasians[J]. *Journal of Bone and Mineral Research*, 2010, 25(2): 339–355.
- [25] KWAK H B, LEE S W, JIN H M, *et al.* Monokine induced by interferon-gamma is induced by receptor activator of nuclear factor kappa B ligand and is involved in osteoclast adhesion and migration[J]. *Blood*, 2005, 105(7): 2963–2969.
- [26] KWAK H B, HA H, KIM H N, *et al.* Reciprocal cross-talk between RANKL and interferon-gamma-inducible protein 10 is responsible for bone-erosive experimental arthritis[J]. *Arthritis and Rheumatism*, 2008, 58(5): 1332–1342.
- [27] LEE J H, KIM H N, KIM K O, *et al.* CXCL10 promotes osteolytic bone metastasis by enhancing cancer outgrowth and osteoclastogenesis[J]. *Cancer Research*, 2012, 72(13): 3175–3186.
- [28] YEON J T, CHOI S W, KIM S H. Arginase 1 is a negative regulator of osteoclast differentiation[J]. *Amino Acids*, 2016, 48(2): 559–565.
- [29] KE K, SUL O J, CHOI E K, *et al.* Reactive oxygen species induce the association of SHP-1 with c-Src and the oxidation of both to enhance osteoclast survival[J]. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 2014, 307(1): E61–E70.
- [30] ZHANG Z, JIMI E, BOTHWELL A L. Receptor activator of NF-kappa B ligand stimulates recruitment of SHP-1 to the complex containing TNFR-associated factor 6 that regulates osteoclastogenesis[J]. *The Journal of Immunology*, 2003, 171(7): 3620–3626.
- [31] CHODYNICKI S, CHYCZEWSKI L, OLSZEWSKA E. Immunohistochemical investigations of cathepsin D activity in the structures of cholesteatoma[J]. *Medical Science Monitor*, 2002, 8(5): R184–R186.
- [32] YU X, QUAN J, LONG W, *et al.* LL-37 inhibits LPS-induced inflammation and stimulates the osteogenic differentiation of BMSCs via P2X7 receptor and MAPK signaling pathway[J]. *Experimental Cell Research*, 2018, 372(2): 178–187.
- [33] LI L, AMERI A H, WANG S, *et al.* EGR1 regulates angiogenic and osteoclastogenic factors in prostate cancer and promotes metastasis[J]. *Oncogene*, 2019, 38(35): 6241–6255.
- [34] KIM H J, YOON H J, YOON K A, *et al.* Lipocalin-2 inhibits osteoclast formation by suppressing the proliferation and differentiation of osteoclast lineage cells[J]. *Experimental Cell Research*, 2015, 334(2): 301–309.
- [35] SU A I, WILTSHIRE T, BATALOV S, *et al.* A gene atlas of the mouse and human protein-encoding transcriptomes[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 2004, 101(16): 6062–6067.
- [36] LATTIN J E, SCHRODER K, SU A I, *et al.* Expression analysis of G protein-coupled receptors in mouse macrophages[J]. *Immunome Research*, 2008, 4: 5.