

绝经后骨质疏松症肾阴虚证关联基因 CLCF1 mRNA 的表达研究

陈娟 谢丽华 李生强 许惠娟 赖玉链 葛继荣*

福建省中医药研究院骨质疏松证候基因组学重点实验室,福州 350003

中图分类号: R681 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2014) 06-0618-05

摘要: **目的** 研究绝经后骨质疏松症肾阴虚证差异表达基因 CLCF1、ASB1 和 PROK2 的 mRNA 表达水平。**方法** 随机选择绝经后骨质疏松症患者,中医辨证肾阴虚证组 30 例,27 例健康绝经后妇女为对照组,RT-PCR 法检测外周血 CLCF1、ASB1 和 PROK2 mRNA 的表达。**结果** 肾阴虚组 CLCF1 mRNA 表达水平明显低于对照组 ($Z = -2.621, P = 0.009$);肾阴虚组 ASB1 mRNA 表达与对照组比较,有降低趋势,但差异无统计学意义;与健康对照组比较,肾阴虚组 PROK mRNA 表达差异无统计学意义。**结论** 骨质疏松症肾阴虚证与 CLCF1 mRNA 表达下调关联。

关键词: 肾阴虚证;绝经后骨质疏松症;CLCF1;基因表达

Study of the expression of CLCF1 mRNA in postmenopausal osteoporosis patients with the kidney Yin deficiency

CHEN Juan, XIE Lihua, LI Shengqiang, XU Huijuan, LAI Yulian, GE Jirong

Key Research Laboratory of Osteoporosis Syndrome Genomics, Fujian Institute of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350003, China

Corresponding author: GE Jirong, Email: gjrrjgcy@sohu.com

Abstract: Objective To investigate the mRNA expression of CLCF1, ASB1, and PROK2 in postmenopausal osteoporosis patients with the kidney Yin deficiency. **Methods** Patients with postmenopausal osteoporosis were randomly selected. Thirty patients were selected as the kidney Yin deficiency syndrome group, and another 27 patients with normal bone mineral density (BMD) were selected as control group. The mRNA expression of CLCF1, ASB1, and PROK2 in the peripheral blood was detected using real-time RT-PCR. **Results** The expression of CLCF1 mRNA in the kidney Yin deficiency group was significantly lower than that in the control group ($Z = -2.621, P = 0.009$). Compared with that in the control group, the expression of ASB1 mRNA in the kidney Yin deficiency group showed a declining tendency, but no significant difference was observed. Compared with that in control group, no significant difference of PROK mRNA expression in the kidney Yin deficiency group was observed. **Conclusion**

Down-regulation of CLCF1 mRNA expression may have correlation with the postmenopausal osteoporosis with the kidney Yin deficiency.

Key words: Kidney Yin deficiency; Postmenopausal osteoporosis; Cardiotrophin-like cytokine factor 1 (CLCF1); Gene expression

绝经后骨质疏松症 (postmenopausal osteoporosis, POP) 是中老年妇女的一种常见病。中医学认为 POP 的主要病因是肾虚,肾藏精,主骨生

髓,肾精虚少,不能营养骨骼而发生骨质疏松。临床肾虚常见肾阴虚和肾阳虚,POP 以肾阴虚为主^[1, 2]。作者所在课题组前期从 POP 入手,用人全基因组表达谱芯片检测 POP 肾阴虚组、POP 肾阳虚组、POP 非肾虚组和健康对照组的表达谱,骨质疏松症肾阴虚证组分别与其他 3 组比较,有 9 条共同的差异表达基因,其中心肌营养蛋白样细胞因子 1 (Cardiotrophin-like cytokine factor 1, CLCF1)、含锚蛋

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81173280); 福建省卫生厅医学创新课题 (2011-CX-30); 福建省教育厅科技项目 (JA11133); 福建省科技厅省属公益类科研院所自主选题项目 (2013fjzyyk-4)。

* 通讯作者: 葛继荣, Email: gjrrjgcy@sohu.com

白重复和 SOCS 框 1(Ankyrin repeat and SOCS box-containing 1, ASB1) 和前动力蛋白 2(Prokineticin 2, PROK2) 在 POP 肾阴虚组与健康对照组比较表达明显下调。因此,本课题采用荧光定量 PCR 技术检测 POP 肾阴虚证患者 CLCF1、ASB1 和 PROK2 mRNA 表达水平,旨在论证 POP 肾阴虚证与这 3 个基因之间的关系,并为后续深入研究肾阴虚证的分子实质奠定基础。

1 材料和方法

1.1 研究对象

采用病例对照研究。2009 年 1 月至 2012 年 12 月,从福州地区常住、汉族绝经后妇女中随机选择 POP 受试者,问卷方式调查受试者生活方式和健康状况等情况,血常规、尿常规、肝胆胰腺肾 B 超和心电图检查排除严重疾病者,肝、肾功能检测正常。用双能 X 线骨密度仪检测正位腰椎(L₂₋₄)和左侧股骨颈、大转子和 Ward 区骨密度。中医辨证:POP 肾阴虚证。肾阴虚证组 30 例,平均年龄为(62.78 ± 6.12)岁;健康绝经后妇女对照组 27 例,平均年龄为(60.83 ± 4.76)岁。两组间年龄、绝经年龄和体质量指数(Body Mass Index, BMI)等比较差异无统计学意义,具有可比性。

纳入标准:①西医诊断标准参照《中国人骨质疏松症建议诊断标准(第二稿)》^[3]。②中医证候诊断标准参照《中医虚证辨证参考标准》^[4]。③自然绝经 2 年以上的汉族妇女。④受试者知情同意。本研究方案获得福建省中医药研究院中医药临床伦理委员会审批通过。

排除标准 ①不符合西医诊断及中医辨证标准者。②类风湿性关节炎、糖尿病、甲状腺功能亢进等继发性骨质疏松症者。③合并有心脑血管严重疾病

者。④肝、肾功能检查异常者。⑤最近 1 个月用过中药治疗骨质疏松症者,近 3 个月内用激素替代治疗、使用降钙素者,近 6 个月内有连续 15d 用双膦酸盐等防治骨质疏松症者。

1.2 试剂与仪器

人外周血淋巴细胞分离液(Solarbio 公司); Trizol 试剂(Invitrogen 公司); PrimeScript 逆转录试剂盒(Fermentas 公司);引物(生工生物工程有限公司);SYBR[®] Premix Ex Taq[™] GC Kit(TaKaRa 公司); PCR 仪(ABI 7500 Fast); 核酸检测仪(Agilent 2100); 双能 X 线骨密度仪(法国 MEDILINK OSTEOCORE,精度: <1%)。

1.3 RNA 的提取和质量检测

真空采血管取外周血,淋巴细胞分离液分离白细胞。用 Trizol 一步法提取细胞中的总 RNA,通过分光光度计读取 260 nm 和 280 nm 处的吸光度值(A),测定 RNA 溶液的纯度。1% 甲醛变性琼脂糖凝胶电泳,紫外透射光下观察,检测 RNA 的完整性。

1.4 实时荧光定量 PCR

每个样本分别取 1 μg 总 RNA 进行逆转录,所得 cDNA 于 -80 ℃ 保存。引物序列见表 1,荧光定量 PCR 反应体系均如下:SYBR[®] Premix Ex Taq[™] GC 12.5 μL,上下游引物各 0.5 μL, dH₂O 9.5 μL, cDNA 2 μL, 25 μL 体系。反应条件如下:①预变性:95 ℃ 10s,②变性:95 ℃ 5 s,③退火、延伸:60 ℃ 31s, 40 个循环。采用 ABI 7500 Real time PCR 仪检测各样本中 mRNA 的表达情况。以 GAPDH 作为内参照,每组均做 3 个重复,取均数。本实验采用双标准曲线相对定量方法对基因进行定量分析。每个样品靶基因的相对 mRNA 表达水平用以下公式计算:相对 mRNA 表达 = 靶基因表达量/内参表达量。

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequences

基因 Gene Symbol	序列号 Gene Bank Accession	引物序列 Primer Sequence	引物长度(bp) Primer Length
CLCF1	NM 013246	上游: 5'-TTG GAG GTG CCC TAT AAA CCA GAA -3' 下游: 5'-GTT TGC CAC TCT GTG CTT TGG A -3'	100
ASB1	NM001040445	上游: 5'-ATG ATG ATA CGG AAG TTG GAG C -3' 下游: 5'-TCA GTA GAG CAG ACG CAG AGC -3'	268
PROK	NM001126128	上游: 5'-CCC TTC CTA AAC CTG TCA CTC A -3' 下游: 5'-ATT TGG CTT TCC ATT CCT TCT -3'	81
GAPDH	NM 00256799	上游: 5'-GGG AAA CTG TGG CGT GAT -3' 下游: 5'-GAG TGG GTG TCG CTG TTG A -3'	299

1.5 统计学处理

采用 SPSS 17.0 软件进行数据分析,计量资料采用 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 描述,基础资料组间比较采用 t 检验,基因 mRNA 表达比较经正态性检验,非正态分布用 Wilcoxon 检验,双侧检验, $P < 0.05$ 表示有统计学意义。

2 结果

2.1 研究对象基础资料的比较

POP 肾阴虚证组与健康对照组受试者的年龄、初潮年龄、怀孕次数、绝经年龄、BMI 比较,经 t 检验,组间比较均无统计学意义, $P > 0.05$,说明两组间具有可比性。见表 2。

表 2 研究对象基础资料的比较($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of the general date between two groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	N	年龄(岁)	初潮年龄(岁)	怀孕次数(次)	绝经年龄(岁)	BMI(kg/m ²)
Group	N	Age	Menarche	Pregnancies	Menopause	BMI(kg/m ²)
健康对照组	27	60.83 ± 4.76	15.43 ± 1.76	2.43 ± 1.43	49.93 ± 3.75	24.96 ± 4.20
POP 肾阴虚证组	30	62.78 ± 6.12	15.09 ± 1.73	2.31 ± 1.38	49.16 ± 3.57	24.02 ± 2.32

2.2 CLCF1 mRNA、ASB1 mRNA 和 PROK mRNA 表达情况

基因扩增曲线结果显示,CLCF1 mRNA、ASB1

mRNA 和 PROK mRNA 表现出稳定扩增状态(图 1);图 2 融解曲线单一峰无非特异性荧光,说明产物特异性强,无引物二聚体。

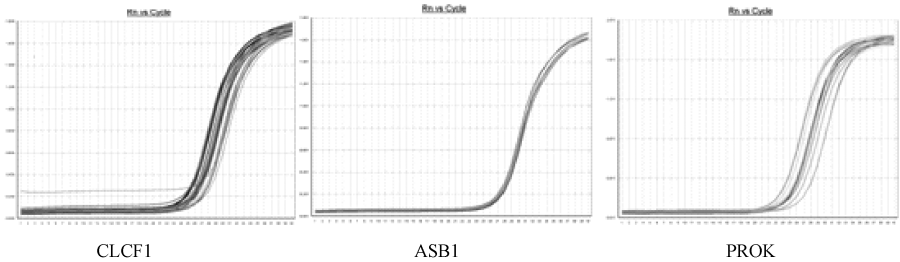


图 1 扩增曲线

Fig. 1 The amplification curve

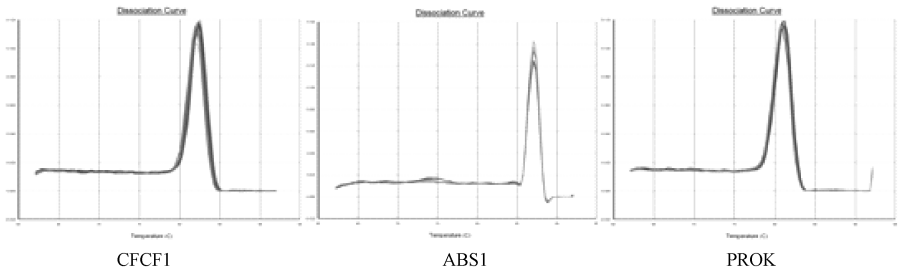


图 2 溶解曲线

Fig. 2 The melt curve

定量 PCR 结果(表 3)可以看出:与健康对照组比较,POP 肾阴虚组 CLCF1 mRNA 表达水平明显低于健康对照组(Wilcoxon 检验, $Z = -2.621, P = 0.009$),统计学有非常显著性差异。

由表 4 定量 PCR 结果可以看出:POP 肾阴虚组 ASB1 mRNA 表达与对照组比较,有降低趋势,但差异无统计学意义;与健康对照组比较,POP 肾阴虚组

PROK mRNA 表达差异无统计学意义。

表 3 两组 CLCF1 mRNA 的表达($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Expression of CLCF1 mRNA in two groups ($\bar{x} \pm s$)

Group	Cases	CLCF1 mRNA
健康对照组	27	0.026 ± 0.017 [△]
POP 肾阴虚证组	30	0.017 ± 0.011 ^{△**}

注:“ Δ ”表示经 Shapiro-Wilk 检验正态性, $P < 0.001$ 。“**”表示与健康对照组比较,经 Wilcoxon 检验, $P < 0.01$

表 4 两组 ASB1 和 PROK mRNA 的表达($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Expression of ASB1 and PROK mRNA in two groups ($\bar{x} \pm s$)			
Group	N	ASB1 mRNA	PROK mRNA
健康对照组	24	0.103 $\pm$ 0.240 $^{\Delta}$	0.013 $\pm$ 0.010 $^{\Delta}$
POP 肾阴虚证组	30	0.025 $\pm$ 0.024 $^{\Delta}$	0.014 $\pm$ 0.010 $^{\Delta}$

注:“ $^{\Delta}$ ”表示经 Shapiro-Wilk 检验正态性, $P < 0.001$

3 讨论

长期以来,证候的实质问题一直困扰着中医学科界。近年来,基因组学飞速发展,为中医证候研究开辟了新途径,已经为数不少的学者采用基因组学来研究证候实质,取得很大进展^[5, 6]。作者所在课题组利用基因芯片技术筛选出了 POP 肾阴虚证差异表达基因:ASB1、CLCF1 和 PROK2 基因^[7]。本实验以 POP 肾阴虚证者为对象,对照健康绝经后妇女,用 RT-PCR 技术验证前期课题组筛选出的 POP 肾阴虚证差异表达基因。实验结果表明:与健康对照组比较,POP 肾阴虚组 CLCF1 mRNA 表达水平显著下调($P = 0.009$),与基因芯片结果相一致;而 POP 肾阴虚组 ASB1 和 PROK mRNA 变化趋势不明显。

证候是人体生理病理反应状态的概括,是人体阴阳失衡状态的具体概括,体现着从分子、细胞到组织、器官、系统水平的综合动态变化。目前系统生物学法成为中医证候的主要方法,它系统地、全面地研究证候产生的分子生物学基础,即在基因组、基因转录组、蛋白质组表达、代谢产物组水平的变化规律,进而揭示“证”的内涵^[8]。李俊丽等^[9]采用蛋白质组学技术探讨左归饮与肾阴虚证方证相应的机理,找出左归饮调节纠正的蛋白质点 21 个,质谱鉴定出 18 种蛋白质。孙志岭^[10]对 14 个湿热痹阻证共同的差异蛋白点,应用质谱进行鉴定,得到 9 个湿热痹阻证差异蛋白。李生强等^[11]检测原发性骨质疏松症肾阴虚证骨组织的基因表达谱,发现原发性骨质疏松症肾阴虚证的相关基因主要与免疫调节激素合成、组氨酸代谢、矿物质吸收等信号通路相关。上述研究结果说明,运用系统生物学来研究中医证候是科学的。

前期课题组利用基因芯片技术筛选出了 POP 肾阴虚证差异表达基因:ASB1、CLCF1 和 PROK2 基因。ASB1 是含锚蛋白重复和 SOCS 框 1 基因,其编码的蛋白含有细胞因子信号抑制(Suppressor of cytokine signaling, SOCS)蛋白结构域和锚蛋白重

复序列。锚蛋白的主要作用是连接整合膜蛋白到细胞骨架蛋白,在多种细胞功能活动中起关键作用,参与机体生长、发育、细胞内蛋白转运和细胞极性的建立等^[12, 13]。PROK2 为前动力蛋白 2 基因,通过其连接的各种 G 蛋白,导致细胞内钙动员及磷酸肌醇水解,并激活 MAPK 和蛋白激酶 B 途径^[14]。因此,PROK2 基因在 G 蛋白偶联受体蛋白信号转导通路、磷代谢过程中起着重要调控作用^[15]。本实验中我们发现,POP 肾阴虚组 ASB1 和 PROK mRNA 变化趋势,和前期基因芯片结果不一致。分析其原因,与基因芯片技术本身的局限有关。该技术从前期设计到最后的数据处理分析,目前都还存在着一些技术难点和缺点,容易产生假阳性和假阴性问题,存在一定的局限性^[16, 17]。因此芯片验证性实验(RT-PCR、荧光定量 RT-PCR、Northern)才是确定基因差异表达的金标准。

CLCF1 为心肌营养蛋白样细胞因子 1,分布于胞外区,属于细胞因子或生长因子。CLCF1 基因是一种神经营养因子和 B 细胞刺激剂,与神经内分泌免疫调节密切相关^[18, 19]。CLCF1 属白细胞介素 6 细胞因子家族成员,白细胞介素 6(IL-6)是一种生物活性多肽物质,是骨吸收的主要调节者^[20]。IL-6 异常表达可促进骨吸收增强而导致骨质疏松^[21, 22]。有研究^[23]报道 IL-6 水平升高是肾虚的免疫病理基础之一。

同时,CLCF1 参与 JAK-STAT 及下游 CBP 信号转导通路调控^[24]。JAK-STAT 信号通路,与细胞增殖、分化、凋亡以及免疫调节密切相关,其调控的信号通路细微的变化都会导致细胞因子变化和病理改变。有研究结果表明^[25]JAK/STAT 信号通路对骨质疏松症发生有重要影响。CBP 是一种对钙离子有高度亲和性的蛋白,主要功能是参与钙的运载,与钙代谢关系密切。该蛋白在十二指肠黏膜细胞中含量最多,可结合肠腔中的钙,促进钙吸收。任路等^[26]报道纳米钙补肾中药能调控大鼠肠黏膜钙结合蛋白 CaBP-D9K mRNA 和蛋白表达,促进肠钙的吸收,对于骨质疏松症有一定的防治作用。

综上所述,本实验结果证明:CLCF1 基因在 POP 肾阴虚证中表达下调趋势显著,CLCF1 基因是 POP 肾阴虚证的关联基因。结合 CLCF1 基因的功能分析,作者推测:POP 肾阴虚证的分子调控机制可能与 CLCF1 介导 JAK-STAT 信号通路相关。为了阐明这一观点的科学性,作者将从病证结合和方证结合的角度,深入研究 CLCF1 介导 JAK-STAT 信号通路参

与 POP 肾阴虚证的调控机制。

【参 考 文 献】

- [1] Jir G, Ke C, Heming W. Study on syndrome differentiation type of TCM in primary osteoporosis[J]. Journal of Fujian College TCM, 2005(01):9-11.
- [2] Yongfang Z, Ge Z, Wanzhong S. TCM syndromes-differentiation typing of osteoporosis;a primary clinical report[J]. The Journal of Traditional Chinese Orthopedics and Traumatology, 1998(05):10-11.
- [3] Group T C S O. Chinese osteoporosis recommended diagnostic criteria (second draft) [J]. Chinese Journal of Osteoporosis, 2000(01):4-6.
- [4] ZY S, WJ W. Deficiency syndrome differentiation of TCM reference standards [J]. Clinical Focus, 1987(04):189.
- [5] Qing-hu H, Xing Z. Study on genomics researches of TCM Syndromes through the difference and commonality between Chinese Medicine and Western Medicine [J]. Journal of TCM Univ of Hunan, 2012(03):3-5.
- [6] Chenxia H, Hongji W. The Exploration on Syndrome of Traditional Chinese Medicine[J]. Chinese Archives of Traditional Chinese Medicine, 2007(05):1003-1005.
- [7] Li-hua X, Yi-peng Z, Ke C, et al. Bioinformatics analysis of genes expression profiles of postmenopausal osteoporosis with Kidney Yindeficiency [J]. Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research, 2011(15):2833-2837.
- [8] Gui Y, Jie W. Research on the regulating networks of miRNA and the 'causal treatment' of TCM [J]. China Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy, 2012(11):2789-2791.
- [9] Jun-di L, Yun L, Ming-fu L, et al. Proteome Studies on Mechanisms of Zuoqiyin and Kidney-Yin Deficiency on Fang-Zheng correspondence [J]. Chinese Journal of Basic Medicine in Traditional Chinese Medicine, 2010(03):203-205.
- [10] Zhi-ling S, Ling W, Fu-qiang W. Differential serum proteomic analysis of rheumatoid arthritis patients with damp-heat arthralgia spasm syndrome [J]. Lishizhen Medicine and Materia Medica Research, 2013(01):231-233.
- [11] Shengqiang L, Eryou F, Yiyuan Z. Study on the gene expression profile in bone tissue of kidney-yin deficiency syndrome of primary osteoporosis [J]. Chin J Osteoporosis, 2013, 19:1-5.
- [12] Kile B T, Schulman B A, Alexander W S, et al. The SOCS box; a tale of destruction and degradation [J]. Trends Biochem Sci, 2002, 27(5):235-241.
- [13] Lafferty M K, Fantry L, Bryant J, et al. Elevated Suppressor of Cytokine Signaling-1 (SOCS-1): A Mechanism for Dysregulated Osteoclastogenesis in HIV Transgenic Rats [J]. Pathog Dis, 2013.
- [14] Yuill E A, Hoyda T D, Ferri C C, et al. Prokineticin 2 depolarizes paraventricular nucleus magnocellular and parvocellular neurons [J]. Eur J Neurosci, 2007, 25(2):425-434.
- [15] Zhou W, Li J D, Hu W P, et al. Prokineticin 2 is involved in the thermoregulation and energy expenditure [J]. Regul Pept, 2012, 179(1-3):84-90.
- [16] Gao L, Cao G. Gene chip reliability analysis and data processing [J]. Journal of Third Military Medical University, 2006(01):80-82.
- [17] Bin W, Ziyi S. The data analysis of gene expression profile chip [J]. World Chinese Journal of Digestology, 2006(01):68-74.
- [18] Rousseau F, Chevalier S, Guillet C, et al. Ciliary neurotrophic factor, cardiotrophin-like cytokine, and neurepoietin share a conserved binding site on the ciliary neurotrophic factor receptor alpha chain [J]. J Biol Chem, 2008, 283(44):30341-30350.
- [19] Tormo AJ, Letellier MC, Lissilaa R, et al. The cytokines cardiotrophin-like cytokine/cytokine-like factor-1 (CLC/CLF) and ciliary neurotrophic factor (CNTF) differ in their receptor specificities [J]. Cytokine, 2012, 60(3):653-660.
- [20] Kaneshiro S, Ebina K, Shi K, et al. IL-6 negatively regulates osteoblast differentiation through the SHP2/MEK2 and SHP2/Akt2 pathways in vitro [J]. J Bone Miner Metab, 2013.
- [21] Del F A, Cappariello A, Capulli M, et al. An experimental therapy to improve skeletal growth and prevent bone loss in a mouse model overexpressing IL-6 [J]. Osteoporos Int, 2013.
- [22] Mendez JP, Rojano-Mejia D, Coral-Vazquez RM, et al. Impact of genetic variants of IL-6, IL6R, LRP5, ESR1 and SP7 genes on bone mineral density in postmenopausal Mexican-Mestizo women with obesity [J]. Gene, 2013, 528(2):216-220.
- [23] Xiao-hong D, Jing-cheng D, Qun H L. Effects of Bushen Huoxue Recipe on Urinary Levels of Albumin, IL-6, TGF- β 1 and MCP-1 in Chronic Nephritis Patients of Shen-deficiency Blood-stasis Syndrome [J]. Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medicine, 2011(06):765-768.
- [24] Tsai C T, Ikematsu K, Sakai S, et al. Expression of Bcl2l1, Clec1, IL-28ra and Pias1 in the mouse heart after single and repeated administration of chlorpromazine [J]. Leg Med (Tokyo), 2011, 13(5):221-225.
- [25] Sun G J, Guo T, Chen Y, et al. Significant pathways detection in osteoporosis based on the bibliometric network [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2013, 17(1):1-7.
- [26] Lu R, Hong-xin Z, Shu-ru L. Effect of nanometer calcium combined with tonifying kidney herbs the expression of CaBP-D 9K mRNA and protein in the intestinal mucosa of osteoporosis rats due to kidney deficiency [J]. Chinese journal of information on TCM, 2006(08):30-32.

(收稿日期:2014-01-15,修回日期:2014-02-13)

绝经后骨质疏松症肾阴虚证关联基因 CLCF1 mRNA 的表达研究



作者：[陈娟](#)，[谢丽华](#)，[李生强](#)，[许惠娟](#)，[赖玉链](#)，[葛继荣](#)，[CHEN Juan](#)，[XIE Lihua](#)，[LI Shengqiang](#)，[XU Huijuan](#)，[LAI Yulian](#)，[GE Jirong](#)

作者单位：[福建省中医药研究院骨质疏松证候基因组学重点研究室, 福州, 350003](#)

刊名：[中国骨质疏松杂志](#) 

英文刊名：[Chinese Journal of Osteoporosis](#)

年，卷(期)：2014(6)

本文链接：http://d.wanfangdata.com.cn/Periodical_zggzsszz201406007.aspx