

· 论著 ·

基于人类全基因表达谱技术对“肾精亏虚证”原发性骨质疏松患者差异基因表达分析

辛华 谢晚晴 蒋宁 孙丽 郑洪新*

辽宁中医药大学, 辽宁 沈阳 110032

中图分类号: R229 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2018) 09-1180-06

摘要: **目的** 基于人类全基因表达谱芯片高通量测序技术,检测肾精亏虚证骨质疏松患者和同龄健康状态老年人血液中的差异基因表达,探讨肾精亏虚证骨质疏松症的发病机制,为中医药防治该病证提供可能的作用靶点。**方法** 从辽宁中医药大学附属医院和上海中医药大学附属龙华医院门诊肾精亏虚证原发性骨质疏松症患者群中随机选择 16 例患者,男女各半,年龄 60 岁以上,作为 OP 组(OP group);同龄健康状态老年人 24 例,男女各半,年龄 60 岁以上,作为对照组。采用人类全基因表达谱芯片检测两组人群的差异基因表达,并对差异显著的基因表达进行荧光定量 PCR 验证。**结果** 在肾精亏虚证 OP 患者中共有 602 个基因呈现差异性表达,其中上调基因 579 个,下调基因 23 个($FC \geq 1.5$ 或 $FC \leq 0.667$, $q\text{-value} \leq 5\%$)。表达上调超过 3 倍的基因有 7 个,分别为 S100P、SNX3、DEFA1、MMP9、ANXA3、IL1R2、PLSCR1;表达下调超过 2 倍的基因有 3 个,分别为 CX3CR1、SPON2、GNLY。对以上 10 个差异显著的基因进行 RT-PCR 验证,结果与基因芯片检测结果一致。**结论** 肾精亏虚证 OP 患者与同龄健康老年人比较,差异基因表达上调或下调显著,这些基因通过调控免疫应答、防御应答、趋化因子信号转导通路等方面在肾精亏虚证 OP 的发病过程中可能发挥着重要的作用。

关键词: 肾精亏虚;骨质疏松;高通量;差异基因

Gene expression analysis in patients with primary osteoporosis due to kidney-essence deficiency based on human genome expression array

XIN Hua, XIE Wanqing, JIANG Ning, SUN Li, ZHENG Hongxin*

Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110032, China

* Corresponding author: ZHENG Hongxin, Email: zhenghx2002@126.com

Abstract: **Objective** To examine the gene expression profile in the blood of patients with osteoporosis and kidney-essence deficiency (OP-KED) based on high-through human genome expression array, and to explore the mechanism of OP-KED and possible treatment target. **Methods** Sixteen OP-KED patients (8 males and 8 females) aged over 60 years old, and 24 healthy people (12 males and 12 females) of same age were recruited from the First Affiliated Hospital of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine and Longhua Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine. Differential gene expression was examined using the Human Gene Expression Array chip. Real-time PCR was used to validate the expression of differentially expressed genes. **Results** Six hundred and two genes were differentially expressed in OP-KED patients. Among those, 579 genes were up regulated and 23 genes were down regulated ($FC \geq 1.5$ or $FC \leq 0.667$, $q\text{ value} \leq 5\%$). Seven genes, including S100P, SNX3, DEFA1, MMP9, ANXA3, IL1R2, and PLSCR1, were up regulated over 3 times. Three genes, including CX3CR1, SPON2, and GNLY, were down regulated more than 2 times. The expression patterns of the above 10 genes were confirmed by real-time PCR. **Conclusion** Comparing with that in the healthy elder people of same age, the gene expression pattern in OP-KED patients is different significantly. These genes play important role in the development of OP-KED by regulation of immune response, defense response, and signal transduction of many intracellular proteins.

Key words: kidney-essence deficiency; osteoporosis; high-through put; differential gene

基金项目: 国家自然科学基金(81273612); 国家 973 计划(2010CB530401)

* 通信作者: 郑洪新, Email: zhenghx2002@126.com

原发性骨质疏松症(Osteoporosis, 简称 OP), 是指低骨量和骨组织微细结构破坏, 以骨的脆性增加和易发骨折为主要特征的全身性、代谢性骨骼疾

病^[1]。OP 主要包括绝经后骨质疏松症、老年性或退行性骨质疏松症,主要临床表现为全身骨痛,其中腰背部疼痛是最常见症状,以及身长缩短、驼背、骨折等,有时可无明显症状。随着我国人均寿命的延长和人口老龄化的加重,其发病率呈明显上升趋势,已成为老年人的常见病和多发病^[2]。现代病因学认为,OP 与激素调控、营养状态、物理因素、免疫状况及遗传等因素有关。

中医学典籍中无“骨质疏松”这一病名,根据病因病机和临床表现可将其归于“骨枯”“骨极”“骨痿”“骨痹”和“骨蚀”等范畴,其中定性定位较准确的当属“骨痿”^[3]。中医学认为,肾藏精,主骨生髓,肾精充足,则骨髓的生化有源,骨骼才能得到骨髓的充分滋养而坚固有力;若肾精亏虚,骨髓化源不足,不能濡养骨骼,便会出现骨骼脆弱乏力,引发骨质疏松。OP 病位虽在骨,但与肾密切相关。肾为先天之本,藏先后天之精气,寓元阴元阳。人之生长壮老取决于肾中精气之盛衰变化,而骨骼功能正常亦有赖于肾精充盈、骨髓生化有源,因此,随年龄增长人体步入衰老阶段,肾精不足,OP 发病率显著增高。可见,肾精亏虚,髓少骨枯骨痿是本病的基本病机。国内已有大量临床研究表明,通过补肾法为主治疗 OP 获得明显疗效。

本研究采用人类全基因组表达谱芯片检测肾精亏虚证 OP 患者基因表达谱,对比 OP 患者和同龄健康人组,筛查与 OP 相关的差异表达基因,探讨“肾精亏虚”衰老病机的 OP 患者相关基因的信息学特征,进一步为临床“从肾论治”OP 提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 研究对象

原发性骨质疏松组(OP group):从辽宁中医药大学附属医院和上海中医药大学附属龙华医院门诊肾精亏虚证原发性骨质疏松症患者群中随机选择 16 例患者,男女各半,年龄 60 岁以上。

纳入标准:①符合 OP 的诊断标准:参照中华医学会骨质疏松和骨矿盐疾病《原发性骨质疏松症诊治指南 2011》。②符合肾精亏虚证诊断标准:参照国家标准《中医临床诊疗术语》肾系证类肾精(气)亏虚证的诊断标准。③年龄在 60-75 岁之间。④签署知情同意书者。

排除标准:①不符合纳入标准者。②同时患有其他疾病或合并症,以及其它证候。③某些特征人

群,如精神病患者、病情危笃或疾病的晚期患者。④患有心、肝、肾损害等器质性疾病。

对照组(control group):辽宁中医药大学附属医院体检中心随机选择健康状态(躯体、心理及社会生活无异常,不吸烟,不饮酒,无饮食偏嗜)老年人 24 例,男女各半,年龄 60 岁以上。

1.2 实验材料

PrimeView™ Human Gene Expression Array, Affymetrix 公司生产;cRNA 扩增标记试剂盒, Ambion 生产, LOT NO: #1792; First Stand cDNA Synthesis Kit, BioLabs 公司生产, LOT NO: E6560S; SYBR Green PCR Kit, QIAGEN 生产, LOT NO: 204143。

1.3 样本采集

收集符合上述标准的 OP 组和对照组人群,清晨经肘前静脉采集 5 mL 血液,加入血液总 RNA 快速提取试剂(百泰克生产),混合均匀,-70℃保存。干冰冷冻,统一寄送北京博奥生物有限公司。

1.4 指标检测

1.4.1 基因芯片检测及生物信息学分析:利用 Affymetrix 公司的 PrimeView™ Human Gene Expression Array 基因表达谱芯片,分析两组基因差异表达。提取总 RNA,并对总 RNA 进行定量、质检。以总 RNA 为起始,进行体外扩增和生物素标记,然后用于芯片杂交;使用 AGCC 软件进行芯片清洗和染色,然后扫描芯片;使用 AGCC 软件对芯片图像进行分析,把图像信号转化为数字信号,然后对数据进行校正和归一化处理(数据预处理采用 RMA 算法^[4]进行)。对预处理后的数据进行基因差异表达分析:利用 SAM (significance analysis of microarray) R 程序包^[5]分析差异基因,差异基因的筛选标准是:q-value ≤ 5%,且 Fold Change ≥ 1.5 或 ≤ 0.5。对筛选到的差异表达基因进一步进行 Gene Ontology (GO)功能富集分析和 Pathway 分析。

1.4.2 差异基因表达的验证:Realtime-PCR 检测差异表达基因 mRNA 表达:利用 Primer Premier 5.0 软件设计 PCR 引物,引物由上海生工公司合成。

从 OP 组及对照组分别随机选取 10 例血液,提取总 RNA,进行 RT-PCR 检测。逆转录按照 BioLabs 公司 First Stand cDNA Synthesis Kit (E6560S)说明书操作,荧光定量按照 QIAGEN 的 SYBR Green PCR Kit (204143)说明书操作。PCR 反应所用引物序列见表 1,以 GAPDH 作为内参。

表 1 实时荧光定量 PCR 引物序列

Table 1 Primer sequences for quantitative real-time PCR

Gene	Forward(5' 3')	Reverse (3' 5')	segment(bp)
S100P	TTCCTGCAGAGTGGAAAAGACA	TCCACCTGGGCATCTCCATT	80
CX3CR1	ACTTCTTCCACCATGAGCAGG	CATGGTGAAGGCCTCTAGTCG	157
SNX3	CCGCTTCACCACCTACGAAAT	GGATGACCACCGACCCCTTG	142
SPON2	TAGACTGAAGTCAGGCCACG	CTGCACGGCCTTCTCGAAAT	94
DEFA1	CGGACATCCCAGAAGTGGTT	TAGCGACGTTCTCCTGCAAT	127
MMP9	TTTGAGTCCGGTGGACGATG	GCTCCTCAAAGACCGAGTCC	197
ANXA3	CTGAGAGGTCAAATGCACAGC	GCATCAAAGACTGCTGGTGG	151
IL1R2	TGTTGCGCTTGTACGTGTTG	ACTCCGCTTGTAAATGCCTC	114
PLSCR1	CACCCGGAAACAACTTGCC	ACACTGGCTGATTTGGGACA	172
GNLY	TCTTTCCAATGCTCGCACC	AACGTATACACAACCTGAGCTCC	161

2 结果

2.1 肾精亏虚证 OP 患者差异表达基因筛选

与同龄健康状态老年人对照组比较,肾精亏虚证 OP 患者中特异性表达的探针有 910 个,对应 602 个基因($FC \geq 1.5$ 或 $FC \leq 0.667$, $q\text{-value} \leq 5\%$),其中上调基因 579 个,下调基因 23 个(见图 1),图中红点表示该基因在 OP 组中的表达明显高于对照组(上调),绿点反映该基因在 OP 组的表达明显低于对照组(下调)。上调倍数超过 3 倍的基因有 7 个,分别为 S100P、SNX3、DEFA1、MMP9、LTF、ANXA3、IL1R2、PLSCR1(见表 2);下调倍数高于 2 倍的基因有 3 个,分别为 CX3CR1、SPON2、GNLY(见表 3)。

2.1.1 肾精亏虚证 OP 患者差异表达基因(GO)功能注释分析:对肾精亏虚证 OP 患者差异表达基因

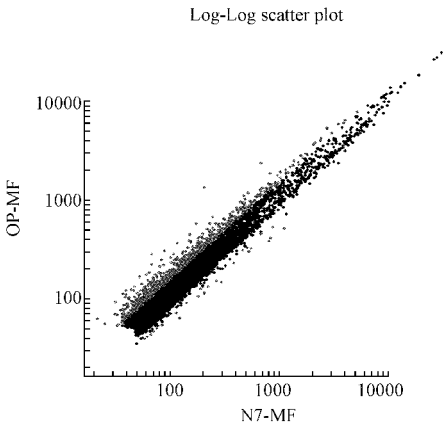


图 1 OP 患者差异表达基因的散点图
Fig.1 The scatter chart of differential expressed genes

表 2 上调差异基因表达倍数超过 3 倍的基因

Table 2 Expression of up-regulated differential genes by 3 times

基因符号	基因名称	中文名称	倍数变化
S100P	S100 calcium binding protein P	S100 钙结合蛋白 P	6.4
SNX3	sorting nexin 3	分选连接蛋白 3	4.1
DEFA1	defensin, alpha 1, corticostatin	防御素 $\alpha 1$, 皮质醇稳定蛋白	3.44
MMP9	matrix metalloproteinase 9 (gelatinase B, 92kDa gelatinase, 92kDa type IV collagenase)	基质金属蛋白酶 9(白明胶酶 B, 92 kda 白明胶酶, 92 kda IV 型胶原酶)	3.3
ANXA3	annexinA3	膜联蛋白 A3	3.1
IL1R2	interleukin 1 receptor, type II	白介素 1 受体 2	3.1
PLSCR1	phospholipid scramblase 1	磷脂爬行酶 1	3

表 3 下调差异基因表达倍数小于 0.5 倍的基因

Table 3 Expression of down-regulated differential genes by 0.5 times

基因符号	基因名称	中文名称	倍数变化
CX3CR1	chemokine (C-X3-C motif) receptor 1	C-X3-C 趋化因子受体 1	0.49
SPON2	spondin 2, extracellular matrix protein	脊椎蛋白 2, 细胞外基质蛋白	0.49
GNLY	granulysin	颗粒溶素	0.47

进行 Gene Ontology (GO) 功能注释, GO 分析可从生物学过程 (BP)、细胞组分 (CC)、分子功能 (MF) 三个方面对差异表达基因涉及的功能进行注释、富集、聚类。

用 DAVID 对差异蛋白进行 GO 富集分析显示, 涉及 GO-BP 功能的主要参与免疫应答 (10.6%)、防御应答 (10%)、编程性细胞死亡调控 (9%)、受伤应答 (7.8%)、编程性细胞死亡 (7.5%)、膜组织 (5.3%)、炎症应答 (5.3%)、细菌应答 (4.7%)、脂多糖应答 (2.5%)、细菌来源的分子应答 (2.5%) 等过程; 差异基因涉及 GO-MF 功能的以结合功能为主, 酶结合 (6%)、二聚体蛋白的活动 (5.5%)、GTP 结合 (4%)、鸟嘌呤核苷酸结合 (4%)、GTP 酶活性 (3.5%)、小结合蛋白连接酶活性 (2.3%)、核酸结合 (1.7%)、细胞因子受体活性 (1.3%)。

2.1.2 肾精亏虚证 OP 患者差异表达基因 Pathway 分析: KEGG Pathway 分析显示, 这些差异表达基因主要属于趋化因子信号转导通路 (3.8%)、系统性红斑狼疮 (2.8%)、白细胞跨内皮迁移 (2.7%)、造血细胞系 (2.3%)、FcγR - 介导吞噬 (2.2%)、病毒性心肌炎 (1.8%)、幽门螺杆菌感染的上皮细胞信号 (1.5%)、同种异体移植排斥 (1.2%)、移植植物抗宿主疾病 (1.2%)、1 型糖尿病 (1.2%) 等。

2.2 肾精亏虚证 OP 患者差异表达基因的 PCR 验证结果

针对上述差异基因表达进行荧光定量 PCR 扩增验证, 验证结果与基因芯片检测结果一致。与同龄健康状态老年人比较, 肾精亏虚证 OP 患者 S100P、SNX3、DEFA1、MMP9、ANXA3、IL1R2、PLSCR1 基因的 mRNA 表达显著增加, 具有统计学意义 ($P < 0.05$), 详见图 2。与同龄健康状态老年人比较, 肾精亏虚证 OP 患者 CX3CR1、SPON2、GNLY 基因的 mRNA 表达明显下调, 具有统计学意义 ($P < 0.05$), 详见图 3。

3 讨论

肾主骨、生髓的生理功能, 实际上是肾之精气具有促进机体生长发育功能的一个重要组成部分。中医学认为, 肾藏精, 精生髓, 髓藏于骨腔之中, 髓养骨, 促进骨骼生长发育。如《素问·阴阳应象大论》: “肾生骨髓”; 《素问·平人气象论》: “肾藏骨髓之气”^[6]。髓藏与骨腔之中, 以充养骨骼, 所谓“肾充则髓实, 髓实则骨壮”, 故称“肾主骨”, 见于《素问·宣明五气》。《素问·六节藏象论》又称: “肾者……

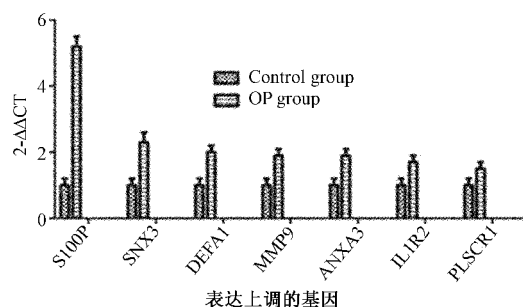


图2 肾精亏虚证 OP 组上调显著的差异基因表达

Fig. 2 The expression of significant up-regulated genes in OP-KED group

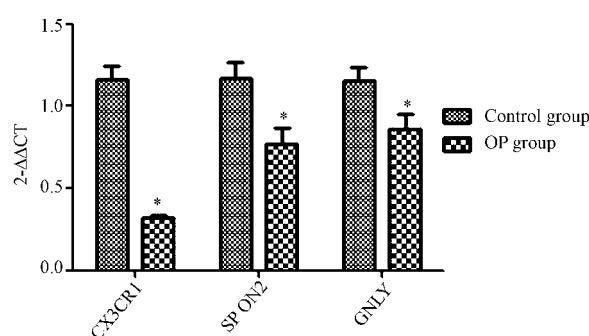


图3 肾精亏虚证 OP 组下调显著的差异基因表达

Fig. 3 The expression of significant down-regulated genes in OP-KED group

其充在骨。”因此, 肾 - 精 - 髓 - 骨组成一个系统, 有其内在联系。肾精充足, 髓化生有源, 骨质得养, 则发育旺盛, 骨质致密, 坚固有力。

反之, 如肾精亏虚, 骨髓化生无源, 骨骼失其滋养。在小儿, 就会骨骼发育不良或生长迟缓, 骨软无力, 肉门迟闭等; 在成人, 则可见腰膝酸软, 步履蹒跚, 甚则脚痿不能行动; 在老年, 则骨质脆弱, 易于骨折等^[7]。如《素问·逆调论》: “肾不生则髓不能满。”《素问·痿论》: “肾气热, 则腰脊不举, 骨枯而髓减, 发为骨痿。”

中医药防治原发性骨质疏松症具有较好的疗效, 尤其在改善临床症状方面。据文献报道, 目前多数研究者认为骨质疏松症的根本原因为肾精亏虚, 中医药治疗多以补肾为主^[8-12]。但是, 其疗效机制尚不清楚, 发病机制也需要更加深入的研究。

本研究采用高通量基因芯片技术研究人类全基因组表达谱, 探讨原发性骨质疏松患者和同龄健康状态老年人的差异基因表达。初步结果显示: 两组人群血清中特异性表达的探针有 910 个, 对应 602

个基因 ($FC \geq 1.5$, $q\text{-value} \leq 5\%$), 其中上调基因 579 个, 下调基因 23 个。上调倍数超过 3 倍的基因有 7 个, 分别为 S100P、SNX3、DEFA1、MMP9、ANXA3、IL1R2、PLSCR1; 下调倍数小于 0.5 倍的基因有 3 个, 分别为 CX3CR1、SPON2、GNLY。对差异基因表达进行荧光定量 PCR 扩增验证, 结果与基因芯片检测结果一致。

用 DAVID 对差异蛋白进行 GO 富集分析以及 KEGG Pathway 等进行生物信息学分析显示, 差异基因表达主要涉及参与免疫、防御、受伤、炎症、细菌、脂多糖等应答, 编程性细胞死亡及其调控等生物学过程; 并与酶、GTP、鸟嘌呤核苷酸、GTP 酶、核酸结合, 二聚体蛋白的活动, 小结合蛋白连接酶活性, 细胞因子受体活性等分子功能, 以及趋化因子信号转导通路等有关。

其中, 与原发性骨质疏松症发病机制比较重要的差异基因表达: S100 蛋白 (S100P) 家族, 是多功能信号蛋白, 通过转导钙依赖性的细胞调节信号, 在酶的活化、蛋白磷酸化、细胞周期调控、基因表达转录、细胞增殖分化、黏附运动、细胞凋亡及维持细胞内外 Ca^{2+} 平衡等多种生物学过程中发挥重要作用^[13,14]。研究表明, S100 蛋白与成骨细胞分化及成骨性骨肉瘤侵袭转移等方面有着密切关系^[15]。可能参与调节骨形成或骨吸收^[16]。袁赤亭的研究结果表明, S100 蛋白在去势大鼠股骨头中的表达规律为术后 2 个月之内处于高表达状态; 术后 3 个月与假手术组比较无统计学差异; 术后 4-6 月呈低表达^[17]。由此可见, S100 在骨质疏松过程中发挥着重要的骨代谢调控作用。

分选连接蛋白 3 (sorting nexin 3, SNX3) 是分选连接蛋白家族 (sorting nexins) 的重要成员之一, 有多种生物学功能, 其中最重要的是参与胞内多种蛋白分子的转运、内体的成熟与分选等^[18]。

防御素 (defensin, DEFA1) 最早被认为是一种杀菌肽, 经进一步的研究发现, 它不仅具有抗菌作用, 而且还能抗真菌和病毒等多种微生物感染的作用, 在机体非特异性以及获得性免疫应答中发挥重要的作用^[19]。

基质金属蛋白酶 9 (MMP-9) 是人体内最重要的蛋白酶之一, 属于基质金属蛋白酶超家族成员中明胶酶的一种, 又称明胶酶 B, 其主要功能是分解细胞外基质, 参与人体许多生理及病理过程。该因子在人体内很多细胞中, 包括在破骨细胞中都能表达, 其表达又受到体内众多因子的调节, 如细胞生长因子、

基质金属蛋白酶组织抑制剂 (TIMPs) 等, 其作用底物主要是 IV、V、VII、X 型胶原, 明胶及弹性纤维^[20]。研究表明, 骨桥蛋白 (OPN) 激活 NF- κ B 信号通路, 上调 MMP9 蛋白及基因表达, 调控成骨细胞破骨及细胞的增殖和分化能力^[21-24]。

膜联蛋白 (annexin, ANX) 在细胞内的表达量较高, 约占细胞总蛋白的 1% - 2%, 是依赖钙离子调控的酸性膜磷脂结合蛋白超家族。其家族包括 A、B、C、D 和 E 五类。据文献报道, ANX 家族蛋白参与了包括细胞增殖、信号转导、胞吞与胞吐、分化与凋亡、炎症反应调控及抗凝血反应等一系列重要的细胞生理过程^[25]。ANXA3 是膜联蛋白超家族的一员。

白细胞介素 1 受体 2 (IL1R2) 作为诱饵受体, 主要表达于嗜中性粒细胞、B 细胞、单核细胞和巨噬细胞^[26]。IL1R2 是可以整合 IL-1 β 的诱饵分子, 并阻断下游信号传导的起始, 从而防止炎症。IL1R2 受体可使一些复杂疾病中的炎症减轻, 如强直性脊柱炎、关节炎等^[27,28]。

磷脂酰酶 1 (PLSCR1) 是 Ca^{2+} 结合的棕榈酰化 II 型膜蛋白, 棕榈酰化后定位于细胞膜, 参与细胞的增殖、分化和凋亡, 同时 PLSCR1 还是多种激酶的底物^[29]。

C-X3-C 趋化因子受体 1 (CX3CR1) 是 fractalkine 的唯一受体, 二者的相互作用, 可通过提高细胞黏附和促进 CX3CR1 阳性细胞的跨膜转移在组织损伤中发挥作用^[30]。

脊椎蛋白 2 (SPON2) 是脊椎蛋白 (spondin) 家族成员之一。研究表明, 骨骼发育受 Wnt/ β -catenin 信号通路的调控^[31], Wnt/ β -catenin 信号通路通过促进成骨细胞的发育、分化和激活 OPG 基因表达而调控骨骼的发育^[32]。另有研究表明, spondin 可激活并协同 Wnt/ β -catenin 信号通路参与对细胞增殖和分化的调控^[33]。

颗粒溶素 (granulysin, GNLY) 是脂蛋白皂素样蛋白家族的一员, 与穿孔素和颗粒酶共同定位与人细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 和自然杀伤细胞 (NK) 的溶细胞颗粒上^[34]。颗粒溶素具有溶细胞和杀菌的活性, 其作用对象包括肿瘤细胞、细菌、真菌和寄生虫。随着人们对颗粒溶素研究的深入, 颗粒溶素的抗菌、抗肿瘤作用也越来越多的被人们所了解, 其在超级细菌感染中起到重要免疫作用^[35]。

综上所述, 肾精亏虚证 OP 患者的差异基因表达上调或下调显著, 提示免疫应答、防御应答、趋化因子信号转导通路在骨质疏松发病过程中可能发挥

着重要的作用。结合以往文献报道, S100P 家族的调控信号转导作用; SNX3 的参与胞内多种蛋白分子的转运作用; DEFA1、CX3CR1 及 SPON2 的调控免疫应答作用; ANXA3、IL1R2、CX3CR1、GNLY 介导的炎症反应作用; SPON2 激活并协同 Wnt/ β -catenin 信号通路促进成骨细胞的发育、分化作用; MMP/TIMP 动态平衡破坏等, 均有可能在骨质疏松发病过程中发挥重要的作用。

本研究初步结果为后续关于骨质疏松症的发病机制相关研究开拓思路, 为肾精亏虚证骨质疏松症中医药防治提供可能的作用靶点。根据本次差异基因筛查结果, 后续我们将开展靶基因预测、针对靶基因信号调控机制进行深入研究。

【参 考 文 献】

- [1] 原发性骨质疏松症诊疗指南(2017)[J]. 中国全科医学, 2017, 20(32):3963-3982.
- [2] 叶山东. 原发性骨质疏松症的流行病学[J]. 安徽医学, 2009, 30(11):1261-1262.
- [3] 梁文娜, 李西海, 李灿东. 绝经后骨质疏松的核心病机——骨痿[J]. 中国老年学杂志, 2015, 35(18):5333-5335.
- [4] Irizarry RA, Hobbs B, Collin F, et al. Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics*. 2003 Apr; 4(2):249-64.
- [5] Tusher V G, Tibshirani R, Chu G. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2001, 98(9):5116-21.
- [6] 尚奇, 任辉, 沈耿杨, 等. 基于肾主骨生髓理论探讨老年性骨质疏松症的中医治疗[J]. 中医杂志, 2017, 58(16):1433-1435.
- [7] 夏丽颖. 中药治疗原发性骨质疏松作用机制研究进展[J]. 上海中医药大学学报, 2017, 31(02):95-98.
- [8] 李建浩, 陆伟峰, 王国樑. 健脾补肾汤治疗继发性肾性骨质疏松症临床观察[J]. 新中医, 2017, 49(12):86-88.
- [9] 杨阳, 张允富, 李旭. 独活寄生汤加减对绝经后骨质疏松症患者(肝肾阴虚)骨密度及骨代谢指标的影响[J]. 中国医学创新, 2017, 14(33):61-64.
- [10] 付江涛, 彭贞, 黄永红, 等. 补肝益肾方治疗绝经后骨质疏松症的临床观察[J]. 中国医药导报, 2017(33):86-89+93.
- [11] 苑成发, 闫秀中, 房经武, 等. 杜仲补肾健骨颗粒联合温针灸治疗肾虚精亏型骨质疏松症临床研究[J]. 河南中医, 2017, 37(11):1981-1986.
- [12] 黄文庭. 肾虚证与骨质疏松症的相关性研究[J]. 广西中医药, 2017, 40(05):1-2.
- [13] Le niak W, Somnicki LP, Filipek A. S100A6-new facts and features[J]. *BiochemBiophys Res Commun*, 2009, 390(4):1087-1092.
- [14] Poeter M, Radke S, Koese M, et al. Disruption of the annexin A1/S100A11 complex increases the migration and clonogenic growth by dysregulating epithelial growth factor (EGF) signaling [J]. *BiochimBiophysActa*, 2013, 1833(7):1700-1711.
- [15] Ma X, Yang Y, Wang Y, et al. Small interfering RNA-directed knockdown of S100A4 decreases proliferation and invasiveness of osteosarcoma cells[J]. *Cancer Letters*, 2010, 299(2):171-181.
- [16] Li D, Zhang R, Zhu W, et al. S100A16 inhibits osteogenesis but stimulates adipogenesis. [J]. *Molecular Biology Reports*, 2013, 40(5):3465-3473.
- [17] 袁亦亭. S100A4 和 S100A6 在去势大鼠骨组织中表达及意义[D]. 温州医科大学, 2014.
- [18] Carlton J, Bujny M, Rutherford A, et al. Sorting nexins-unifying trends and new perspectives[J]. *Traffic*, 2005, 6(2):75-82.
- [19] 李洪军, 胡宗利, 魏泓. 防御素(Defensin)研究进展[J]. 中国生物工程杂志, 2001, 21(3):34-37.
- [20] 刘加强, 杨富生. 关于基质金属蛋白酶 9(MMP-9)的最新进展[J]. 牙体牙髓牙周病学杂志, 2005, 15(3):168-171.
- [21] 喻琴云, 詹晓峰, 黄彦. 刺芒柄花素对去势骨质疏松大鼠 P38MAPK/MMP-9 信号通路的影响[J/OL]. 中国临床药理学与治疗学, 2017(12):1371-1376 [2018-01-10]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1206.R.20180102.1522.018.html>.
- [22] 褚青波. 骨质疏松患者血清 MMP 相关指标及骨胶原指标的变化研究[J]. 陕西医学杂志, 2017, 46(05):619-620.
- [23] 张林, 张兵, 鲍亮, 等. 补肾断续汤治疗绝经后骨质疏松症的疗效及对血清 MMP-2 水平的影响[J]. 现代中西医结合杂志, 2016, 25(35):3896-3898+3977.
- [24] 付远锋, 李家伟, 陈阳斌, 等. 阿仑膦酸钠片联合骨碎补煎剂对老年骨质疏松患者血清 MMP-9 和 TNF- α 水平的影响[J]. 现代生物医学进展, 2016, 16(29):5756-5759.
- [25] Mussunoor S, Murray G I. The role of annexins in tumour development and progression. [J]. *Journal of Pathology*, 2008, 216(2):131-140.
- [26] PETERS V A, JOESTING J J, FREUND G G. IL-1 receptor 2 (IL-1R2) and its role in immune regulation [J]. *Brain Behavior&Immunity*, 2013, 32(4):1-8.
- [27] CHEN K. Association of IL-1R2 genetic polymorphisms with the susceptibility of ankylosing spondylitis in northern chinese han population[J]. *Modern Rheumatology*, 2015, 25(6):908-912.
- [28] SHIMIZU K, NAKAJIMA A, SUDO K, et al. IL-1 receptor type 2 suppresses collagen-induced arthritis by inhibiting IL-1 signal on macrophages [J]. *Journal of Immunology*, 2015, 194(7):3156-3168.
- [29] Williamson P. Phospholipid Scramblases [J]. *Lipid Insights*, 2015, 8(Suppl 1):41-44.
- [30] 朱洁, 周华东. Fractalkine/CX3CR1 参与骨髓间充质干细胞向缺血脑组织定向迁移的实验研究[J]. 解放军医药杂志, 2014, 26(03):38-42.
- [31] Chen Y, Alman B A. Wnt pathway, an essential role in bone regeneration[J]. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2010, 106(3):353-362.
- [32] Spencer GJ, Utting JC, Etheridge SL, et al. Wnt signalling in osteoblasts regulates expression of the receptor activator of NF κ B ligand and inhibits osteoclastogenesis in vitro[J]. *J Cell Sci*, 2006, 119(Pt 7):1283-96.
- [33] 杨芳. WNT 信号通路相关基因 R-spondin2 的研究进展[J]. 生物技术世界, 2015(7):251-251.
- [34] Patricia L. Semple, Marcia Watkins, Virginia Davids, et al. Induction of Granulysin and Perforin Cytolytic Mediator Expression in 10-Week Old Infants Vaccinated with BCG at Birth [J]. *Clinical and Developmental Immunology*, 2011, 438-463.
- [35] Irwin AD, Marriage F, Mankambo LA, et al. This Provisional PDF corresponds to the article as it appeared upon acceptance. Fully formatted PDF and full text (HTML) versions will be made available soon [J]. *BMC Medical Genomics*, 2012, 5:13:1471-1493.

(收稿日期: 2018-03-26; 修回日期: 2018-05-06)