

# 骨质疏松症易感基因 *BDNF* 的遗传学关联分析及功能研究

杨燧, 卢冰婕, 段媛媛, 陈晓峰, 马建岗, 郭燕

西安交通大学生命科学与技术学院, 生物医学信息工程教育部重点实验室, 西安 710049

**摘要:** 为探索脑源性神经营养因子 *BDNF* 基因与中国汉族人群骨密度(bone mineral density, BMD)的关系, 解析该基因调节骨质疏松症的功能机制, 进而为中国汉族人群的骨质疏松症的防治提供依据。本研究从我国陕西地区征集了 1300 例汉族样本, 并测量髌部/脊椎骨密度。选取 *BDNF* 基因上的 14 个标签 SNPs 进行基因分型, 与 1300 例样本 BMD 进行关联分析, 发现 8 个 SNPs 与髌部/脊椎 BMD 显著关联( $P < 0.05$ )。其中, SNP rs16917237 同时与髌部和脊椎骨密度关联, 经 Bonferroni 校正后仍表现出显著性( $0.05/14 = 0.0036$ )。整合连锁不平衡和单体型分析、表观功能注释、表达数量基因座分析、代谢通路分析进一步探索 *BDNF* 基因调节骨质疏松症的机制。构建小鼠前成骨细胞系(MC3T3-E1)人骨形态形成蛋白(rhBMP-2)诱导分化模型, 利用小干扰 RNA(siRNA)敲除 *BDNF*。结果显示: 14 个 SNPs 位于同一单体内; rs16917237 在成骨细胞中表现出较强的激活型组蛋白 H3K4me1、H3K4me3、H3K27ac 修饰信号以及 P300 结合信号, 表明其在成骨细胞中可能具有调控活性; rs16917237 在 11 个组织中均能显著影响 *BDNF* 基因表达; *BDNF* 基因位于与成骨细胞增殖分化相关的 MAPK 通路中; *BDNF* 敲低能够显著降低 MAPK 通路中与成骨分化相关的 *CREB* 基因 mRNA 和蛋白表达水平, 提示其可能通过调控 *CREB* 表达进而影响成骨分化。生物信息学分析和功能实验结果一致, 表明 *BDNF* 基因可能是影响骨质疏松症的重要功能基因。

**关键词:** 关联分析; 单核苷酸多态性; *BDNF*; 骨质疏松症; 成骨分化

## Genetics association study and functional analysis on osteoporosis susceptibility gene *BDNF*

Man Yang, Bingjie Lu, Yuanyuan Duan, Xiaofeng Chen, Jiangang Ma, Yan Guo

Key Laboratory of Biomedical Information Engineering of Ministry of Education, and Institute of Molecular Genetics, School of Life Science and Technology, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710049, China

收稿日期: 2017-04-20; 修回日期: 2017-06-08

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 31471188, 81573241), 中国博士后科学基金项目(编号: 2016M602797)和陕西省自然科学基金研究项目(编号: 2016JQ3026)资助[Supported by the National Natural Science Foundation of China (Nos. 31471188, 81573241), China Postdoctoral Science Foundation (No. 2016M602797) and the Natural Science Basic Research Plan in Shaanxi Province of China (No. 2016JQ3026)]

作者简介: 杨燧, 硕士研究生, 研究方向: 遗传与分子生物学。E-mail: ymx6800@163.com

通讯作者: 郭燕, 博士, 副教授, 研究方向: 骨质疏松症遗传与代谢。E-mail: guoyan253@mail.xjtu.edu.cn

DOI: 10.16288/j.ycz.17-145

网络出版时间: 2017/6/23 9:25:44

URI: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20170623.0925.001.html>

**Abstract:** To explore the relationship between brain-derived neurotrophic factor (*BDNF*) gene and bone mineral density (BMD) in Chinese Han population, we performed association analysis of 14 tag SNPs on *BDNF* gene with hip/spine BMD in 1300 Han Chinese samples from Shaanxi Province. We found that 8 of the 14 SNPs were significantly associated with hip or spine BMD ( $P < 0.05$ ). Moreover, the SNP rs16917237 was significantly associated with both hip and spine BMD, with significant Bonferroni correlation ( $P$  value  $0.05/14 = 0.0036$ ) in hip BMD. To further explore the regulatory mechanism of *BDNF* gene in osteoporosis, we further performed a set of data analyses, including linkage disequilibrium and haplotype analysis, epigenetic annotation, expression quantitative trait locus (eQTL) analysis and metabolic pathway analysis. Further, we have established a mouse pre-osteoblasts differentiation cell model (MC3T3-E1) by recombination human bone morphogenetic protein (rh-BMP2) induction. siRNA-mediated knock down of *BDNF* in this cell model showed that all 14 SNPs are in the same haplotype block. Strong signals of active histone H3K4me1, H3K4me3, H3K27ac modifications and P300 binding were observed in osteoblasts, in the region surrounding the most significant SNP rs16917237, suggesting that this SNP might have a regulatory function in osteoblasts. Furthermore, analysis of genotype data of rs16917237 and *BDNF* expression in multiple tissues from GTEx showed that rs16917237 SNP could significantly affect the expression of *BDNF* in 11 tissues. Through analysis of the various *BDNF* pathways, we showed that *BDNF* participates in the MAPK pathway, which is a vital and well-established pathway affecting osteoblasts proliferation and differentiation. siRNA knock down of *BDNF* significantly decreased the mRNA and protein levels of *CREB*, which is important in the MAPK pathway in osteoblast differentiation. These findings suggest that *BDNF* might affect osteoblast differentiation via regulation of *CREB* expression. In conclusion, our results from combined genetic association and functional analyses show that *BDNF* is a vital osteoporosis susceptibility gene, which can affect BMD not only in Chinese Han but also likely in other populations.

**Keywords:** candidate gene association analysis; SNP; *BDNF*; osteoporosis; osteoblast differentiation

骨质疏松症(osteoporosis)是以骨量减少、骨质量下降和骨强度降低,并伴随骨折风险增加为特征的代谢性骨病<sup>[1]</sup>。骨代谢受成骨细胞骨形成和破骨细胞骨吸收共同调控<sup>[2]</sup>。在健康的骨中,骨吸收与骨形成处于动态平衡中,当平衡被打破,会导致骨微观结构破坏及骨矿物密度(bone mineral density, BMD)失衡,进而导致骨质疏松症发生。

遗传因素是骨质疏松症发生的重要影响因素<sup>[3,4]</sup>。BMD 作为骨质疏松症诊断的金标准,其遗传力高达 0.5~0.8<sup>[5,6]</sup>,可作为骨质疏松症遗传易感性分析的直接表型。目前最常用于检测 BMD 的方法是双能 X 射线吸收测定法(dual energy X-ray absorptiometry, DXA)。候选基因关联分析是一种有效发掘复杂疾病易感基因的方法,已被成功应用于糖尿病、肥胖、癌症、骨质疏松症等复杂疾病遗传分析<sup>[7,8]</sup>。

脑源性神经营养因子 *BDNF*(brain-derived neurotrophic factor)属于神经生长因子(nerve growth factor)家族,能够影响多种神经元的生长发育<sup>[9,10]</sup>。杨等<sup>[11]</sup>通过对 *BDNF* 基因多态性与云南傣族男性海洛因的相关性分析表明携带 rs6265-A 等位基因个

体更倾向于对海洛因产生依赖。近年来,研究者们发现该蛋白也可由非神经细胞合成分泌,参与除神经系统以外多种细胞的增殖分化调控<sup>[12,13]</sup>。*BDNF* 与骨的发育也有着密切的联系,研究者们发现 *BDNF* 与破骨和软骨组织的分化相关<sup>[14,15]</sup>。研究表明 *BDNF* 可以与 *IGF-I* 协同调节 ERK/p38 MAPK 通路活性来促进软骨细胞增殖和分化<sup>[15]</sup>。2001 年, Yamashiro 等<sup>[16]</sup>通过原位杂交和免疫组化方法在小鼠下颌髁突、股骨生长板、松质骨和骨膜表面等成骨发生处,以及活跃期的成骨细胞中均能检测到 *BDNF* 及其受体 TrkB 的高表达,然而在静止期成骨细胞中却几乎未能检测到其表达,表明 *BDNF* 对成骨细胞形成及骨质分泌发挥重要作用。2013 年, Deng 等<sup>[17]</sup>发现 *BDNF* 外显子上的 1 个 SNP rs6265 在高加索白人样本中与脊椎 BMD ( $P = 0.0133$ )和髌部 BMD ( $P = 0.0019$ )显著关联,功能研究表明该 SNP 能够调控 *BDNF* 基因磷酸化水平以及人前成骨细胞系 hFOB-1.19 的分化。然而, *BDNF* 基因多态性是否影响汉族人群骨质疏松症的发生,以及 *BDNF* 基因如何影响成骨细胞分化的功能机制均尚不明确。本研究以

1300 例中国汉族人群髌部和脊椎 BMD 为表型, 选取 *BDNF* 基因上的 14 个 SNPs 位点进行关联分析, 发现 *BDNF* 基因多态性影响汉族人群髌部和脊椎 BMD。并进一步在小鼠前成骨细胞系(MC3T3-E1)中进行功能研究, 以期发现 *BDNF* 基因影响骨质疏松症的分子机制, 为解析骨质疏松症的致病机理及药物开发提供新思路。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

在中国陕西地区随机征集 1300 例中国汉族人群, 包括 700 例女性和 600 例男性, 年龄为 33~42 岁, 样本的基本信息见表 1。采用严格的排除标准以尽量减少对骨表型变异的已知或潜在的混杂影响<sup>[18]</sup>, 所有人员均签订了知情同意书。样本髌部和脊椎 BMD(g/cm<sup>2</sup>)使用美国 Hologic Inc 骨密度仪通过双能 X 射线吸收法进行测量, 仪器每日校准维护。同时采集所有样本外周血, 并采用乙二胺四乙酸二钾(EDTA dipotassium salt, EDTA-2K)抗凝。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 外周血 DNA 提取

外周血 DNA 的提取按照北京天根生化科技有限公司的血液组织 DNA 提取试剂盒说明书进行。

#### 1.2.2 *BDNF* 基因 SNPs 位点挑选与 SNPs 分型

##### 1.2.2.1 *BDNF* 基因 SNPs 位点确定与连锁不平衡分析

利用生物数据库 dbSNP (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>)和 HapMap([https://www.ncbi.nlm.nih.gov/variation/news/NCBI\\_retiring\\_HapMap/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/variation/news/NCBI_retiring_HapMap/))搜索 *BDNF* 基因的 SNPs, 基于以下标准: 最小等位基因频率(MAF) > 0.05; SNPs 覆盖密度为平均 5 kb/个; 优先挑选标签 SNPs。最终在 *BDNF* 基因全长内找到了 14 个候选 SNPs 位点。14 个 SNPs 在 1300 例样本的中连锁不平衡和单体型分析通过 Haploview Version 4.2(<https://www.broadinstitute.org/haploview/haploview>)完成。

##### 1.2.2.2 SNPs 分型

1300 例样本的 14 个 SNPs 分型采用美国 Sequenom

表 1 样本的基本信息

Table 1 Basic information of samples

样本	中国西北地区汉族人群
总人数	1300
男性/女性	600/700
年龄(岁)	33.42 ± 11.32
身高(cm)	163.94 ± 8.11
体重(kg)	59.63 ± 10.41
髌部 BMD(g/m <sup>2</sup> )	0.87 ± 0.14
脊椎 BMD(g/m <sup>2</sup> )	0.89 ± 0.15

注: 样本基本信息以平均值±标准误显示。

公司的 MassARRAY 系统通过时间飞行质谱技术(MALDI-TOF)完成。SNP 分型质量控制标准与之前研究一致<sup>[19,20]</sup>: 分型成功率<95%的样本被剔除; 位点检出率<90%, 偏离 Hardy-Weinberg 平衡( $P < 0.001$ ), 最小等位基因频率(minor allele frequency, MAF)<0.05 的 SNP 被剔除。通过 MassARRAY RT 3.0.0.4 软件获取结果并通过 MassARRAY Typer 3.4 软件对结果进行分析。

#### 1.2.3 基于数量性状 BMD 的关联研究

采用年龄、性别、身高、体重作为协变量, 通过多重线性回归对测量的原始 BMD 进行校正。通过 PLINK 软件<sup>[21]</sup>对 1300 例样本的 14 个 SNPs 基因型与校正后的 BMD 进行关联分析。为了减少多重检验的假阳性, 采用 Bonferroni correlation 对所有关联分析的结果进行校正( $0.05/14 = 0.0036$ )。

#### 1.2.4 rs16917237 对 *BDNF* 基因表达相关性分析

从 GTEx(<https://gtexportal.org/home/>)数据库中提取了 rs16917237 基因型数据和 44 个组织中 *BDNF* 基因表达数据, 运用分组 *t* 检验检测不同基因型间 *BDNF* 表达差异, 利用 R 语言的 ggplot2 包(<https://www.r-project.org/>)获得不同基因型 *BDNF* 表达量对比箱形图。

#### 1.2.5 前成骨细胞细胞培养及 rhBMP-2 诱导分化

MC3T3-E1 细胞(来自中国科学院上海细胞库)在补充 10%胎牛血清(PAA, 德国)、100 U/mL 青霉素-链霉素(Hyclone, 美国)的  $\alpha$ -MEM(Hyclone, 美国)培养基中, 5% CO<sub>2</sub> 和 37 °C 条件下培养。以终浓

度为 200 ng/mL 的 rhBMP-2(PEPROTECH, 美国)诱导分化。MC3T3-E1 细胞以  $2.5 \times 10^4$ /孔数量铺 24 孔板, 汇合度达到 50%~70% 时加入 rhBMP-2, 48 h 后用于碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)染色。

### 1.2.6 碱性磷酸酶染色

碱性磷酸酶染色实验根据上海碧云天生物技术有限公司碱性磷酸酶染色试剂盒说明书进行。正常组和诱导组的 MC3T3-E1 细胞用 PBS 洗两遍, 多聚甲醛固定, 根据试剂盒说明书进行后续步骤, 染色完成后在 10× 镜下拍照观察对比结果。

### 1.2.7 siRNA 转染

MC3T3-E1 细胞以  $1 \times 10^5$ /孔数量铺 6 孔板, 汇合度达 50%~70% 时加入 rhBMP-2 进行诱导, 终浓度为 200 ng/mL, 8 h 后进行 siRNA 转染, 48 h 后收细胞, 进行后续试验。2 条 siRNA(siRNA1, siRNA2)由上海吉玛生物制药技术有限公司提供, NC (negative control)作为阴性对照。

### 1.2.8 qRT-PCR

采用美国 Invitrogen 公司 TRIZOL 提取细胞总 RNA, 测定其浓度后, 定量至 1  $\mu$ g。用瑞士 Roche 公司反转录试剂盒进行反转录得到 cDNA, 稀释一倍后作为模板进行荧光定量 PCR, 所用试剂盒为 QuantiFast SYBR Green PCR Kit (Qiagen, 德国), 所用内参基因为 *GAPDH*。*GAPDH*、*BDNF* 和 *CREB* 基因引物均由江苏金唯智生物科技有限公司合成, 序列分别为 *GAPDH*: F-ACTGAGGACCAGGTTGTC, R-TGCTGTAGCCGTATTCATTG; *BDNF*: F-GATGCCGCAAACATGTCTATGA, R-TAATACTGTCACACACGCTCAGCTC; *CREB*: F-AGCTCGGCTGTTCCGTGAG, R-TCACCAACACTCGGCTTCTCC。

### 1.2.9 Western 印迹

细胞总蛋白通过全蛋白提取试剂盒(沈阳万类生物科技有限公司)提取, 经 Bicinchoninic acid (BCA) 试剂盒(上海碧云天生物科技有限公司)定量后, 加入 5× 上样缓冲液进行蛋白变性。样本经 100  $^{\circ}$ C 孵育 5 min 后, 用 10% SDS-PAGE 胶进行电泳, 浓缩胶 80 V 恒压 30 min, 分离胶 120 V 恒压 90 min; 转膜采用 PVDF 膜(Roche 瑞士)进行, 湿转条件 280 mA 40 min。

转膜完成后采用 5% 脱脂牛奶封闭, TBST 洗涤 3 次, 每次 10 min 后进行一抗孵育过夜。二抗孵育 2 h 后, 经增强型化学发光 (Enhanced Chemiluminescent, ECL)(Cell Signaling Technology, 美国)显色液孵育 1 min 后于化学发光成像系统中显色。一抗和二抗( $\beta$ -actin 和 CREB)购自美国 CST 公司, BDNF 一抗购自沈阳万类生物科技有限公司。

## 2 结果与分析

### 2.1 *BDNF* SNPs 髌部 BMD 关联分析及 SNPs 单体型分析

通过整合 dbSNP (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/index.html>)和 HapMap (<http://www.hapmap.org>)数据库, 本研究挑选了位于 *BDNF* 基因上的 14 个 SNPs 进行后续关联分析。对上述 14 个 SNPs 进行基因分型后, 进行髌部和脊椎 BMD 关联分析, 发现 6 个与髌部 BMD 显著关联的 SNPs(表 2), 分别为 rs16917237 ( $P = 0.0027$ )、rs7103411 ( $P = 0.0093$ )、rs11030104 ( $P = 0.0114$ )、rs6265 ( $P = 0.0130$ )、rs988748 ( $P = 0.0141$ )和 rs1829469 ( $P = 0.0153$ ); 3 个与脊椎 BMD 显著关联的 SNPs(表 2), rs16917237 ( $P = 0.0095$ )、rs11030121 ( $P = 0.0234$ )和 rs7124442 ( $P = 0.0374$ )。其中, 与髌部 BMD 相关性最强的 SNP rs16917237 ( $P = 0.0027$ )经 Bonferroni 校正后仍表现出显著性( $0.05/14 = 0.0036$ )。rs16917237 的风险 T 等位基因在人群中的频率为 0.49, 结果显示其能够显著下调陕西地区汉族人的髌部 BMD ( $\beta = -0.0122$ ,  $P = 0.0027$ )和脊柱 BMD ( $\beta = -0.0107$ ,  $P = 0.0095$ )。连锁不平衡分析和单体型分析发现, 该 14 个 SNPs 位于同一单体型内(图 1), 表现出较强的连锁不平衡。

### 2.2 rs16917237 功能注释

为进一步探索 *BDNF* 基因功能, 对与髌部 BMD 相关性最强的 SNP rs16917237 进行表观遗传学功能注释。通过 ENCODE (<http://epigenomegateway.wustl.edu/>)和 ANNOVAR (<http://annovar.openbioinformatics.org/en/latest/user-guide/startup/>)对 SNP rs16917237 进行表观功能注释, 发现 rs16917237 在成骨细胞中表现出很强的激活型组蛋白 H3K4me1、H3K4me3、H3K27ac 修饰信号以及较强的 P300 结合活性(图 2)。

表 2 *BDNF* 基因 SNPs 与髌部及脊椎 BMD 关联分析结果  
Table 2 Association results of SNPs on *BDNF* with hip BMD and spine BMD

SNP	位置	基因	区域	A1/A2	MAF	髌部		脊椎	
						Beta	<i>P</i>	Beta	<i>P</i>
rs7124442	11_27677041	<i>BDNF</i>	3'UTR	C/T	0.07	0.0142	0.0808	0.0171	<b>0.0374</b>
rs6265	11_27679916	<i>BDNF</i>	外显子	C/T	0.50	0.0102	<b>0.0130</b>	0.0071	0.0862
rs11030104	11_27684517	<i>BDNF</i>	内含子	G/A	0.50	-0.0104	<b>0.0114</b>	-0.0076	0.0681
rs4517468	11_27688286	<i>BDNF</i>	内含子	A/T	0.25	0.0070	0.1507	0.0087	0.0779
rs7940188	11_27693739	<i>BDNF</i>	内含子	C/G	0.18	0.0037	0.4950	0.0035	0.5298
rs7103411	11_27700125	<i>BDNF</i>	内含子	T/C	0.49	0.0107	<b>0.0093</b>	0.0069	0.0977
rs16917237	11_27702383	<i>BDNF</i>	内含子	T/G	0.49	-0.0122	<b>0.0027</b>	-0.0107	<b>0.0095</b>
rs190640500	11_27703961	<i>BDNF</i>	内含子	T/A	0.11	-0.0041	0.5541	0.0085	0.2188
rs4542361	11_27707681	<i>BDNF</i>	内含子	G/C	0.43	0.0079	0.0604	0.0033	0.4400
rs1949513	11_27709271	<i>BDNF</i>	内含子	G/A	0.24	0.0079	0.1140	0.0015	0.7718
rs988748	11_27724745	<i>BDNF</i>	内含子	C/G	0.50	-0.0101	<b>0.0141</b>	-0.0070	0.0937
rs1829469	11_27730556	<i>BDNF</i>	内含子	G/A	0.50	-0.0100	<b>0.0153</b>	-0.0071	0.0907
rs11030121	11_27736207	<i>BDNF</i>	内含子	T/C	0.07	0.0134	0.0959	0.01835	<b>0.0234</b>
rs2883187	11_27741092	<i>BDNF</i>	5'UTR	A/G	0.43	0.0068	0.1065	0.0021	0.6099

注：所有 SNPs 物理位置参考 NCBI 的 GRCh37.p13 版本；A1 为人群中等位基因频率较小的碱基，A2 为人群中等位基因频率较大的碱基；MAF 为 1300 例汉族样本的最小等位基因频率；粗体部分为  $P<0.05$  的 SNPs 及其  $P$  值。

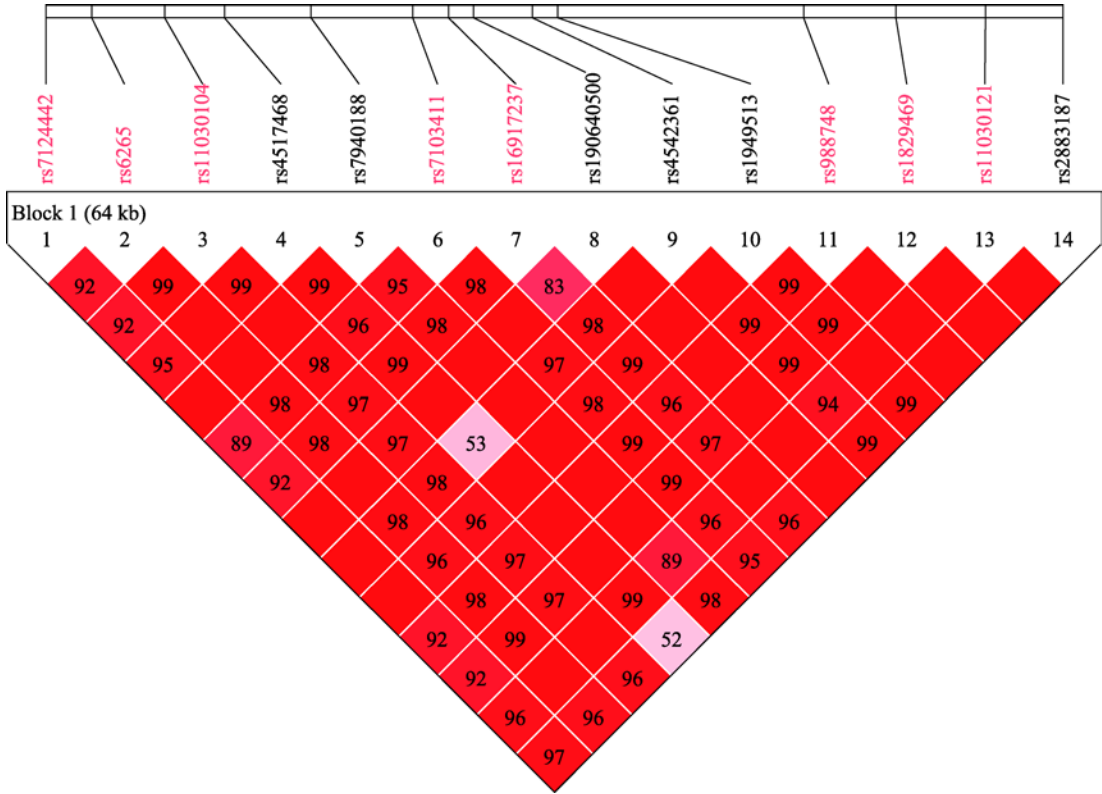


图 1 1300 例样本 14 个 SNPs 连锁不平衡图谱  
Fig. 1 Linkage disequilibrium (LD) blocks of 14 SNPs in 1300 samples  
标红 SNPs 为与髌部或者脊椎 BMD 显著相关的 SNPs。



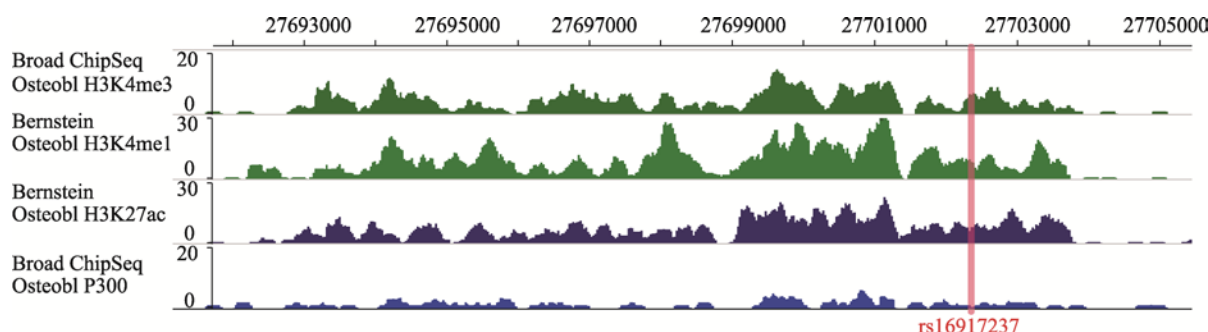


图 2 SNP rs16917237 的表观遗传注释结果

Fig. 2 Annotation results of SNP rs16917237

### 2.3 rs16917237 影响 *BDNF* 基因表达

为探讨 rs16917237 对 *BDNF* 表达的影响,在 44 个 GTEx 组织中分别检测 rs16917237 基因型和 *BDNF* 表达关联性。结果发现在 11 个不同组织(主动脉、冠状动脉、胫前动脉、大脑皮层、乳腺组织、食管肌层、胫骨神经、心脏心房附件、肌肉骨骼、皮肤、脾脏)中, rs16917237 不同基因型显著影响 *BDNF* 基因表达。其中,在 4 个组织(主动脉、胫前动脉、大脑皮层、肌肉骨骼)中纯合 G 等位基因与纯合 T 等位基因相比能够显著上调 *BDNF* 基因表达,7 个组织的 *BDNF* 表达在 G 型纯合子与杂合子间存在显著差异(图 3)。

### 2.4 小鼠前成骨细胞分化模型建立

为探索 *BDNF* 基因对成骨细胞分化的影响,本研究首先构建了 rh-BMP2 诱导小鼠前成骨细胞 MC3T3-E1 向成骨分化的模型。以终浓度为 200 ng/mL rhBMP-2 刺激小鼠前成骨细胞 MC3T3-E1 分化,并以碱性磷酸酶染色检测骨分化早期标记物碱性磷酸酶表达,发现诱导 48 h 组较未诱导组着色更深,表明在刺激 48 h 的时候,前成骨细胞已经开始分化(图 4)。

### 2.5 siRNA 介导 *BDNF* 敲除抑制成骨分化

成骨分化细胞模型构建成功后,采用 2 条靶向 *BDNF* 基因的 siRNA 在分化的 MC3T3-E1 细胞中干扰 *BDNF* 表达。结果表明用 rh-BMP2 诱导能够显著促进 *BDNF* 基因的 mRNA 和蛋白表达,靶向 *BDNF* 的两条 siRNA 均能够成功降低 *BDNF* 基因的 mRNA 和蛋白的表达水平(图 5, A 和 B)。

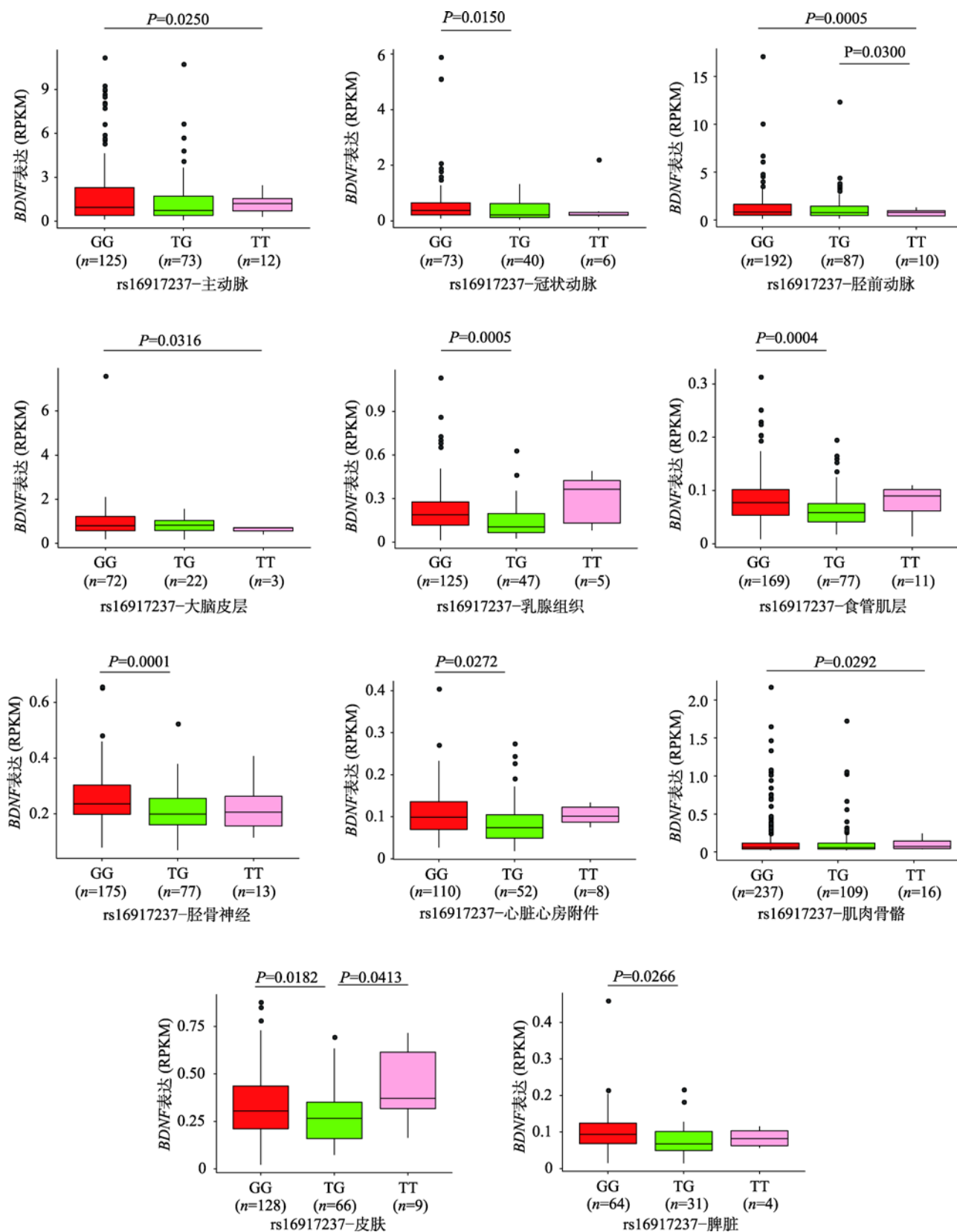
为进一步探索 *BDNF* 基因影响骨分化的相关机

制,利用 DAVID 数据库(<https://david.ncifcrf.gov/>)检索 *BDNF* 参与的主要信号通路,结果发现 *BDNF* 基因参与了与成骨细胞增殖分化相关的经典通路—MAPK 通路。MAPK 通路中的 CREB (cAMP response element (CRE)-binding protein)基因被报道与成骨分化相关<sup>[22,23]</sup>,研究表明 CREB 基因过表达能够显著增强成骨分化标记物碱性磷酸酶的活性<sup>[23]</sup>,这提示 *BDNF* 基因参与骨分化的调节过程可能与 CREB 基因表达相关。

通过靶向 *BDNF* 的 siRNA 转染分化中的 MC3T3-E1 细胞,48 h 后以荧光定量 PCR 和 Western 印迹杂交分别检测 CREB 基因的 mRNA 及蛋白表达量。结果发现 rh-BMP2 诱导能够显著促进 CREB 基因的蛋白表达,*BDNF* 的敲除能够显著降低 CREB 基因的 mRNA 和蛋白的表达(图 5, C 和 D)。

## 3 讨论

候选基因关联分析作为一种有效验证复杂遗传疾病易感性的方法,已被成功用于糖尿病,克罗恩病,癌症等多种复杂疾病的遗传易感性分析<sup>[24,25]</sup>。本研究首次选取 1300 例汉族人群样本,进行 *BDNF* 基因与髌部 BMD 的关联研究,鉴定了 *BDNF* 基因内 6 个与髌部 BMD 显著关联的 SNPs,3 个与脊椎 BMD 显著关联的 SNPs,表明 *BDNF* 基因是 1 个影响中国人群骨质疏松症风险的新易感基因。骨质疏松症遗传因素联合会(genetic factors for osteoporosis consortium, GEFOS)是目前最全面的骨质疏松症全基因组关联分析的数据集,包含 17 个全基因组关联分析共 32 961 名样本<sup>[26]</sup>。本研究发现 *BDNF* 基因上的 3 个 SNPs rs7124442, rs11030121, rs2883187

图 3 11 个组织中 *BDNF* 基因表达与 rs16917237 基因型相关性Fig. 3 Association of *BDNF* gene expression and rs16917237 genotype from 11 tissues

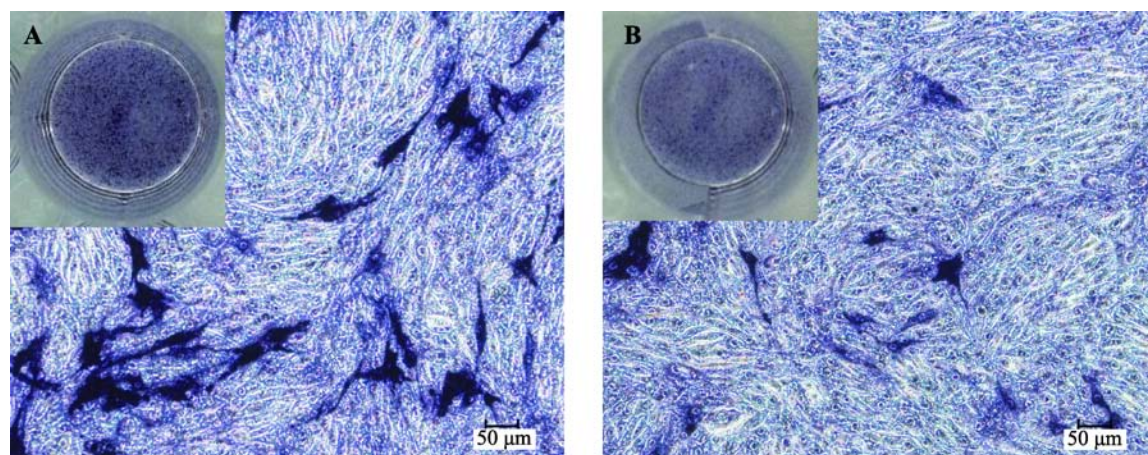
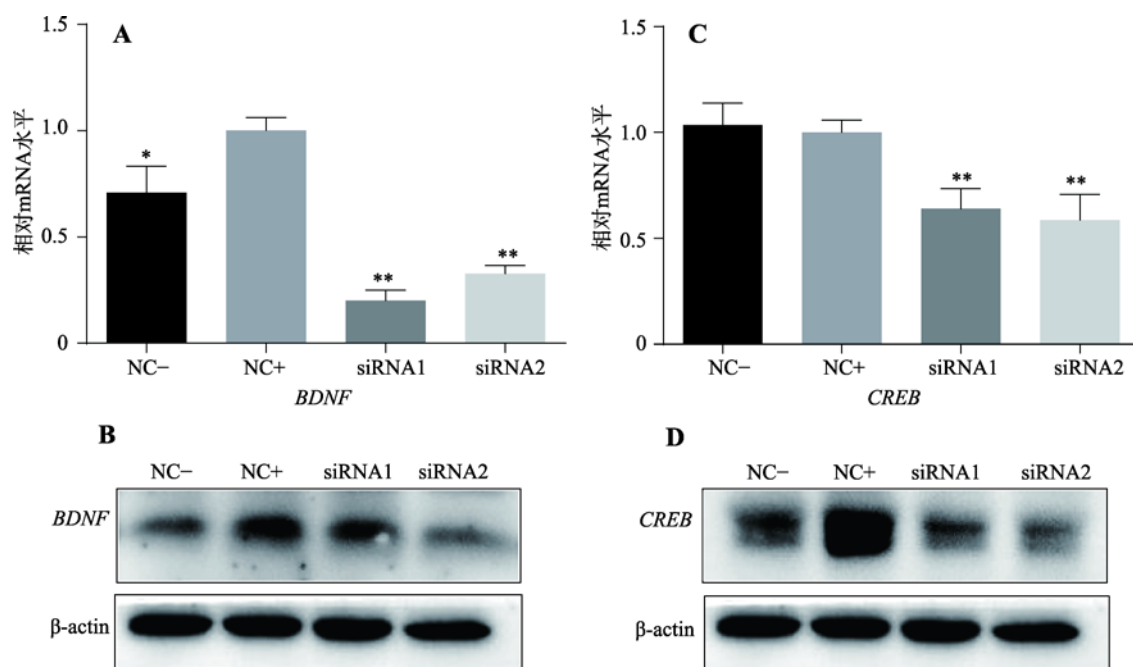


图 4 MC3T3-E1 细胞碱性磷酸酶染色

Fig. 4 ALP staining of MC3T3-E1 cells

A: rh-BMP2 诱导分化 48 h 组; B: MC3T3-E1 细胞正常培养组

图 5 *BDNF* 和 *CREB* 基因 mRNA 及蛋白表达水平Fig. 5 mRNA and protein levels of *BDNF* and *CREB* gene

A 和 B: 分别为 siRNA 转染组和阴性对照组 *BDNF* mRNA 和蛋白表达水平。“NC”为阴性对照,“-”为未添加 rhBMP-2 诱导,“+”为添加 rhBMP-2 诱导, siRNA 转染组均添加 rhBMP-2 诱导; \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$  相对于“NC+”; C 和 D: 分别为 siRNA 转染组和阴性对照组 *CREB* mRNA 和蛋白表达水平。 \*\* $P<0.01$  相对于“NC+”。

在 GEFOS 结果中与脊椎 BMD 表现出显著的关联性,  $P$  值分别为 rs7124442 ( $8.17 \times 10^{-4}$ ) rs11030121 ( $2.30 \times 10^{-3}$ ), rs2883187 ( $2.20 \times 10^{-2}$ ) 进一步验证了本研究的关联分析结果。

通过 ENCODE (<http://epigenomegateway.wustl.edu/>) 和 ANNOVAR (<http://annovar.openbioinformatics.org/en/latest/user-guide/startup/>) 对本研究中显著性最强的 SNP rs16917237 进行了功能注释, 发现该 SNP 在成骨细胞位于激活型组蛋白 H3K4me1、H3K4me3、H3K27ac 修饰及 P300 结合区域, 提示其可能位于成骨细胞特异性的调控元件中。本课题组前期研究发现在 MC3T3-E1 细胞中 *BDNF* 基因被

激活型组蛋白 H3K4me1、H3K4me3、H3K27ac 修饰及 P300 结合区域, 提示其可能位于成骨细胞特异性的调控元件中。本课题组前期研究发现在 MC3T3-E1 细胞中 *BDNF* 基因被



敲低后,能够影响成骨分化相关标记物的表达水平,影响成骨分化过程<sup>[27]</sup>。通路分析表明 *BDNF* 参与了成骨分化经典调控通路—MAPK 通路。后期构建小鼠前成骨细胞 MC3T3-E1 细胞系分化模型,发现 rh-BMP2 的诱导能够显著提高 *BDNF* 的 mRNA 和蛋白水平以及 *CREB* 基因蛋白表达,提示 rh-BMP2 对 *CREB* 表达是在转录后水平的调控。在分化细胞系中对 *BDNF* 基因进行干扰实验,发现 *CREB* 基因的 mRNA 和蛋白水平均显著降低,表明 *BDNF* 可能通过正调控 *CREB* 影响成骨细胞分化。同时,通过 GTE<sub>x</sub> 中 50 个样本量大于 10 的组织 *BDNF* 和 *CREB* 基因表达的数据进行共表达分析,本课题组还发现在 38 个组织中,*BDNF* 和 *CREB* 基因表达呈正相关关系,其中 22 个组织正相关关系有统计学意义( $P < 0.05$ , 结果见附件图 1),这一结果从侧面印证了我们猜想。

早期研究侧重于探讨 *BDNF* 基因上的 SNP 对于成骨分化的调控<sup>[17]</sup>或 *BDNF* 基因及其受体在成骨相关组织中的表达变化<sup>[16,28]</sup>,本研究直接在小鼠前成骨细胞分化模型中干扰 *BDNF* 基因表达,进而证实其对成骨细胞增殖分化相关通路 MAPK 中 *CREB* 的表达量产生显著影响。MAPK 是成骨分化调控的关键通路,*CREB* 位于 MAPK 通路中。研究表明 *CREB* 是成骨分化一个重要的调控因子,参与到许多的磷酸化信号通路中,*CREB* 基因高表达能够促进成骨早期标记物 *ALP* 的表达,PTH-*CREB* 通路可通过激活 *BMP-2* 转录进而调控成骨的分化过程<sup>[23,29]</sup>。Satot 等<sup>[30]</sup>研究发现 *CREB* 的抑制因子被诱导表达时,破骨前体细胞不分化为破骨细胞,CaMK-*CREB* 通路可调控破骨分化和破骨细胞功能。本文的研究证实 *BDNF* 基因可能通过调控 *CREB* 表达影响成小鼠前成骨细胞 MC3T3-E1 分化,验证了 *BDNF* 基因的功能性,提示 *BDNF* 基因是一个成骨细胞分化的调控因子,这对于骨质疏松症发病机理的阐释有着重要的意义。

*BDNF* 可选择性与其高亲和力受体 TrkB 或低亲和力受体 p75NTR 结合。Hutchison 等<sup>[31]</sup>进行的动物实验表明 TrkB 敲除小鼠表现出侏儒样表型和迟发性肥大性分化,且 Runx2 和 Sox9 这两种骨骼发育的关键性转录因子表达在敲除小鼠中大幅下降。当

*BDNF* 低亲和力受体 p75NTR 在小鼠前成骨细胞系 MC3T3-E1 中被过表达后,其增殖分化能力明显增强<sup>[32]</sup>。Asaumi 等<sup>[28]</sup>在小鼠肋骨骨折模型中通过免疫组化染色 *BDNF* 在成骨样细胞中表达,通过 RT-PCR 测定其 mRNA 水平,发现其 mRNA 在骨折后 8 天内持续增加。以上诸多证据均提示除了 *CREB*,*BDNF* 可能通过其亲和受体调控更多下游靶基因,进而调控骨发育与骨形成,具体的分子机制有待进一步研究。

本研究还对 *BDNF* 基因影响成骨分化的可能分子机制进行了探索。结果发现 *BDNF* 基因正调控成骨分化相关基因 *CREB*,提示 *BDNF* 基因可能通过 MAPK 通路调控成骨分化。然而 MAPK 通路中其他的相关蛋白的表达是否会受 *BDNF* 影响,仍有待进一步探索。同时,本研究侧重于探究 *BDNF* 基因对于成骨细胞分化的调控,对于破骨细胞的分化等生理指标是否会产生影响亦可作为下一步的探索方向。

#### 附录:

附图见文章电子版 [www.chinagene.cn](http://www.chinagene.cn)。

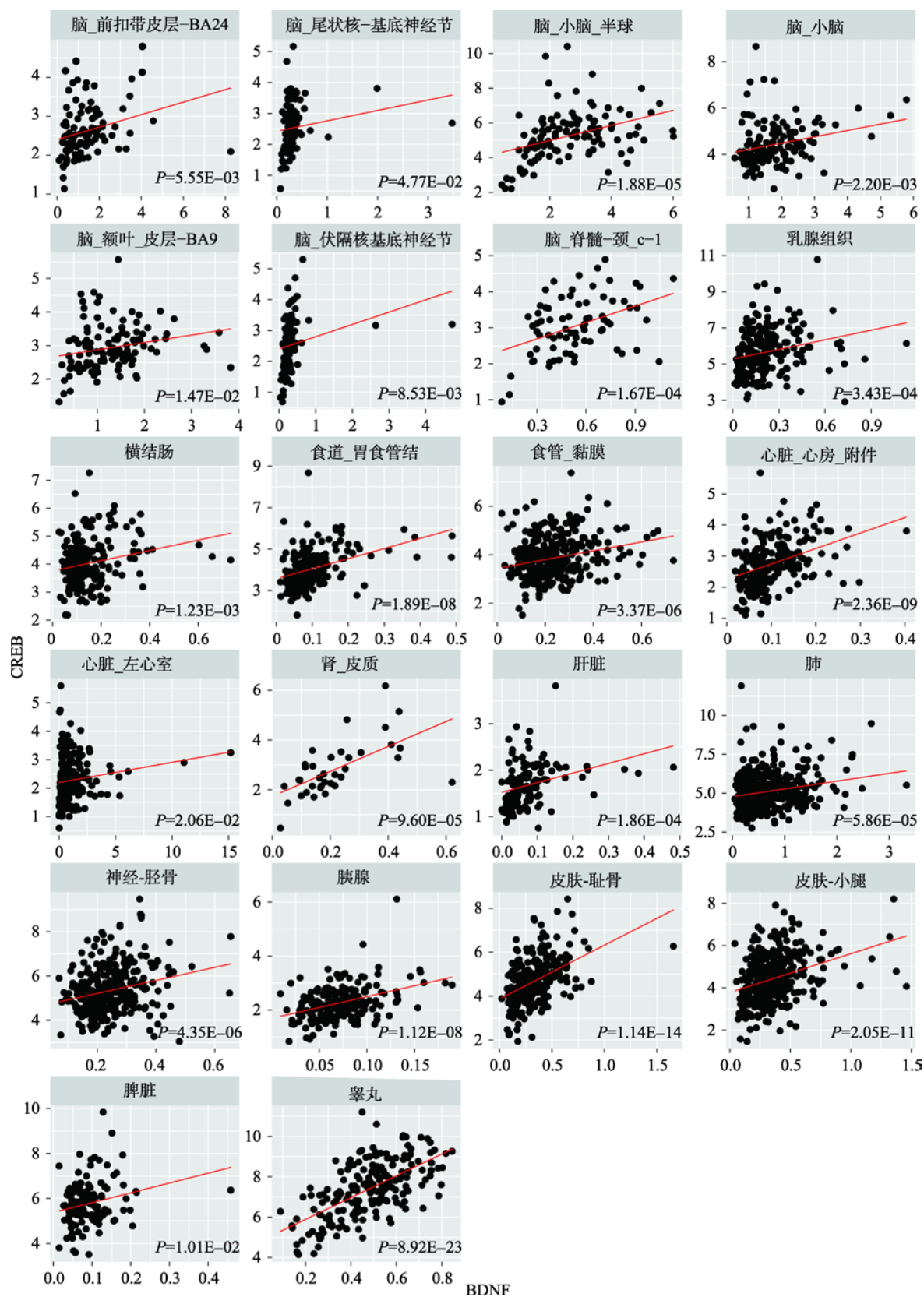
#### 参考文献(References):

- [1] Harvey NC, Matthews P, Collins R, Cooper C. Osteoporosis epidemiology in UK Biobank: a unique opportunity for international researchers. *Osteoporos Int*, 2013, 24(12): 2903–2905. [DOI]
- [2] Hadjidakis DJ, Androulakis II. Bone remodeling. *Ann NY Acad Sci*, 2006, 1092: 385–396. [DOI]
- [3] Peacock M, Turner CH, Econs MJ, Foroud T. Genetics of osteoporosis. *Endocr Rev*, 2002, 23(3): 303–326. [DOI]
- [4] Ralston SH, Uitterlinden AG. Genetics of osteoporosis. *Endocr Rev*, 2010, 31(5): 629–662. [DOI]
- [5] Livshits G, Deng HW, Nguyen TV, Yakovenko K, Recker RR, Eisman JA. Genetics of bone mineral density: evidence for a major pleiotropic effect from an intercontinental study. *J Bone Miner Res*, 2004, 19(6): 914–923. [DOI]
- [6] Xu XH, Dong SS, Guo Y, Yang TL, Lei SF, Papasian CJ, Zhao M, Deng HW. Molecular genetic studies of gene identification for osteoporosis: the 2009 update. *Endocr Rev*, 2010, 31(4): 447–505. [DOI]
- [7] Cardon LR, Bell JI. Association study designs for complex diseases. *Nat Rev Genet*, 2001, 2(2): 91–99. [DOI]
- [8] Geng L, Yao ZW, Luo JY, Han LL, Lu Q. Associ-

- ation between Val80 polymorphism of the *CYP19* gene, A163G polymorphism of the *OPG* gene and bone mineral density in post-menopausal Chinese women. *Hereditas (Beijing)*, 2007, 29(11): 1345–1350.
- 耿力, 姚珍薇, 骆建云, 韩力力, 卢起. 绝经后女性 *CYP19* 基因 Val80 及 *OPG* 基因 A163G 多态性与骨密度的相关性研究. *遗传*, 2007, 29(11): 1345–1350. [DOI]
- [9] Ghosh A, Carnahan J, Greenberg ME. Requirement for BDNF in activity-dependent survival of cortical neurons. *Science*, 1994, 263(5153): 1618–1623. [DOI]
- [10] Acheson A, Conover JC, Fandl JP, DeChiara TM, Russell M, Thadani A, Squinto SP, Yancopoulos GD, Lindsay RM. A BDNF autocrine loop in adult sensory neurons prevents cell death. *Nature*, 1995, 374(6521): 450–453. [DOI]
- [11] Yang YX, Chen YX, Wu JQ, Xing YM, Zeng FM, Huang YH, Cheng BW. Association study of *CNR1*, *GAD1* and *BDNF* polymorphisms with male heroin dependence in the Dai population in Yunnan. *Hereditas (Beijing)*, 2014, 36(9): 888–896.
- 杨亚鲜, 陈燕祥, 武健权, 邢豫明, 曾发明, 黄友浩, 程宝文. *CNR1*, *GAD1* 和 *BDNF* 基因多态性与云南傣族男性海洛因依赖的相关性分析. *遗传*, 2014, 36(9): 888–896. [DOI]
- [12] Yang ZF, Ho DW, Lam CT, Luk JM, Lum CT, Yu WC, Poon RT, Fan ST. Identification of brain-derived neurotrophic factor as a novel functional protein in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res*, 2005, 65(1): 219–225. [DOI]
- [13] Hu Y, Wang YD, Guo T, Wei WN, Sun CY, Zhang L, Huang J. Identification of brain-derived neurotrophic factor as a novel angiogenic protein in multiple myeloma. *Cancer Genet Cytogenet*, 2007, 178(1): 1–10. [DOI]
- [14] Sun CY, Chu ZB, She XM, Zhang L, Chen L, Ai LS, Hu Y. Brain-derived neurotrophic factor is a potential osteoclast stimulating factor in multiple myeloma. *Int J Cancer*, 2012, 130(4): 827–836. [DOI]
- [15] Hutchison MR. BDNF alters ERK/p38 MAPK activity ratios to promote differentiation in growth plate chondrocytes. *Mol Endocrinol*, 2012, 26(8): 1406–1416. [DOI]
- [16] Yamashiro T, Fukunaga T, Yamashita K, Kobashi N, Takano-Yamamoto T. Gene and protein expression of brain-derived neurotrophic factor and TrkB in bone and cartilage. *Bone*, 2001, 28(4): 404–409. [DOI]
- [17] Deng FY, Tan LJ, Shen H, Liu YJ, Liu YZ, Li J, Zhu XZ, Chen XD, Tian Q, Zhao M, Deng HW. SNP rs6265 regulates protein phosphorylation and osteoblast differentiation and influences BMD in humans. *J Bone Miner Res*, 2013, 28(12): 2498–2507. [DOI]
- [18] Deng HW, Shen H, Xu FH, Deng HY, Conway T, Zhang HT, Recker RR. Tests of linkage and/or association of genes for vitamin D receptor, osteocalcin, and parathyroid hormone with bone mineral density. *J Bone Miner Res*, 2002, 17(4): 678–686. [DOI]
- [19] Guo Y, Tan LJ, Lei SF, Yang TL, Chen XD, Zhang F, Chen Y, Pan F, Yan H, Liu XG, Tian Q, Zhang ZX, Zhou Q, Qiu C, Dong SS, Xu XH, Guo YF, Zhu XZ, Liu SL, Wang XL, Li X, Luo Y, Zhang LS, Li M, Wang JT, Wen T, Drees B, Hamilton J, Papasian CJ, Recker RR, Song XP, Cheng J, Deng HW. Genome-wide association study identifies *ALDH7A1* as a novel susceptibility gene for osteoporosis. *PLoS Genet*, 2010, 6(1): e1000806. [DOI]
- [20] Zhu DL, Guo Y, Zhang Y, Dong SS, Xu W, Hao RH, Chen XF, Yan H, Yang SY, Yang TL. A functional SNP regulated by miR-196a-3p in the 3'UTR of *FGF2* is associated with bone mineral density in the Chinese population. *Hum Mutat*, 2017, 38(6): 725–735. [DOI]
- [21] Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, Thomas L, Ferreira MAR, Bender D, Maller J, Sklar P, De Bakker PIW, Daly MJ, Sham PC. PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am J Hum Genet*, 2007, 81(3): 559–575. [DOI]
- [22] Chen GQ, Deng CX, Li YP. TGF- $\beta$  and BMP signaling in osteoblast differentiation and bone formation. *Int J Biol Sci*, 2012, 8(2): 272–288. [DOI]
- [23] Zhang RR, Edwards JR, Ko SY, Dong SS, Liu HB, Oyajobi BO, Papasian C, Deng HW, Zhao M. Transcriptional regulation of BMP2 expression by the PTH-CREB signaling pathway in osteoblasts. *PLoS One*, 2011, 6(6): e20780. [DOI]
- [24] Barroso I, Luan JA, Middelberg RPS, Harding AH, Franks PW, Jakes RW, Clayton D, Schafer AJ, O'Rahilly S, Wareham NJ. Candidate gene association study in type 2 diabetes indicates a role for genes involved in  $\beta$ -cell function as well as insulin action. *PLoS Biol*, 2003, 1(1): E20. [DOI]
- [25] Tabor HK, Risch NJ, Myers RM. Candidate-gene approaches for studying complex genetic traits: practical considerations. *Nat Rev Genet*, 2002, 3(5): 391–397. [DOI]
- [26] Estrada K, Styrkarsdottir U, Evangelou E, Hsu YH, Duncan EL, Ntzani EE, Oei L, Albagha OM, Amin N, Kemp JP, Koller DL, Li G, Liu CT, Minster RL, Moayyeri A, Vandenput L, Willner D, Xiao SM, Yerges-Armstrong LM, Zheng HF, Alonso N, Eriksson J, Kammerer CM, Kaptoge SK, Leo PJ, Thorleifsson G, Wilson SG, Wilson JF, Aalto

- V, Alen M, Aragaki AK, Aspelund T, Center JR, Dailiana Z, Duggan DJ, Garcia M, Garcia-Giralt N, Giroux S, Hallmans G, Hocking LJ, Husted LB, Jameson KA, Khushainova R, Kim GS, Kooperberg C, Koromila T, Kruk M, Laaksonen M, Lacroix AZ, Lee SH, Leung PC, Lewis JR, Masi L, Mencej-Bedrac S, Nguyen TV, Nogues X, Patel MS, Prezelj J, Rose LM, Scollen S, Siggeirsdottir K, Smith AV, Svensson O, Trompet S, Trummer O, Van Schoor NM, Woo J, Zhu K, Balcells S, Brandi ML, Buckley BM, Cheng S, Christiansen C, Cooper C, Dedoussis G, Ford I, Frost M, Goltzman D, González-Macías J, Kähönen M, Karlsson M, Khusnutdinova E, Koh JM, Kollia P, Langdahl BL, Leslie WD, Lips P, Ljunggren Ö, Lorenc RS, Marc J, Mellström D, Obermayer-Pietsch B, Olmos JM, Pettersson-Kymmer U, Reid DM, Riancho JA, Ridker PM, Rousseau F, Slagboom PE, Tang NL, Urreizti R, Van Hul W, Viikari J, Zarrabeitia MT, Aulchenko YS, Castano-Betancourt M, Grundberg E, Herrera L, Ingvarsson T, Johannsdottir H, Kwan T, Li R, Luben R, Medina-Gómez C, Palsson ST, Reppe S, Rotter JJ, Sigurdsson G, Van Meurs JB, Verlaan D, Williams FM, Wood AR, Zhou Y, Gautvik KM, Pastinen T, Raychaudhuri S, Cauley JA, Chasman DI, Clark GR, Cummings SR, Danoy P, Dennison EM, Eastell R, Eisman JA, Gudnason V, Hoffman A, Jackson RD, Jones G, Jukema JW, Khaw KT, Lehtimäki T, Liu Y, Lorentzon M, McCloskey E, Mitchell BD, Nandakumar K, Nicholson GC, Oostra BA, Peacock M, Pols HA, Prince RL, Raitakari O, Reid IR, Robbins J, Sambrook PN, Sham PC, Shuldiner AR, Tyllavsky FA, Van Duijn CM, Wareham NJ, Cupples LA, Econs MJ, Evans DM, Harris TB, Kung AW, Psaty BM, Reeve J, Spector TD, Streeten EA, Zillikens MC, Thorsteinsdottir U, Ohlsson C, Karasik D, Richards JB, Brown MA, Stefansson K, Uitterlinden AG, Ralston SH, Ioannidis JP, Kiel DP, Rivadeneira F. Genome-wide meta-analysis identifies 56 bone mineral density loci and reveals 14 loci associated with risk of fracture. *Nat Genet*, 2012, 44(5): 491–501. [DOI]
- [27] Guo Y, Dong SS, Chen XF, Jing YA, Yang M, Yan H, Shen H, Chen XD, Tan LJ, Tian Q, Deng HW, Yang TL. Integrating epigenomic elements and GWASs identifies *BDNF* gene affecting bone mineral density and osteoporotic fracture risk. *Sci Rep*, 2016, 6: 30558. [DOI]
- [28] Asaumi K, Nakanishi T, Asahara H, Inoue H, Takigawa M. Expression of neurotrophins and their receptors (TRK) during fracture healing. *Bone*, 2000, 26(6): 625–633. [DOI]
- [29] Ge J, Zhang Y, Zheng ZZ, Huang YW, Song HS. Research progress on CREB and the signal transduction pathways of its phosphorylation. *J Anhui Agri Sci*, 2010, 38(30): 16769–16771, 16774. 葛军, 张玉, 郑增长, 黄延旺, 宋红生. CREB 转录因子及其磷酸化信号通路的研究进展. 安徽农业科学, 2010, 38(30): 16769–16771, 16774. [DOI]
- [30] Sato K, Suematsu A, Nakashima T, Takemoto-Kimura S, Aoki K, Morishita Y, Asahara H, Ohya K, Yamaguchi A, Takai T, Kodama T, Chatila TA, Bito H, Takayanagi H. Regulation of osteoclast differentiation and function by the CaMK-CREB pathway. *Nat Med*, 2006, 12(12): 1410–1416. [DOI]
- [31] Hutchison MR. Mice with a conditional deletion of the neurotrophin receptor TrkB are dwarfed, and are similar to mice with a MAPK14 deletion, *PLoS One*, 2013, 8(6): e66206. [DOI]
- [32] Mikami Y, Suzuki S, Ishii Y, Watanabe N, Takahashi T, Isokawa K, Honda MJ. The p75 neurotrophin receptor regulates MC3T3-E1 osteoblastic differentiation. *Differentiation*, 2012, 84(5): 392–399. [DOI]

(责任编辑: 周钢桥)



附图 1

Fig. S1