

骨质疏松易感 SNP rs4325274 通过增强子远程调控 SOX6 基因的功能机制研究

妥晓梅¹, 朱东丽^{1,2}, 陈晓峰¹, 荣誉¹, 郭燕¹, 杨铁林^{1,2}

1. 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, 生物医学信息与基因组学中心, 西安 710049

2. 浙江西安交通大学研究院, 杭州 311215

摘要:骨质疏松症是一种典型的多基因复杂疾病, 遗传力高达 85%, 其发病率已跃居常见疾病的第 5 位。尽管已经鉴定出大量骨质疏松易感 SNP, 但大多数 SNP 位点位于基因组非编码区, 且功能机制未知。本研究旨在通过生物信息学分析和功能实验探究骨质疏松非编码功能性易感 SNP rs4325274 的分子调控机制。首先, 通过表观注释发现该 SNP 所在区域处在增强子上, eQTL 和 Hi-C 分析结果发现 SNP 调控的潜在靶基因是 SOX6; 然后, 利用多种数据库进行 Motif 预测, 并结合 GEO 数据库中的 ChIP-seq 数据分析进行了验证, 结果发现转录因子 HNF1A 更倾向于结合 SNP rs4325274-G 碱基; 进一步通过双荧光素酶报告基因实验验证了该 SNP 对 SOX6 基因表达的增强作用; 最后, 利用 shRNA 敲低转录因子 HNF1A 实验, 检测靶基因 SOX6 的表达变化。以上研究结果初步解析了非编码区功能性 SNPs rs4325274 作为增强子远程调控 SOX6 基因表达的分子机制, 为复杂疾病非编码易感 SNP 的遗传调控研究提供新思路。

关键词: SNP rs4325274; SOX6 基因; 转录因子; 骨质疏松症发生机制

The osteoporosis susceptible SNP rs4325274 remotely regulates the SOX6 gene through enhancers

Xiaomei Tuo¹, Dongli Zhu^{1,2}, Xiaofeng Chen¹, Yu Rong¹, Yan Guo¹, Tielin Yang^{1,2}

1. Biomedical Informatics & Genomics Center, Key Laboratory of Biomedical Information Engineering of Ministry of Education,

School of Life Science and Technology, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710049

2. Research Institute of Zhejiang Xi'an Jiaotong University, Hangzhou 311215

Abstract: Osteoporosis is a typical polygenic disease, and its heritability is as high as 85%. The incidence of osteoporosis has jumped to the fifth among the common diseases. Although a large number of osteoporosis-susceptible SNPs have been identified, most of them are in the non-coding regions of the genome and the functional mechanisms are

收稿日期: 2020-05-26; 修回日期: 2020-09-04

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(编号: 31771399, 31970569), 中国博士后基金项目(编号: 2019M650261), 陕西省自然科学基金基础研究计划项目(编号: 2020JQ-026)和浙江省自然科学基金(编号: GF18C060003)资助[Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 31771399, 31970569), China Postdoctoral Science Foundation (No. 2019M650261), Natural Science Basic Research Plan in Shaanxi Province of China (No. 2020JQ-026), and the Zhejiang Provincial Natural Science Foundation of China (No. GF18C060003)]

作者简介: 妥晓梅, 在读硕士研究生, 专业方向: 疾病分子遗传机制的基础研究。E-mail: xmt18392079044@stu.xjtu.edu.cn

通讯作者: 杨铁林, 博士, 教授, 研究方向: 生物信息分析及复杂疾病遗传致病机制研究。E-mail: yangtielin@xjtu.edu.cn

DOI: 10.16288/j.yczz.20-098

网络出版时间: 2020/9/10 7:21:15

URI: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1913.r.20200908.1130.004.html>

unknown. The purpose of this study was to explore the function of non-coding osteoporosis-susceptible SNP rs4325274 and dissect the molecular regulatory mechanisms through integrating bioinformatics analysis and functional experiments. Firstly, we found the SNP rs4325274 resided in a putative enhancer element through functional annotation. eQTL and Hi-C analysis found that the *SOX6* gene might be a potential distal target of rs4325274. We conducted the motif prediction using multiple databases and verified the result using ChIP-seq data from GEO database. The result showed that the transcription factor *HNF1A* could preferentially bind to SNP rs4325274-G allele. We further demonstrated that SNP rs4325274 acted as an enhancer regulating *SOX6* gene expression by using dual-luciferase reporter assays. Knockdown of *HNF1A* decreased the *SOX6* gene expression. Taken together, our results uncovered a new mechanism of a non-coding functional SNP rs4325274 as a distal enhancer to modulate *SOX6* expression, which provides new insights into deciphering molecular regulatory mechanisms underlying non-coding susceptibility SNPs on complex diseases.

Keywords: SNP rs4325274; *SOX6* gene; transcription factor; mechanism of osteoporosis

骨质疏松症是一种世界范围内流行的全身性骨代谢性疾病,以骨量减少和骨组织微结构损坏为特征^[1]。由于其高发病率、高死亡率以及高医疗花费^[2-4],骨质疏松症已成为当前亟需解决的公共健康问题之一。但至今骨质疏松症的遗传发病机制仍不清楚。因此,开展骨质疏松症的基础研究,深入探索其分子致病机制,对骨质疏松症的预防和临床治疗有着重要意义。

SOX6 (SRY-box transcription factor 6) 基因是 SRY 相关转录因子 D 亚家族的成员,在软骨细胞分化、软骨形成和软骨内骨形成中起着非常重要的调控作用^[5,6]。当 *SOX6* 和 *SOX5* 基因同时缺失时,小鼠胚胎会发展成严重的泛发性软骨发育不良,在胚胎发育 16.5 天左右死亡^[5]。另外, *SOX6* 和 *SOX5* 协同 *SOX9* 基因调节软骨中 II 型胶原(*COL2A1*)的表达来控制软骨的重塑,在治疗骨关节炎中软骨退变和软骨损伤修复中具有重要的临床应用价值^[7,8]。本课题组前期研究发现 *SOX6* 基因参与了软骨形成和成骨的耦合调控作用^[9],这提示 *SOX6* 基因可能在骨质疏松发生过程起着非常重要的作用。

骨质疏松症的临床诊断和评估主要以骨密度(bone mineral density, BMD)为依据^[10],其遗传力高达 0.6~0.8^[11]。目前,国际上已有多项全基因组关联研究(genome-wide association study, GWAS)发现位于染色体 11p15 区的 *SOX6* 基因内部及上下游区的多个 SNPs 位点与股骨颈、腰椎和手腕骨密度等骨质疏松症表型显著关联^[12-15]。但对于这些风险 SNPs 在骨质疏松症发生过程中的功能及作用机制至今尚

不清楚。本课题组前期从骨质疏松症遗传因素联合会(genetic factors for osteoporosis consortium, GEFOS)下载和整理了所有与骨质疏松症相关表型的所有 GWAS 数据,通过精细定位分析,筛选到 *SOX6* 基因上游区域中一个潜在的骨质疏松症易感 causal SNP rs4325274 位点,已有研究报道了该 SNP 位点与足跟部骨密度^[16]和全身骨密度^[17]表现出显著的关联性, P 值分别为 1.60×10^{-42} 和 1.73×10^{-13} ,但该 SNP 潜在的功能机制有待进一步研究。本研究将结合生物信息学分析以及功能实验,探究骨质疏松症易感 SNP rs4325274 调控 *SOX6* 基因表达的分子机制,以期为进一步解析骨质疏松症的发生机制提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

成骨细胞来源的 U2OS 细胞,用含有 10% 胎牛血清,100 U/mL 的青霉素和 100 μ g/mL 的链霉素的 RPMI-1640 培养基在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 的细胞培养箱中培养。

1.2 主要试剂

菌株感受态细胞 *E.coli* DH5 α 购自北京天根生化技术有限公司;双荧光素酶报告基因载体 PGL-3 Basic、内参海肾载体 phRL 和 ViaFect 转染试剂均购自美国 Promega 公司;定点突变试剂盒购自北京天

恩泽技术有限公司; 限制性内切酶, DNA ligation Mix, Ex *Taq* DNA 聚合酶均购自日本 TaKaRa 公司; 胶纯化回收试剂盒购自上海 GENEray 公司; 血液/组织/细胞基因组 DNA 提取试剂盒, 无内毒素质粒小量中提提取试剂盒均购自北京天根生化技术有限公司。

1.3 表观功能注释

利用 ANNOVAR 软件注释 causal SNP rs4325274 的基因组位置, 利用 WashU Epigenome Brower (<http://epigenomegateway.wustl.edu/>)在线网站, 选取成骨细胞及 GM12878 的表观调控数据, 包括各类激活型组蛋白修饰如 H3K4me1、H3K4me3、H3K27ac、P300 以及 DNase I 超敏感位点等, 对 SNP rs4325274 所在区域进行功能注释。

1.4 顺式表达数量性状(expression quantitative trait locus, eQTL)分析

利用福明翰心脏研究(Framingham Heart Study, FHS)中的全血 eQTL 数据(ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/eql/original_submissions/FHS_eQTL/)进行 eQTL 分析。

1.5 高通量染色质互作(high-throughput chromatin interaction analysis, Hi-C)分析

结合本实验室测得成骨细胞的 Hi-C 数据、

ChIP-seq 测序数据(doi: <https://doi.org/10.1101/2020.05.25.114272>), 利用实验室搭建的分析平台进行了 Hi-C 分析, 以期得到与 SNP rs4325274 所在区域显著互作的成环片段。

1.6 双荧光素酶报告基因实验

1.6.1 野生型和突变型两种荧光素酶重组载体构建

构建含 *SOX6* 启动子片段的 PGL3 荧光素酶报告载体, 正确载体命名为 *SOX6* promoter-Luc⁺。然后, 构建含 SNP rs4325274 片段的 *SOX6* promoter-Luc⁺ 重组载体。NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)比对结果显示 SNP 位点为 C 碱基, 故将构建好的重组载体命名为 rs4325274-C-*SOX6* promoter-Luc⁺, 在此基础上利用定点突变试剂盒进行 C→G 定点突变。首先, 在 CE Design V1.03 网站上设计 SNP rs4325274 定点突变引物, 然后根据基因定点突变试剂盒(D0206)操作说明书进行定点突变反应, 正确载体命名为 rs4325274-G-*SOX6* promoter-Luc⁺。相关引物序列见表 1。

1.6.2 报告基因载体的转染及荧光素酶活性检测

分别将构建好的 *SOX6* promoter-Luc⁺、rs4325274-C-*SOX6* promoter-Luc⁺和 rs4325274-G-*SOX6* promoter-Luc⁺荧光素酶报告基因载体与内参海肾质粒(phRL)

表 1 实验所用引物序列

Table 1 Primer sequences used in the experiment

引物名称	引物序列(5'→3')
SOX6 启动子扩增引物	上游: <u>CCCAAGCTT</u> ATGGTGCCGATAGACTTGCC(<i>Hind</i> III)
	下游: CCGCTCGAGCATCTTATGGGTTCCACGCCT(<i>Xho</i> I)
SNP 扩增引物	上游: CGACGCGTAGAAGAGAAACGAGGTGTTGGT(<i>Mlu</i> I)
	下游: CCGCTCGAGACAAGTTAGTGGGACAGGGTT(<i>Xho</i> I)
SNP 突变引物	上游: GGGATCCTGCTTACTTACTATCTTTGGTCTTAACTAGACC
	下游: TAAGTAAGCAGGATCCCGATATCAAGTACCAGG
SNP 分型引物	上游: AAGAGAAACGAGGTGTTGGTGAT
	下游: GGTATCTTCCGTGCAGTTTGG
SOX6qRT-PCR 引物	上游: AGAACGCGCTTTGAGAATTT
	下游: GCCCAGTTTCCATCTTCAT
HNF1AqRT-PCR 引物 ^[18]	上游: CCCCAGATTCAGGATCAGACA
	下游: CCATCATGTTCCATTTTCGC

CCCAAGCTT、CCGCTCGAG 和 CGACGCGT 下划线分别表示 *Hind* III、*Xho* I 和 *Mlu* I 酶切位点。

共转染至成骨系细胞 U2OS 中, 根据 Dual Luciferase Reporter Assay System 操作说明书, 利用化学发光仪检测 rs4325274 两种碱基型增强子对 *SOX6* 基因启动子的调控活性, 以确定其是否对 *SOX6* 基因有增强子作用。

1.7 Motif 预测分析

从 meme suite 网站(http://meme-suite.org/doc/meme.html?man_type=web)下载整理最新的人类转录因子 Motif 数据库, 包括 JASPAR 2018、HO-COMOCOv11、SwissRegulon 和 TRANSFAC 四个权威数据库的数据进行 Motif 预测, 分析能够与增强子上目标 SNP rs4325274 结合的转录因子, 以及 SNP rs4325274 不同碱基型的改变是否会影响转录因子的结合情况。利用 GEO 数据库里的 ChIP-seq 数据集分析在 SNP rs4325274 位点处是否有转录因子 *HNF1A* 的结合信号。

1.8 转录因子 shRNA 敲低实验

首先在 U2OS 细胞中, 对 SNP rs4325274 进行了分型, 利用血液/组织/细胞基因组 DNA 提取试剂盒提取 U2OS 细胞的基因组 DNA 作为模板进行 PCR 扩增, 将得到的 PCR 产物送北京擎科生物科技有限公司进行测序检测 SNP 基因型。

本研究选取文献^[19]已报道的 *HNF1A*-shRNA 寡核苷酸序列为 shRNA 序列: *HNF1A*-shRNA1: 5'-GGCAGAAGAACCTAGCAA-3', *HNF1A*-shRNA2: 5'-GGTCTTCACCTCAGACACT-3', sh-NC: 5'-GTT-

CTCCGAACGTGTCACGT-3', 构建到 miR-30 骨架上, 经 *Xho* I 和 *Eco*R I 双酶切克隆到 pcDNA3.1 表达载体上, 酶切及测序鉴定验证, 即构建好 sh-*HNF1A*-1, sh-*HNF1A*-2 和 sh-NC (空白对照) 表达质粒。然后用 ViaFect 转染试剂分别转染 U2OS 细胞。转染 48h 后, 提取细胞总 RNA, 反转录, 用实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)检测 *HNF1A* 的敲低情况及 *SOX6* 基因 mRNA 水平的表达情况。qRT-PCR 检测引物序列见表 1。

2 结果与分析

2.1 表观注释提示 SNP rs4325274 处于成骨细胞相关增强子上

利用 ENCODE 数据库里的成骨细胞及 GM12878 的 ChIP-seq 数据对筛选出的 SNP rs4325274 所在区域进行表观注释, 利用 WashU 可视化工具作图, 发现 SNP rs4325274 周围富集了多个具有较强的激活型组蛋白标记, 如 H3K4me1、H3K4me3、H3K27ac, 以及转录激活因子 P300 和 DNase I 超敏感位点 (DHS) (图 1), 提示 SNP rs4325274 处于增强子元件内, 初步推断该 SNP 所在区域可能是一个增强子。

2.2 eQTL 和 Hi-C 分析发现易感 SNP rs4325274 作用的靶基因可能是 *SOX6* 基因

研究发现, 基因组可折叠成环使得直线物理位置较远的增强子和靶基因的启动子在三维结构上接

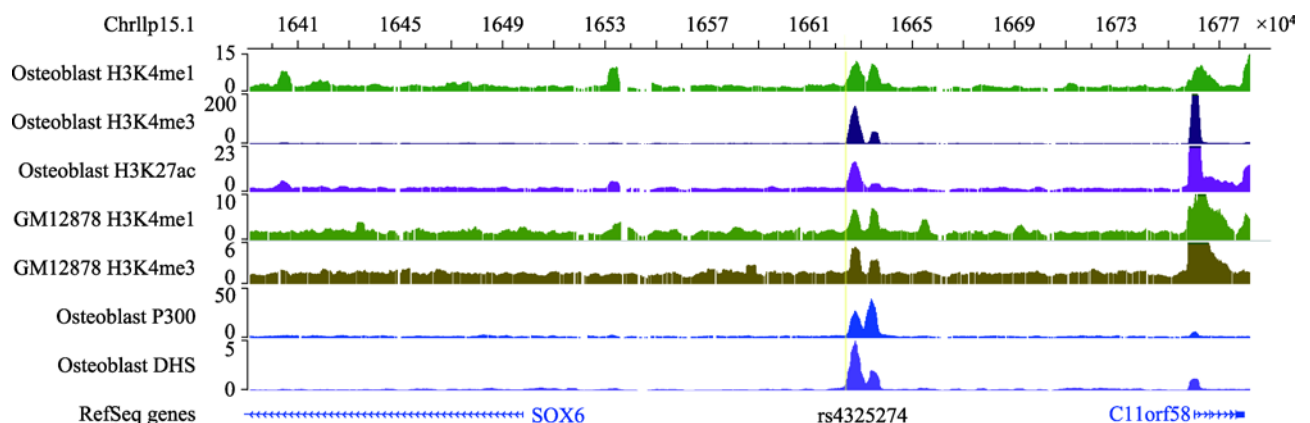


图 1 SNP rs4325274 组蛋白注释结果(采用 Wash U 基因组浏览器可视化)

Fig. 1 SNP rs4325274 histone annotation results (visualized using Wash U Genome browser)

近, 进而发挥调控作用^[20,21]。为了证明易感 SNP rs4325274 与靶基因之间的关系, 利用 FHS 中 5257 个人的全血 eQTL 数据进行了 eQTL 分析, 结果发现 SNP rs4325274 ($P = 2.06 \times 10^{-12}$) 与 *SOX6* 基因之间的关系较显著。利用本课题组前期对成骨细胞高分辨率的 Hi-C 测序数据及搭建好的 Hi-C 分析流程, 数据分辨率为 2 kb, 发现非编码区 SNP rs4325274 与 *SOX6* 基因存在远程互作(图 2)。

eQTL 分析和 Hi-C 分析结果表明, 易感 SNP rs4325274 所调控的靶基因可能是 *SOX6* 基因。

2.3 rs4325274 对 *SOX6* 基因表达具有增强子调控活性

分别将包含 rs4325274(C/G)不同等位基因的片段(约 0.8 kb)及 *SOX6* 基因启动子区片段(约 1.2 kb)克隆到荧光素酶报告基因载体(PGL3-Basic)上, 与内参海肾质粒(phRL)共转染至 U2OS 细胞中, 检测其荧光素酶活性。结果发现, 相比只含 *SOX6* 基因启动子的载体, 含 SNP 不同等位基因的重组载体表达活性显著增强, 且含有 G 碱基的载体表达活性相比 C 碱基的载体表达活性显著增强(图 3), 这进一步证

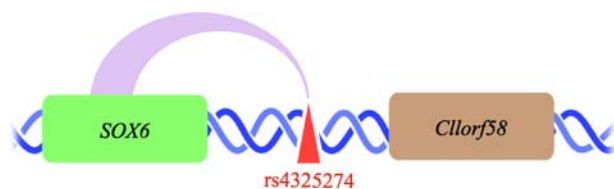


图 2 Hi-C 数据分析结果示意图

Fig. 2 Schematic diagram of the results of Hi-C data analysis

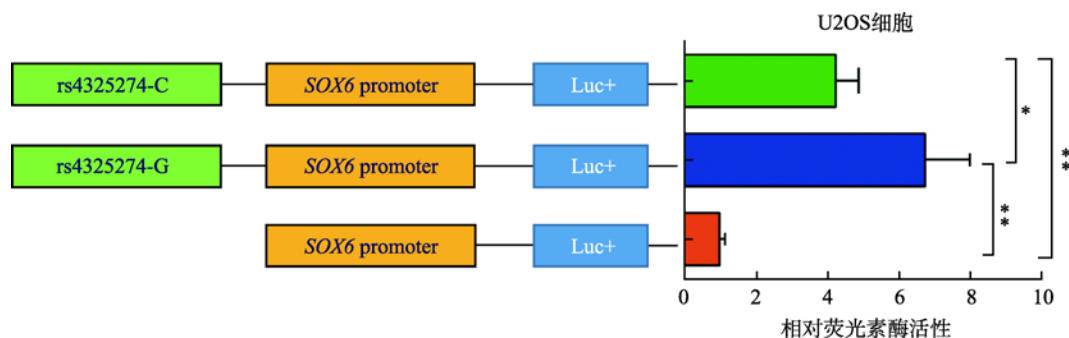


图 3 双荧光素酶报告基因活性检测 rs4325274 的增强子活性结果

Fig. 3 Enhancer activity of rs4325274 detected by dual-luciferase reporter gene activity assays

数据为均值 ± 标准差; *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$ 。

实了 SNP rs4325274 所在的片段是作为一个增强子来调控 *SOX6* 基因表达, 而且不同等位基因调控活性有差异, 其中 G 等位基因的调控活性更高。

2.4 Motif 预测发现 rs4325274 结合转录因子 *HNF1A*

根据 JASPAR 2018、HOCOMOCOv11、Swiss-Regulon 和 TRANSFAC 四个权威数据库对 SNP rs4325274 (G/C)序列进行转录因子预测, 结果同时在 SwissRegulon 和 TRANSFAC 数据库中发现 SNP rs4325274 都结合转录因子 *HNF1A*, 而且转录因子 *HNF1A* 更倾向于结合 rs4325274-G 等位基因(图 4)。因此, 推测 SNP rs4325274 通过不同基因型结合转

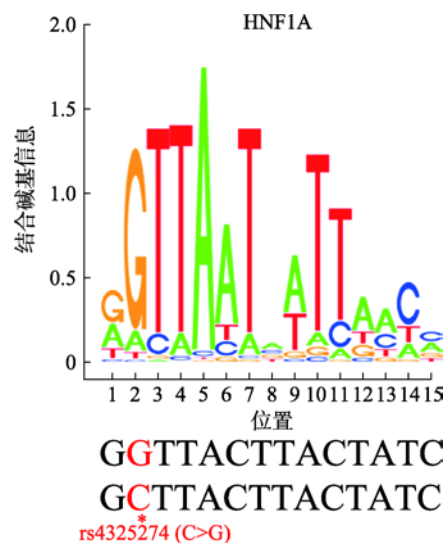


图 4 转录因子 *HNF1A* 结合 DNA 序列和 SNP 位置

Fig. 4 Transcription factor *HNF1A* binding motif and SNP location

*: SNP rs4325274 位点。

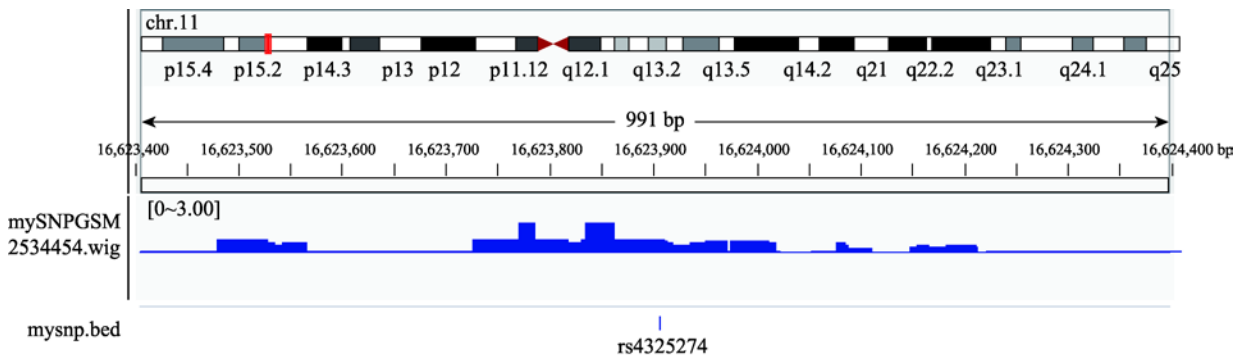


图 5 ChIP-seq 数据分析结果(采用 IGV 工具可视化)

Fig. 5 ChIP-seq data analysis results (visualized using IGV tool)

录因子的活性对增强子具有潜在的激活作用。

为了验证 rs4325274 可能与转录因子 *HNF1A* 结合, 从 GEO 数据库中获得转录因子 *HNF1A* 的 ChIP-seq 数据(NO: GSM2534454), 利用 IGV (Integrative Genomics Viewer)工具可视化作图, 发现 rs4325274 位于 ChIP 信号富集区(图 5), 这一结果进一步说明了 rs4325274 可能会结合转录因子 *HNF1A*。

2.5 *HNF1A* 敲低后 *SOX6* 表达降低

对 SNP rs4325274 在 U2OS 细胞中进行了分型, 分型结果显示 rs4325274 在 U2OS 细胞中是杂合型 (G/C)(图 6), 确保了后续敲低实验的进行。

为进一步探究 SNPrs4325274 是否通过影响转录因子结合机制调控靶基因 *SOX6* 的表达, 本研究构建了 *HNF1A*-shRNA 敲低载体, 转染至 U2OS 细胞, 利用 qRT-PCR 检测 *SOX6* 基因的表达情况。结

果表明, 与阴性对照 shRNA 转染细胞相比, 在转录因子 *HNF1A* 敲低的 U2OS 细胞中, *SOX6* 基因的表达显著降低(图 7)。这一结果提示 *HNF1A* 可能是 SNP rs4325274 调控机制中的潜在调节因子, 通过目标 SNP-转录因子-靶基因的调控机制, 进而导致疾病的发生。转录因子 *HNF1A* 与 SNP rs4325274 等位基因的特异性结合需进一步实验去验证。

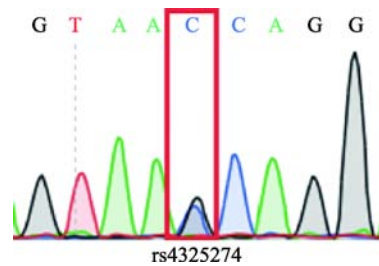


图 6 rs4325274 在 U2OS 细胞中的分型结果

Fig. 6 Genotyping results of rs4325274 in U2OS cells

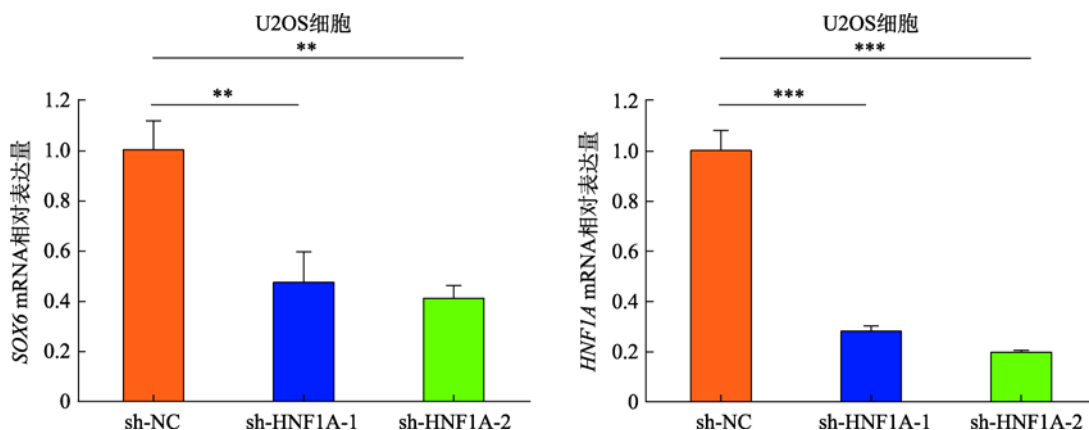


图 7 在 U2OS 细胞中敲低 *HNF1A* 对 *SOX6* 表达的影响

Fig. 7 Effects of *HNF1A* knockdown on *SOX6* expression in U2OS cells

数据为均值 \pm 标准差; ***: $P < 0.001$; **: $P < 0.01$ 。

3 讨论

骨质疏松症是一种受多基因调控的复杂疾病^[11], 其遗传力高达 85%^[22]。随着基因组技术的发展, 大规模 GWAS 的开展, 已经成功鉴定了大量与骨质疏松症骨密度相关联的易感变异位点。目前, 破译这些易感位点影响疾病发生的功能机制, 进而为临床转化提供潜在治疗靶点, 是后 GWAS 时代的研究热点和难点^[23]。

近年来, 随着 ENCODE^[24,25]和 Roadmap^[26]计划结果的陆续公布, 提供了大量人类基因组上的各种表观调控信息, 这为解析非编码区疾病位点的功能提供了新的契机。本研究利用 ENCODE 数据对骨质疏松易感 SNP rs4325274 进行表观注释, 发现 SNP rs4325274 位于增强子区域。为进一步证明易感 SNP rs4325274 与靶基因之间的关系, 利用 eQTL 分析和 Hi-C 分析发现易感 SNP rs4325274 所调控的靶基因可能是 *SOX6* 基因。在此基础上通过功能实验证实该 SNP 确实对 *SOX6* 基因表达有增强子调控活性, 并发现 rs4325274-G 等位基因表达活性比 rs4325274-C 等位基因显著增强。

研究表明, SNP 影响疾病易感性的机制之一就是影响转录因子与 DNA 的结合调控基因表达^[27], 在骨质疏松症发生机制中已有相关研究报道。Xiao 等^[28]研究证明转录因子 *CDX1* 特异性结合 rs9547970 的主等位基因 A 而非等位基因 G, 通过该机制调控 *POSTN* 基因的转录活性, 从而影响骨形成。MPP7 基因上的 rs4317882 与骨密度关联, 该研究者^[29]同时又证实了转录因子 *GATA2* 可特异性结合 MPP7 rs4317882 的风险等位基因 A 而非等位基因 G。本课题组前期在解析骨质疏松症热点区域 13q14.11 中易感 SNP 位点的机制时, 证明 rs9533090-C 等位基因可以大量招募激活型转录因子 *NFIC*, 提高其增强子活性, 从而增强骨质疏松明星基因 *RANKL* 表达的机制^[30]。

为进一步探究易感 SNP rs4325274 位点调控 *SOX6* 基因表达的机制, 本研究利用多种数据库进行了 Motif 预测, 发现 SNP rs4325274 结合的转录因子 *HNF1A*, 并结合 ChIP-seq 数据分析进行验证, 发现 rs4325274 位于转录因子 ChIP 信号富集区, 进一步

利用 shRNA 干扰转录因子 *HNF1A*, 发现在 *HNF1A* 基因敲低的细胞中, *SOX6* 基因的表达显著降低。由此推测骨质疏松易感 SNP rs4325274 可能通过影响与转录因子 *HNF1A* 的特异性结合来调节 *SOX6* 基因表达。后续本课题组会进一步通过染色质互作 (chromosome conformation capture, 3C) 实验和染色质免疫共沉淀 (chromatin immunoprecipitation assay, ChIP) 等实验来深入探究该 SNP 位点与转录因子及靶基因 *SOX6* 基因之间的作用机制, 并在细胞水平和动物模型深入探究 *SOX6* 基因在骨质疏松症发病中的真正作用机制。

综上所述, 本研究初步解析了非编码区功能性 SNPs rs4325274 作为增强子远程调控 *SOX6* 基因表达的分子机制。研究结果将有助于为复杂疾病非编码易感 SNP 的遗传调控研究提供新思路, 并为骨质疏松症的药物开发和治疗提供潜在的药物靶点。

参考文献(References):

- [1] Lamichhane AP. Osteoporosis-an update. *JNMA J Nepal Med Assoc*, 2005, 44(158): 60–66. [DOI]
- [2] Reginster JY, Burlet N. Osteoporosis: a still increasing prevalence. *Bone*, 2006, 38(2 Suppl. 1): S4–9. [DOI]
- [3] Morales-Torres J, Gutiérrez-Ureña S. The burden of osteoporosis in latinamerica. *OsteoporosInt*, 2004, 15(8): 625–632. [DOI]
- [4] Nguyen TV, Center JR, Eisman JA. Osteoporosis: under-rated, underdiagnosed and undertreated. *Med J Aust*, 2004, 180(S5): S18–22. [DOI]
- [5] Smits P, Li P, Mandel J, Zhang ZP, Deng JM, Behringer RR, de Crombrughe B, Lefebvre V. The transcription factors L-Sox5 and Sox6 are essential for cartilage formation. *Dev Cell*, 2001, 1(2): 277–290. [DOI]
- [6] Smits P, Dy P, Mitra S, Lefebvre V. Sox5 and Sox6 are needed to develop and maintain source, columnar, and hypertrophic chondrocytes in the cartilage growth plate. *J Cell Biol*, 2004, 164(5): 747–758. [DOI]
- [7] Renard E, Porée B, Chadjichristos C, Kypriotou M, Maneix L, Bigot N, Legendre F, Ollitrault D, De Crombrughe B, Malléin-Gérin F, Moslemi S, Demoor M, Boumediene K, Galéra P. Sox9/Sox6 and Sp1 are involved in the insulin-like growth factor-I-mediated upregulation of human type II collagen gene expression in articular chondrocytes. *J Mol Med (Berl)*, 2012, 90(6): 649–666. [DOI]

- [8] Liu J, Wang HW, Chen Y, Yu HL, Wang Q, Yang HF, Ma JX, Xiang LB. Regulatory effect of *SOX6* and *SOX9* on the growth and differentiation properties into chondrocytes of MPCs in primary OA articular cartilage. *J Reg Anat Oper Surg*, 2014, (5): 477–481.
刘军, 王洪伟, 陈语, 于海龙, 王琪, 杨会峰, 马骏雄, 项良碧. *SOX6* 和 *SOX9* 基因转染对人原发性骨关节炎关节软骨间充质祖细胞增殖和成软骨分化的调控作用. 局解手术学杂志, 2014, (5): 477–481. [DOI]
- [9] Zhang Y, Yang TL, Li X, Guo Y. Functional analyses reveal the essential role of *SOX6* and *RUNX2* in the communication of chondrocyte and osteoblast. *OsteoporosInt*, 2015, 26(2): 553–561. [DOI]
- [10] Livshits G, Deng HW, Nguyen TV, Yakovenko K, ReckerRR, Eisman JA. Genetics of bone mineral density: evidence for a major pleiotropic effect from an inter-continental study. *J Bone Miner Res*, 2004, 19(6): 914–923. [DOI]
- [11] Peacock M, Turner CH, Econs MJ, Foroud T. Genetics of osteoporosis. *Endocr Rev*, 2002, 23(3): 303–326. [DOI]
- [12] Rivadeneira F, Styrkárssdóttir U, Estrada K, Halldórsson BV, Hsu YH, Richards JB, Zillikens MC, Kavvoura FK, Amin N, Aulchenko YS, Cupples LA, Deloukas P, Demissie S, Grundberg E, Hofman A, Kong A, Karasik D, van Meurs JB, Oostra B, Pastinen T, Pols HA, Sigurdsson G, Soranzo N, Thorleifsson G, Thorsteinsdóttir U, Williams FM, Wilson SG, Zhou YH, Ralston SH, van Duijn CM, Spector T, Kiel DP, Stefansson K, Ioannidis JP, Uitterlinden AG. Twenty bone-mineral-density loci identified by large-scale meta-analysis of genome-wide association studies. *Nat Genet*, 2009, 41(11): 1199–1206. [DOI]
- [13] Hsu YH, Zillikens MC, Wilson SG, Farber CR, Demissie S, Soranzo N, Bianchi EN, Grundberg E, Liang LM, Richards JB, Estrada K, Zhou YH, van Nas A, Moffatt MF, Zhai GJ, Hofman A, van Meurs JB, Pols HA, Price RI, Nilsson O, Pastinen T, Cupples LA, Lusi AJ, Schadt EE, Ferrari S, Uitterlinden AG, Rivadeneira F, Spector TD, Karasik D, Kiel DP. An integration of genome-wide association study and gene expression profiling to prioritize the discovery of novel susceptibility loci for osteoporosis-related traits. *PLoS Genet*, 2010, 6(6): e1000977. [DOI]
- [14] Tan LJ, Liu R, Lei SF, Pan R, Yang TL, Yan H, Pei YF, Yang F, Zhang F, Pan F, Zhang YP, Hu HG, Levy S, Deng HW. A genome-wide association analysis implicates *SOX6* as a candidate gene for wrist bone mass. *Sci China Life Sci*, 2010, 53(9): 1065–1072. [DOI]
- [15] Villalobos-Comparán M, Jiménez-Ortega RF, Estrada K, Parra-Torres AY, González-Mercado A, Patiño N, Castillejos-López M, Quiterio M, Fernandez-López JC, Ibarra B, Romero-Hidalgo S, Salmerón J, Velázquez-Cruz R. A pilot genome-wide association study in postmenopausal Mexican mestizo women implicates the *RMND1/CCDC170* locus is associated with bone mineral density. *Int J Genomics*, 2017, 2017: 5831020. [DOI]
- [16] Morris JA, Kemp JP, Youten SE, Laurent L, Logan JG, Chai RC, Vulpescu NA, Forgetta V, Kleinman A, Mohanty ST, Sergio CM, Quinn J, Nguyen-Yamamoto L, Luco AL, Vijay J, Simon MM, Pramatarova A, Medina-Gomez C, Trajanoska K, Ghirardello EJ, Butterfield NC, Curry KF, Leitch VD, Sparkes PC, Adoum AT, Mannan NS, Komla-Ebri DSK, Pollard AS, Dewhurst HF, Hassall TAD, Beltejar MG, Adams DJ, Vaillancourt SM, Kaptoge S, Baldock P, Cooper C, Reeve J, Ntzani EE, Evangelou E, Ohlsson C, Karasik D, Rivadeneira F, Kiel DP, Tobias JH, Gregson CL, Harvey NC, Grundberg E, Goltzman D, Adams DJ, Lelliott CJ, Hinds DA, Ackert-Bicknell CL, Hsu YH, Maurano MT, Croucher PI, Williams GR, Bassett JHD, Evans DM, Richards JB. An atlas of genetic influences on osteoporosis in humans and mice. *Nat Genet*, 2019, 51(2): 258–266. [DOI]
- [17] Medina-Gomez C, Kemp JP, Trajanoska K, Luan J, Chesani A, Ahluwalia TS, Mook-Kanamori DO, Ham A, Hartwig FP, Evans DS, Joro R, Nedeljkovic I, Zheng HF, Zhu K, Atalay M, Liu CT, Nethander M, Broer L, Porleifsson G, Mullin BH, Handelman SK, Nalls MA, Jessen LE, Heppe DHM, Richards JB, Wang C, Chawes B, Schraut KE, Amin N, Wareham N, Karasik D, Van der Velde N, Ikram MA, Zemel BS, Zhou YH, Carlsson CJ, Liu Y, McGuigan FE, Boer CG, Bønnelykke K, Ralston SH, Robbins JA, Walsh JP, Zillikens MC, Langenberg C, Li-Gao R, Williams FMK, Harris TB, Akesson K, Jackson RD, Sigurdsson G, den Heijer M, van der Eerden BCJ, van de Peppel J, Spector TD, Pennell C, Horta BL, Felix JF, Zhao JH, Wilson SG, de Mutsert R, Bisgaard H, Styrkárssdóttir U, Jaddoe VW, Orwoll E, Lakka TA, Scott R, Grant SFA, Lorentzon M, van Duijn CM, Wilson JF, Stefansson K, Psaty BM, Kiel DP, Ohlsson C, Ntzani E, van Wijnen AJ, Forgetta V, Ghanbari M, Logan JG, Williams GR, Bassett JHD, Croucher PI, Evangelou E, Uitterlinden AG, Ackert-Bicknell CL, Tobias JH, Evans DM, Rivadeneira F. Life-Course genome-wide association study meta-analysis of total body BMD and assessment of age-specific effects. *Am J Hum Genet*, 2018, 102(1): 88–102. [DOI]

- [18] Chau D, Ng K, Chan TS, Cheng YY, Fong B, Tam S, Kwong YL, Tse E. Azacytidine sensitizes acute myeloid leukemia cells to arsenic trioxide by up-regulating the arsenic transporter aquaglyceroporin 9. *J Hematol Oncol*, 2015, 8: 46. [DOI]
- [19] Pelletier L, Rebouissou S, Paris A, Rathahao-Paris E, Perdu E, Bioulac-Sage P, Imbeaud S, Zucman-Rossi J. Loss of hepatocyte nuclear factor 1alpha function in human hepatocellular adenomas leads to aberrant activation of signaling pathways involved in tumorigenesis. *Hepatology*, 2010, 51(2): 557–566. [DOI]
- [20] Krijger PHL, de Laat W. Regulation of disease-associated gene expression in the 3D genome. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2016, 17(12): 771–782. [DOI]
- [21] Lane JM, Russell L, Khan SN. Osteoporosis. *Clin Orthop Relat Res*, 2000, (327): 139–150. [DOI]
- [22] Boudin E, Fijalkowski I, Hendrickx G, Van Hul W. Genetic control of bone mass. *Mol Cell Endocrinol*, 2016, 432: 3–13. [DOI]
- [23] Huang QY. Genetic study of complex diseases in the post-GWAS era. *J Genet Genomics*, 2015, 42(3): 87–98. [DOI]
- [24] ENCODE Project Consortium. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature*, 2012, 489(7414): 57–74. [DOI]
- [25] Ding N, Qu HZ, Fang XD. The ENCODE project and functional genomics studies. *Hereditas(Beijing)*, 2014, 36(3): 237–247.
丁楠, 渠鸿竹, 方向东. ENCODE 计划和功能基因组研究. 遗传, 2014, 36(3): 237–247. [DOI]
- [26] Bernstein BE, Stamatoyannopoulos JA, Costello JF, Ren B, Milosavljevic A, Meissner A, Kellis M, Marra MA, Beaudet AL, Ecker JR, Farnham PJ, Hirst M, Lander ES, Mikkelsen TS, Thomson JA. The NIH roadmap epigenomics mapping consortium. *Nat Biotechnol*, 2010, 28(10): 1045–1048. [DOI]
- [27] Kilpinen H, Waszak SM, Gschwind AR, Raghav SK, Witwicki RM, Orioli A, Migliavacca E, Wiederkehr M, Gutierrez-Arcelus M, Panousis NI, Yurovsky A, Lappalainen T, Romano-Palumbo L, Planchon A, Bielser D, Bryois J, Padioleau I, Udin G, Thurnheer S, Hacker D, Core LJ, Lis JT, Hernandez N, Reymond A, Deplancke B, Dermitzakis ET. Coordinated effects of sequence variation on DNA binding, chromatin structure, and transcription. *Science*, 2013, 342(6159): 744–747. [DOI]
- [28] Xiao SM, Gao Y, Cheung CL, Bow CH, Lau KS, Sham PC, Tan KC, Kung AW. Association of CDX1 binding site of periostin gene with bone mineral density and vertebral fracture risk. *Osteoporos Int*, 2012, 23(7): 1877–1887. [DOI]
- [29] Xiao SM, Kung AW, Gao Y, Lau KS, Ma A, Zhang ZL, Liu JM, Xia W, He JW, Zhao L, Nie M, Fu WZ, Zhang MJ, Sun J, Kwan JS, Tso GH, Dai ZJ, Cheung CL, Bow CH, Leung AY, Tan KC, Sham PC. Post-genome wide association studies and functional analyses identify association of MPP7 gene variants with site-specific bone mineral density. *Hum Mol Genet*, 2012, 21(7): 1648–1657. [DOI]
- [30] Zhu DL, Chen XF, Hu WX, Dong SS, Lu BJ, Rong Y, Chen YX, Chen H, Thynn HN, Wang NN, Guo Y, Yang TL. Multiple functional variants at 13q14 risk locus for osteoporosis regulate RANKL expression through long-range super-enhancer. *J Bone Miner Res*, 2018, 33(7): 1335–1346. [DOI]

(责任编辑: 周钢桥)