

骨 科 学

DOI:10.13406/j.cnki.cyxh.002207

股骨头坏死患者基因表达的转录组学高通量分析

白浩波,朱卫文,路 倩,张 健

(重庆医科大学附属第一医院关节外科,重庆 400016)

【摘要】目的:通过转录组方法,探索股骨头缺血性坏死发生发展过程中骨小梁改变的分子机制及预测股骨头坏死的诊断性生物标志物。**方法:**取 4 例股骨头坏死患者骨小梁组织(实验组)和 4 例股骨颈骨折患者骨小梁(对照组),通过转录组测序筛选差异基因;将筛选出的差异基因通过生物信息学软件分析,预测其可能参与的生物过程及信号通路。**结果:**高通量测序发现 1527 个差异基因(696 个基因上调,831 个基因下调),其中脂质运载蛋白 2(lipocalin 2, LCN2)、过氧化物酶体增殖物激活受体- γ (peroxisome proliferators-activated receptor γ , PPAR γ) 在坏死患者骨小梁组织的表达明显降低。差异表达基因在基因本体论(gene ontology, GO)分析中主要富集于细胞外基质组织、细胞外结构组织等。差异基因在京都基因与基因组百科全书(kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)分析主要富集于细胞外基质受体相互作用(extracellular matrix-receptor-interaction, ECM-receptor-interaction)、过氧化物酶体增殖物激活受体(peroxisome proliferators-activated receptors, PPARs)信号通路。**结论:**本研究发现脂质运载蛋白 2 通过调节脂质代谢和成骨分化影响股骨头坏死的产生。对探索股骨头缺血性坏死的分子机制及诊断性生物标志物提供了线索。

【关键词】转录组测序;骨小梁;股骨头缺血性坏死;脂代谢;脂质运载蛋白 2

【中图分类号】R681.6

【文献标志码】A

【收稿日期】2019-02-21

Gene expression profiling of patients with osteonecrosis of the femoral head: A transcriptomics high-throughput analysis

Bai Haobo, Zhu Weiwen, Lu Qian, Zhang Jian

(Department of Orthopedics, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate the molecular mechanism of bone trabeculae in the development and progression of osteonecrosis of the femoral head (ONFH) and biomarkers for the diagnosis and prediction of ONFH. **Methods:** Bone trabecular tissue was collected from 4 patients with ONFH (experimental group) and 4 patients with femoral neck fracture (control group), and transcriptome sequencing was performed to screen out differentially expressed genes. These genes were analyzed using bioinformatics software to predict possible biological processes and signaling pathways involving these genes. **Results:** High-throughput sequencing identified 1527 differentially expressed genes, with 696 upregulated genes and 831 downregulated genes, and there were significant reductions in the expression of lipocalin 2 (LCN2) and peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR γ) in bone trabecular tissue. The gene ontology analysis showed that the differentially expressed genes were mainly enriched in extracellular matrix (ECM) and extracellular structural tissue. The Kyoto encyclopedia of genes and genome (KEGG) analysis showed that the differentially expressed genes were mainly enriched in ECM-receptor interaction and the PPAR γ signaling pathway. **Conclusion:** This study shows that LCN2 affects the development of ONFH by regulating lipid metabolism and osteogenic differentiation, which provides a clue for exploring the molecular mechanism of ONFH and related diagnostic biomarkers.

【Key words】transcriptome sequencing; bone trabeculae; osteonecrosis of the femoral head; lipid metabolism; lipocalin 2

股骨头坏死(osteonecrosis of the femoral head, ONFH)是一种常见的疾病,主要发病人群为青年,

作者介绍:白浩波, Email: 740979175@qq.com,

研究方向:股骨头坏死的诊断与治疗。

通信作者:张 健, Email: zhangjianqmu@sohu.com。

基金项目:重庆市渝中区科委科学技术资助项目(编号:20150121)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20190603.1616.032.html>

(2019-06-04)

是全髋关节置换术的主要原因之一^[1]。在过去的十年里,中国的 ONFH 发病率不断增长,每年有 15 万~20 万的新患者被确诊^[2]。目前还没有建立起有效的早期诊断和治疗 ONFH 的方法,晚期的 ONFH 患者往往面临全髋关节置换^[3]。研究表明,服用类固醇类药物和习惯性饮酒是其可能的高危因素,但具体发病原因仍不清楚。类固醇和酒精的使用与骨髓腔内

脂质代谢紊乱和过度脂肪积累密切相关,同时还会引起血脂水平的升高^[4],另一方面长期服用类固醇药物和长期饮酒都能在不同程度上影响基因的转录^[5]。基因转录水平的改变往往在疾病的发生发展中扮演重要角色,如表皮生长因子的表达降低,导致股骨头小梁骨血管供应减少,骨细胞死亡,引起骨小梁骨出现弱骨和空腔,最终导致关节面塌陷^[6-7]。已有理论指出,脂代谢紊乱是 ONFH 发病的重要因素,骨小梁更是参与了 ONFH 的整个病理生理过程^[8]。本文通过使用转录组学高通量分析 ONFH 患者骨小梁基因转录水平的改变,进一步探讨脂代谢紊乱和骨小梁结构改变在其病理发生中的可能机制。

1 材料和方法

1.1 主要仪器与试剂

Nanophotometer®分光光度计购自美国 IMPLIN 公司;组织低温匀浆器购自德国 QIAGEN Hilden 公司;高速低温离心机购自德国 Sigma 公司;凝胶图像分析仪购自美国 Gene 公司;荧光定量 PCR 购自美国 Bio-Rad 公司;Trizol 试剂购自美国 Life Technologies;总 RNA 提取试剂盒购自北京百泰克生物技术有限公司;逆转录试剂盒、SYBR Green Mix 试剂购自美国 Thermo Scientific 公司;NEBNext® Ultra™ RNA 文库制备试剂盒;核酸纯化试剂盒 AMPure XP 购自美国 Beckman Coulter 公司。

1.2 实验对象

本实验已获得重庆医科大学附属第一医院伦理委员会的批准,在实验开始前每位参与研究的患者都得到了充分的了解,并签署了知情同意书。股骨头坏死的纳入标准为:①患者 X 线、核磁共振(magnetic resonance imaging, MRI)及病理学表现均符合股骨头坏死诊断;②根据 ARCO 分期,患者处于 3 期或者 4 期;③需要进行全髋关节置换术(total hip arthroplasty, THA)治疗;④患者未出现严重内源性疾病、Paget 病、代谢性骨病、骨转移癌等并发症;⑤1 个月内未接受药物治疗。股骨干骨折的纳入标准为:①X 线诊断为股骨骨折;②需要进行 THA;③无严重内源性疾病、Paget 病及有骨转移的肿瘤;④患者 1 个月内未接受药物治疗。本研究涉及 15 例股骨头坏死患者及 15 例股骨干骨折(股骨粗隆间区或颈段)的标本。患者来自 2017 年 6 月至 2018 年 3 月在重庆医科大学附属第一医院骨科的住院病人。在手术中取下股骨头样本,用骨刀分为两部分,一部分用 4%多聚甲醛固定,另一部分立即放入液氮储存。

1.3 样本收集和预处理

从液氮中取出样本后,置于冰上解冻。分别取股骨头坏死患者坏死骨组织 100 mg、股骨颈骨折患者正常骨组织 100 mg。

放入研磨皿倒入液氮研磨粉碎,按照说明书用 Trizol 试剂盒(Life Technologies, USA)提取 RNA。在 1%琼脂糖凝胶上检测 RNA 的降解和污染。用纳米光度计检测 RNA 纯度(IMPLEN, Westlake Village, CA, USA)用 Qubit RNA 分析试剂盒测定 RNA 浓度。

用于组织病理学检查的标本,用 4%多聚甲醛固定、脱钙、石蜡包埋、切片并用苏木精-伊红(HE)染色。

1.4 cDNA 文库构建及质控

以每个样品 3 µg RNA 作为样品制剂的输入材料,根据说明书,使用 NEBNext ultratm RNA 库 Illumina(NEB, USA)准备工具包生成测序库,并将索引代码添加到每个样本的属性序列中。用 Oligo(dT)磁珠从总 RNA 中纯化 mRNA。在 NEBNext 第一链合成反应缓冲液(5×)中,用二价阳离子在高温下进行裂解。以片段化的 mRNA 为模板合成 cDNA 第一条链,然后用 DNA 聚合酶 I 和核糖核酸酶 H 进行第二链 cDNA 合成。末端修复、加 A 尾并连接测序接头。为了筛选长度为 250~300 bp 的 cDNA 片段,利用 AMPure XP 系统对文库片段进行纯化。最后用安捷伦 2100 生物分析仪检测插入片段和 qRT-PCR 对文库的有效浓度,以保证文库质量。

1.5 上机测序和统计学分析

按照说明书使用 TruSeq PE Cluster Kit v3-cBot-HS(Illumina)的生成系统,然后在 Illumina HiSeq 平台进行双端 125 bp/150 bp 测序。fastq 格式的原始数据(raw read)首先通过内部 perl 脚本处理。然后,通过计算 Q20、Q30 和 GC 含量获得后续待分析数据(clean reads)。用 DESeq2 软件包(1.16.1)进行差异表达分析。DESeq2 提供了统计程序,用于使用基于负二项式分布的模型来确定数字基因表达数据中的差异表达。使用 Benjamini 和 Hochberg 的方法来调整所得 P 值以控制错误发现率。通过 DESeq2 发现调整的 $P < 0.05$ 的基因为差异表达基因。对于没有生物学重复的采用 edgeR。在进行差异基因表达分析之前,对于每个测序文库,通过一个比例归一化因子对差异表达基因进行归一化,通过 edgeR 程序包调整读取计数。2 个条件的差异表达分析使用 edgeR 软件包(3.18.1)进行。使用 Benjamini & Hochberg 方法调整 P 值。校正后的 P 值以及 $\log_2$ foldchange 作为显著差异表达的阈值。

1.6 差异基因富集分析

通过 clusterProfiler R 软件实现差异表达基因的 GO 富集分析,其中修正了基因长度偏差。筛选调整的 P 值小于 0.05 的 GO term 为在差异表达基因中显著富集的 GO term。KEGG 是一个数据库资源,用于从分子水平的信息,特别是基因组测序产生的大规模分子数据集和其他高通量数据库中了解生物系统的高级功能和效用,如细胞、生物体和生态系统等。使用 clusterProfiler R 软件分析 KEGG 通路中差异表达基因的统计富集。

1.7 qRT-PCR

用组织 RNA 试剂盒(Bio Teke, China)提取总 RNA。并利用逆转录试剂盒(#K1622 Lot 00376308, Thermo Scientific,

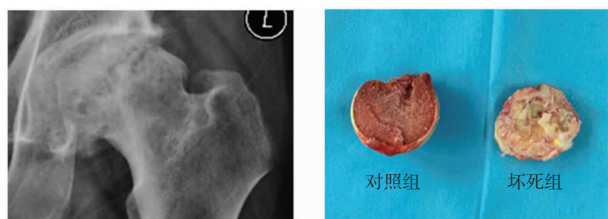
USA)将其转化为 cDNA。qRT-PCR 反应采用 10 μ L 体系,并设置 3 个复孔,基因扩增条件为:95 $^{\circ}$ C 2 min,变性 95 $^{\circ}$ C 10 s,退火 60 $^{\circ}$ C 15 s,延伸 68 $^{\circ}$ C 20 s,40 次循环重复 65 $^{\circ}$ C 5 s,95 $^{\circ}$ C 溶解。SYBR[®] Green Master Mix (#A25741, Applied Biosystems, USA)采用 qRT-PCR 和 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算相对表达量。

基因引物由生命科技公司(上海,中国)合成,其序列如下:LCN2:(上游引物)5'-ACCAAGGAGCTGACTTCGA-3',(下游引物)5'-TCAGCCGTCGATACACTGGT-3';PPAR- γ :(上游引物)5'-AGATCATTTACACAATGCTGGC-3',(下游引物)5'-TAAAGTCACCAAAAGGCTTTCG-3'。

2 结果

2.1 标本的组织病理学分析

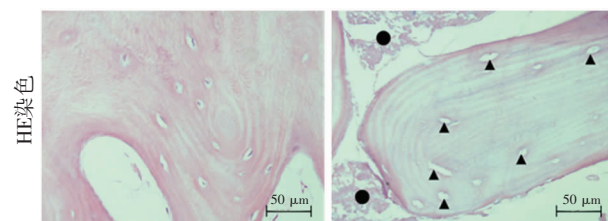
MRI 和 X 线对受检者的诊断均经骨组织病理学检查进一步证实,组织病理学检查可作为诊断疾病的金标准。图 1A 显示一位股骨头坏死病人的髋关节 X 线片。可见明显的股骨头塌陷和软骨下骨骨折。图 1B 可见股骨头坏死病人的股骨头颜色较黄而对照组病人股骨头颜色为深红色。图 2B 可见骨髓间质组织坏死、骨小梁中骨细胞坏死呈空泡状,而在对照组未见明显异常。图 2D 可见股骨头坏死病人骨组织油红染色显示大面积红染,而对照组较少。



A. 坏死病人 X 线

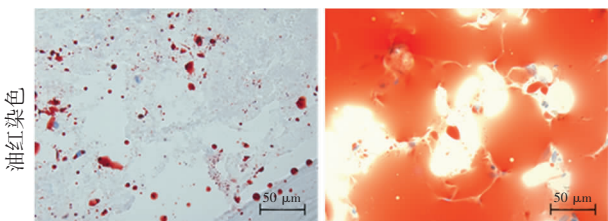
B. 组织样本

图 1 X 线影像及组织大体图



A. 正常组织病理切片

B. 坏死组织病理切片



C. 正常组织病理切片

D. 坏死组织病理切片

注:▲显示骨小梁空腔;●显示坏死间质组织;红染区域为脂质沉积

图 2 病理切片 HE 染色及油红染色 (400 $\times$)

2.2 差异基因表达分析

对股骨头坏死和对照组共 8 个样本进行分析。差异基因表达分析揭示坏死组与对照组的差异。以差异倍数(fold change, FC)大于 2 倍变化和 $P < 0.05$ 为筛选阈值来筛选差异基因,得出差异表达的基因共 1 527 个(表 1),其中 696 个基因上调,831 个基因下调。对差异表达基因和样本同时进行分层聚类分析(图 3),可见表达模式相似的基因具有功能相关性。火山图显示了股骨头坏死组和对照组间有统计学意义的差异表达基因分布情况(图 4)。

表 1 坏死组与对照组比较基因表达差异显著前 20

基因名称	Log2(差异倍数)	P 值	校正 P 值	基因变化
DEFA3	-14.366 616 07	2.01E-08	1.20E-06	下调
XIST	-12.519 951 30	2.13E-08	1.25E-06	下调
DEFA4	-12.467 612 95	2.29E-04	3.57E-03	下调
HEMGN	-11.796 723 43	3.53E-06	1.06E-04	上调
HAPLN1	11.461 434 58	3.83E-19	1.33E-16	下调
CA1	-11.353 666 88	3.85E-09	2.69E-07	下调
AHSP	-11.334 614 31	5.40E-08	2.79E-06	下调
SLC4A1	-11.297 402 77	2.38E-11	2.40E-09	下调
MS4A3	-11.215 302 69	7.98E-04	9.80E-03	下调
DEFA1	-10.886 424 38	1.14E-03	1.27E-02	下调
HBD	-10.876 299 41	1.01E-08	6.59E-07	下调
CD5L	-10.809 639 79	2.00E-09	1.47E-07	下调
CTSE	-10.704 877 23	1.31E-05	3.30E-04	下调
PRTN3	-10.694 571 00	2.13E-09	1.56E-07	下调
CRISP3	-10.606 788 64	1.55E-03	1.61E-02	下调
RHAG	-10.535 672 67	2.19E-05	5.12E-04	下调
HBM	-10.304 796 95	1.34E-09	1.03E-07	下调
CEACAM6	-10.263 945 17	2.42E-03	2.32E-02	下调
GYPA	-10.226 154 67	2.55E-06	8.03E-05	下调
GYPB	-10.157 902 42	6.16E-05	1.23E-03	下调

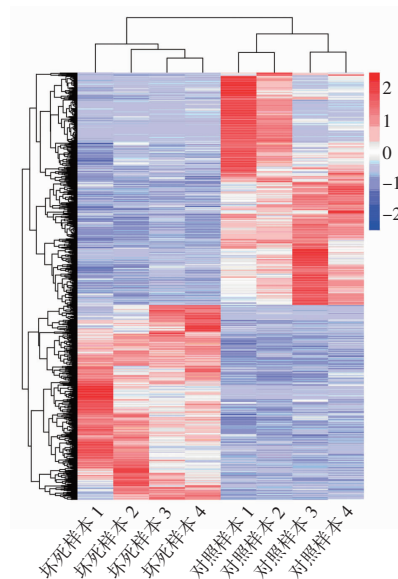


图 3 差异表达基因聚类分析热图

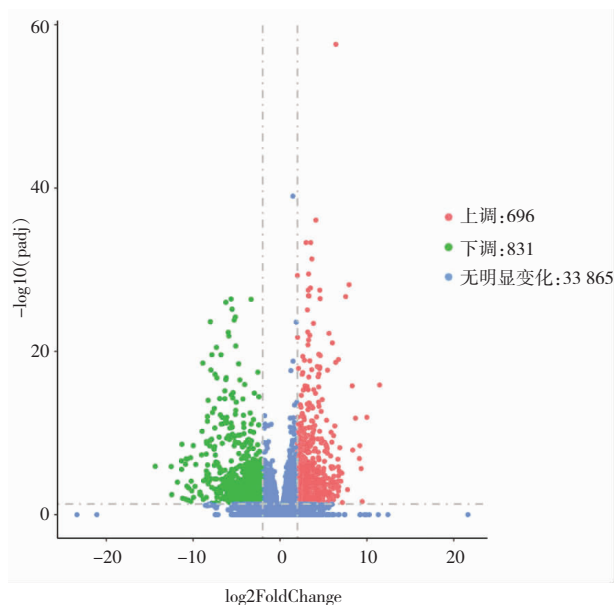


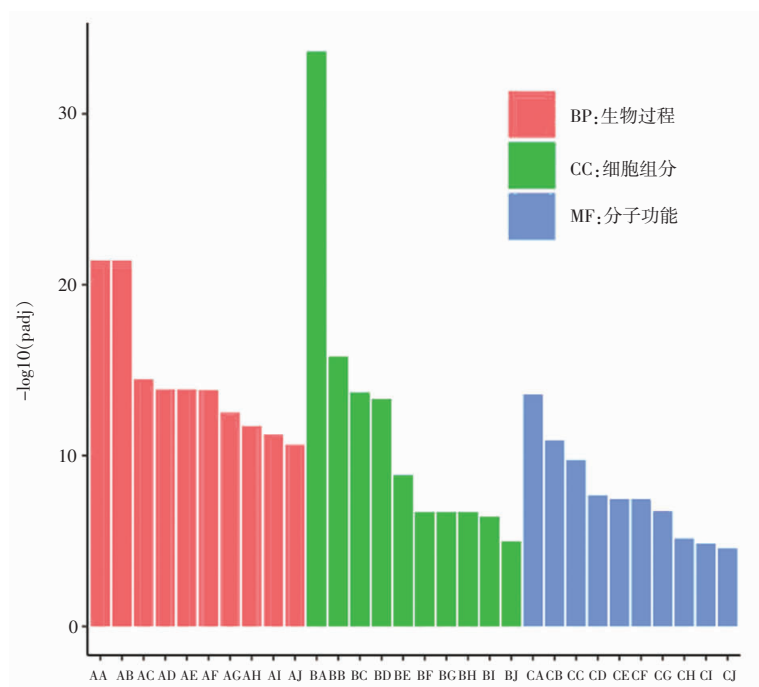
图4 差异表达基因的火山图

2.3 差异基因的功能和富集通路分析

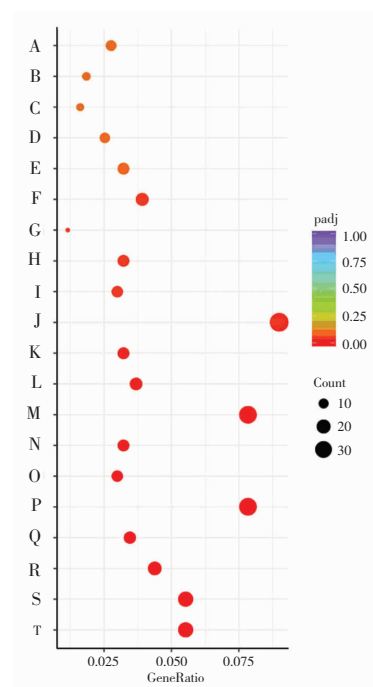
为了推测差异表达基因在 ONFH 发病中的生物学功能和途径富集,本研究进行了 GO 分析和 KEGG 分析。GO 分析将差异表达基因分为三类,即生物学过程、细胞成分和分子功能(图 5A)。GO 分析显示差异基因富集的主要功能有:细胞外基质组织、细胞外结构组织、胶原代谢过程等。KEGG 是细胞信号通路的主要公共数据库之一。本研究利用 KEGG 通路富集分析来确定由差异表达基因调控的相关通路(图 5B)。KEGG 分析显示,细胞外基质受体相互作用、PPARs 信号通路、脂肪细胞脂解的调控、磷脂酰肌醇 3-激酶(phosphatidylinositol 3-kinase-protein kinase B, PI3K-AKT/PKB)信号通路等都是差异基因显著富集的通路。

2.4 qRT-PCR

为了证实本研究发现,选择 2 个差异表达基因:LCN2、PPAR γ ,它们都与脂质代谢有关。用 qRT-PCR 方法检测 10 例股骨头坏死患者和健康对照组的基因表达。与预期结果一致的是,LCN2 和 PPAR γ 的表达水平均与 RNA-seq 分析结果一致,LCN2 ($n=6\sim8, P=0.043$)、PPAR γ ($n=6\sim9, P=0.000$)在股骨头坏死标本中的表达均明显低于正常对照组(图 6)。



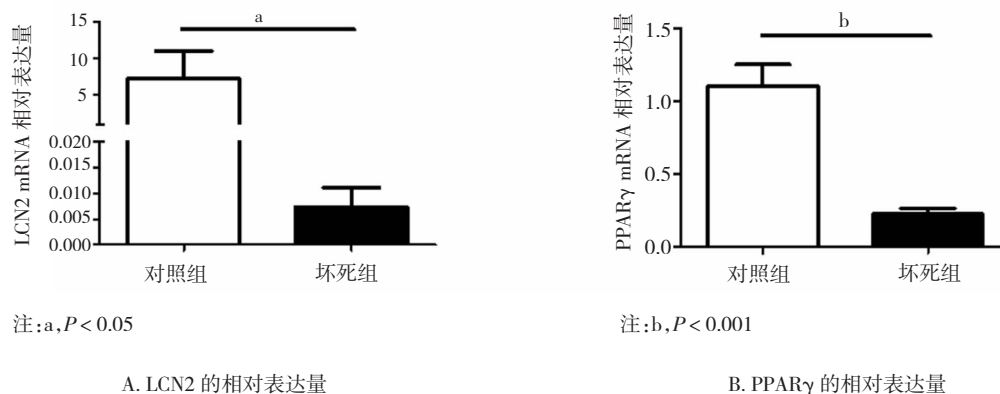
A. 差异表达基因 GO 富集分析



B. 差异表达基因 KEGG 信号通路富集分析

注:AA- 细胞外基质组织,AB- 细胞外结构组织,AC- 胶原代谢过程,AD- 多细胞生物大分子代谢过程,AE- 多细胞生物代谢过程,AF- 胶原分解代谢过程,AG- 多细胞生物分解代谢过程,AH- 白细胞游出,AI- 骨骼系统发育,AJ- 软骨发育,BA- 蛋白质的细胞外基质,BB- 胶原三聚物,BC- 细胞外基质成分,BD- 内质网腔,BE- 基底膜,BF- 胶原纤维三聚物,BG- 血红蛋白复合体,BH- 带状胶原纤维,BI- 胶原三聚体复合物,BJ- 特殊颗粒,CA- 糖胺聚糖结合,CB- 肝素结合,CC- 硫化物结合,CD- 丝氨酸水解酶活性,CE- 丝氨酸胺酶活性,CF- 丝氨酸内肽酶活性,CG- 细胞外基质结构组成,CH- 胶原蛋白结合,CI- 内肽酶活性,CJ- 细胞因子活性;A-TGF β 信号通路,B- 脂肪酸降解,C- 酪氨酸代谢,D- 类风湿性关节炎,E-AGE-RAGE 信号通路,F-AMPK 信号通路,G- 脂肪酸合成,H- 肥厚型心肌病,I- 补体系统,J-PI3K-Akt 信号通路,K- 致心律失常性室性心律失常,L- 扩张性心肌病,M- 神经活动配体-受体相互作用,N- 脂肪细胞因子信号通路,O- 脂肪细胞脂解的调控,P- 脂肪细胞中的细胞因子-细胞因子受体,Q- 疟疾,R-PPAR 信号通路,S- 蛋白质消化吸收,T- 细胞外基质受体相互作用

图5 差异表达基因功能富集分析

图6 QPCR 检测 PPAR γ 及 LCN2 基因的 mRNA 表达水平

3 讨论

人们通常认为,ONFH 是由股骨头的永久性或暂时性失血引起的骨头坏死,最终导致骨头塌陷^[9]。而股骨头坏死的发病机制包括脂肪代谢紊乱、微血管内皮细胞损伤、成骨细胞和骨细胞死亡、骨重塑紊乱、骨量减少和免疫功能障碍等^[10],具体发病机制还不清楚。在股骨头坏死和股骨颈骨折的标本中清楚地看到坏死组标本颜色发黄,而对照组标本颜色发红。根据以往的研究发现造成这种颜色改变的原因可能是因为组织缺乏血供和脂质沉积。组织学分析中也发现骨小梁空腔、脂质沉积和大量无血管坏死间质组织。油红 O 染色发现股骨头坏死组织有大量的脂质沉积。近年有研究表明脂类代谢相关基因的改变也是股骨头坏死的重要致病因素^[11]。

多种证据表明 ONFH 相关基因表达的改变可能在疾病病理中起重要作用^[2,12]。测序结果发现人造血红蛋白(hemogen, HEMGN)、5-氨基酮戊酸合成酶(5'-aminolevulinic synthase 2, ALAS2)基因在股骨头坏死组表达明显下调。股骨头坏死病理改变的核心环节就是血供中断,而血供中断往往导致股骨头缺血和缺氧。以往研究表明在缺氧条件下调节花生四烯酸代谢途径的 HEMGN 和 ALAS2 表达明显改变,这 2 个基因与气体转运失能和血红蛋白代谢途径紊乱密切相关^[13]。由此推测当股骨头血供中断时引起了局部组织的缺氧,从而导致花生四烯酸代谢途径紊乱,引起局部炎症反应,加速疾病发展。

已有文献报道缺乏 LCN2 可能选择性地影响与花生四烯酸(arachidonic acid, AA)的合成与分解相

关的代谢途径^[14]。在本研究的测序结果中,发现 LCN2 的表达在坏死区严重降低。LCN2 是一种成骨细胞产生和分泌的蛋白,在缺氧和缺血状态下降低^[12,15]。同时 LCN2 与脂质的转运、脂肪酸的代谢都有密切的联系。据报道,LCN2 可以通过影响脂滴表面蛋白 5(Perilipin-5, PLIN5)的表达来调节细胞内脂滴的形成^[16]。由此猜测在坏死骨细胞中产生的脂质沉积和脂滴形成也与 LCN2 的低表达有密不可分的关系。另一方面,以往的研究表明,LCN2 在卵巢切除引起骨质疏松小鼠模型中表达减少,说明 LCN2 的降低与骨质疏松密切相关。此外,LCN2 还可以通过调节葡萄糖转运蛋白 1 的表达来影响成骨细胞的成骨作用。大量流行病学和实验研究表明,脂质代谢紊乱和抑制骨髓间充质干细胞的成骨分化会增加 ONFH 的风险^[11,17]。LCN2 表达的改变也会引起脂代谢紊乱和成骨分化,LCN2 表达的改变可能是股骨头病理变化中的一个关键。目前已有许多疾病把 LCN2 作为诊断标志物,如风湿性疾病^[18]。而 LCN2 是否能成为 ONFH 早期诊断治疗的生物标志物还需进一步研究。

KEGG 通路分析也发现 PPARs 信号通路显著富集。PPARs 是调节目标基因表达的核内受体转录因子超家族成员,PPARs 可分为 α 、 β 和 γ 3 种类型^[19]。PPAR 信号通路在调节脂质、胆固醇和葡萄糖代谢中起着至关重要的作用。已有研究表明,下调 PPAR γ 在抑制骨髓间充质干细胞的成脂和维持成骨方面是有效的,这可能会降低 ONFH 的发生率^[20]。然而,本研究发现 PPAR γ 基因在 ONFH 小梁骨中的表达降低,这与以前的研究相反。一方面可能是因为坏死区 PPAR γ 对骨组织起到保护作用,

PPAR γ 的表达降低会减缓骨组织坏死^[21]。另一方面 PPAR γ 基因在血管生成、应激和炎症反应中也发挥了重要作用^[22]。而 PPAR γ 的表达降低常导致血管内皮损伤和脂质代谢紊乱。有趣的是 LCN2 也可以选择性调节 PPAR γ 的活化^[23], 本研究发现 LCN2 在坏死区的剧烈降低也可能是影响 PPAR γ 表达降低的原因。而 PPAR γ 表达降低往往也反映了坏死区的微血管受到损伤, 线粒体生理、能量代谢和炎症反应紊乱。因此, LCN2 可能通过选择性调节 PPAR γ 的活化引起炎症反应、脂质代谢紊乱和血管内皮损伤从而加速 ONFH 的病理过程。

综上所述, 本研究对股骨头坏死患者的骨组织标本进行了转录组学高通量测序, 发现了 LCN2 这一关键基因。LCN2 可能通过影响脂质代谢和成骨紊乱而促进 ONFH 的发生。接着通过 GO、KEGG 等生物信息学分析, 发现差异基因在过氧化物酶体增殖物激活受体信号通路显著富集。同时 LCN2 也可选择性调节 PPAR γ 的活化。而 LCN2 是否能作为 ONFH 早期诊断治疗的关键基因仍需进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Kubo T, Ueshima K, Saito M, et al. Clinical and basic research on steroid-induced osteonecrosis of the femoral head in Japan[J]. Journal of Orthopaedic Science, 2016, 21(4): 407-413.
- [2] Qingyu W, Qiwei Y, Gaoyang C, et al. LncRNA expression profiling of BMSCs in osteonecrosis of the femoral head associated with increased adipogenic and decreased osteogenic differentiation[J]. Scientific Reports, 2018, 8(1): 9127.
- [3] Lau RL, Perruccio AV, Evans HM, et al. Stem cell therapy for the treatment of early stage avascular necrosis of the femoral head: a systematic review[J]. BMC Musculoskeletal Disorders, 2014, 15(1): 156.
- [4] Hernigou P, Trousselier M, Roubineau F, et al. Stem cell therapy for the treatment of hip osteonecrosis: a 30-year review of progress[J]. Clin Orthop Surg, 2016, 8(1): 1-8.
- [5] Gou WL, Lu Q, Wang X, et al. Key pathway to prevent the collapse of femoral head in osteonecrosis[J]. European Review for Medical & Pharmacological Sciences, 2015, 19(15): 2766-2774.
- [6] Kang P, Xie X, Tan Z, et al. Repairing defect and preventing collapse of femoral head in a steroid-induced osteonecrotic of femoral head animal model using strontium-doped calcium polyphosphate combined BM-MNCs[J]. J Mater Sci Mater Med, 2015, 26(2): 80.
- [7] Larson E, Jones LC, Goodman SB, et al. Early-stage osteonecrosis of the femoral head: where are we and where are we going in year 2018?[J]. International Orthopaedics, 2018, 42(S1): 1273-1278.
- [8] Zhu W, Chen T, Ding S, et al. Metabolomic study of the bone trabecula of osteonecrosis femoral head patients based on UPLC-MS/MS[J]. Metabolomics, 2016, 12: 48.
- [9] Kerachian MA, Harvey EJ, Courmoyer D, et al. Avascular necrosis of the femoral head: vascular hypotheses, endothelium, inform a health-care[J]. Endothelium, 2006, 13(4): 237-244.
- [10] Biaofang W, Wei W, Liang W, et al. Differentially expressed MicroRNAs in conservatively treated nontraumatic osteonecrosis compared with healthy controls[J]. BioMed Research International, 2018, 2018: 1-8.
- [11] Xie Y, Hu JZ, Shi ZY. MiR-181d promotes steroid-induced osteonecrosis of the femoral head by targeting SMAD3 to inhibit osteogenic differentiation of hBMSCs[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2018, 22(13): 4053-4062.
- [12] Mosialou I, Shikhel S, Liu JM, et al. MC4R-dependent suppression of appetite by bone-derived lipocalin 2[J]. Nature, 2017. 543(7645): 385-390.
- [13] Chang L, Bao L, Lu L, et al. Arachidonic acid metabolism pathway is not only dominant in metabolic modulation but associated with phenotypic variation after acute hypoxia exposure[J]. Frontiers in Physiology, 2018, 9: 236.
- [14] Wang Y. Small lipid-binding proteins in regulating endothelial and vascular functions: focusing on adipocyte fatty acid binding protein and lipocalin-2[J]. Br J Pharmacol, 2012, 165(3): 603-621.
- [15] Hao Z, Ma Y, Wang J, et al. Hypoxia promotes AMP-activated protein kinase (AMPK) and induces apoptosis in mouse osteoblasts[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015, 8(5): 4892-4902.
- [16] Jessica L, Thorsten B, Mak TW, et al. Lipocalin-2 in fructose-induced fatty liver disease[J]. Frontiers in Physiology, 2017, 8: 964.
- [17] Asimakopoulou A, Borkham-Kamphorst E, Henning M, et al. Lipocalin-2 (LCN2) regulates PLIN5 expression and intracellular lipid droplet formation in the liver[J]. Biochim Biophys Acta, 2014, 1842(10): 1513-1524.
- [18] Hao Y, Guo H, Xu Z, et al. The relationship between apolipoprotein genes polymorphisms and susceptibility to osteonecrosis of the femoral head: a meta-analysis[J]. Lipids Health Dis, 2018, 17(1): 192.
- [19] 李优磊. PPAR 信号通路在调控猪皮下脂肪与肌内脂肪差异沉积中的作用及机制研究[D]. 咸阳: 西北农林科技大学, 2018.
- [20] Li J, Wang Y, Li Y, et al. The effect of combined regulation of the expression of peroxisome proliferator-activated receptor- γ and calcitonin gene-related peptide on alcohol-induced adipogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells[J]. Molecular and Cellular Biochemistry, 2014, 392(1-2): 39-48.
- [21] Suzuki T, Saiki Y, Horii A, et al. Atrial natriuretic peptide induces peroxisome proliferator activated receptor γ during cardiac ischemia-reperfusion in swine heart[J]. Gen Thorac Cardiovasc Surg, 2017, 65(2): 85-95.
- [22] Han L, Shen WJ, Bittner S, et al. PPARs: regulators of metabolism and as therapeutic targets in cardiovascular disease. Part I: PPAR- α [J]. Future Cardiology, 2017, 13(3): 279-296.
- [23] Jin D, Guo H, Bu SY, et al. Lipocalin 2 is a selective modulator of peroxisome proliferator-activated receptor- γ activation and function in lipid homeostasis and energy expenditure[J]. FASEB J, 2011, 25(2): 754-764.

(责任编辑: 冉明会)