



doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2023.03.009
http://dx.doi.org/10.7659/j.issn.1005-6947.2023.03.009
China Journal of General Surgery, 2023, 32(3):400-407.

· 基础研究 ·

继发性甲状旁腺功能亢进疾病相关分子的筛选与验证

吴听潮¹, 周文轩¹, 程灵超², 杜瑶³, 王暑⁴, 胡忠良^{1,3}

(1.中南大学湘雅医院 病理科, 湖南长沙 410008; 2.浙江省台州市中心医院 病理科, 浙江台州 318000; 3.中南大学基础医学院, 湖南长沙 410005; 4.湖南省胸科医院 病理科, 湖南长沙 410000)

摘要

背景与目的: 继发性甲状旁腺功能亢进 (SHPT) 是慢性肾脏疾病 (CKD) 最棘手的并发症之一, 伴随着一系列的钙磷代谢紊乱、骨软化症与小肠吸收不良等症状, 严重影响了患者的生存质量。目前临床上治疗效果不佳, 尚未发现理想的靶点分子。因此, 本研究旨在寻找 SHPT 的疾病相关分子, 从而为其治疗提供新的靶点。

方法: 收集 2017—2020 年中南大学湘雅医院病理科 5 例新鲜正常甲状旁腺组织, 15 例 SHPT 患者甲状旁腺组织, 其中 2 例正常甲状旁腺组织及 5 例 SHPT 患者甲状旁腺组织用于 RNA 转录组测序, 获取差异表达基因, 并通过功能富集分析、构建 PPI 网络和拓扑算法识别出核心基因; 分别用 qRT-PCR 法与 Western blot 法验证核心基因在其余正常甲状旁腺组织与 SHPT 甲状旁腺组织中的表达。采用免疫组化法检测核心基因在 36 例 SHPT 甲状旁腺组织石蜡标本与 16 例甲状腺手术误切的正常甲状旁腺石蜡标本中的表达。

结果: RNA 测序发现 1 323 个差异基因; 构建 PPI 网络和拓扑算法, 最终筛选出 10 个关键基因; 其中, 二肽基肽酶 4 (DPP4) 因与糖尿病密切相关, 而被用于进一步的验证。qRT-PCR 结果显示, SHPT 患者甲状旁腺组织中 DPP4 mRNA 表达水平明显高于正常甲状旁腺组织 ($P=0.0051$); Western blot 结果显示, SHPT 患者甲状旁腺组织中 DPP4 蛋白表达水平明显高于正常甲状旁腺组织 ($P=0.0060$); 免疫组化结果显示, DPP4 在 SHPT 患者甲状旁腺组织中的阳性率明显高于正常甲状旁腺组织 ($P=0.0069$)。

结论: SHPT 患者的甲状旁腺组织中, DPP4 的表达水平明显上调, 因此, DPP4 可能参与 SHPT 的发生发展, 或有望作为 SHPT 的药物治疗的潜在靶点。

关键词

甲状旁腺功能亢进症, 继发性; 二肽基肽酶 4; 蛋白质相互作用图

中图分类号: R653.2

Screening and validation of molecules associated with secondary hyperparathyroidism

WU Tingchao¹, ZHOU Wenxuan¹, CHENG Lingchao², DU Yao³, WANG Shu⁴, HU Zhongliang^{1,3}

(1. Department of Pathology, Central South University Xiangya Hospital, Changsha 410008, China; 2. Department of Pathology, Taizhou Central Hospital, Taizhou, Zhejiang 318000, China; 3. School of Basic Medical Science, Central South University, Changsha 410005, China; 4. Department of Pathology, Hunan Provincial Chest Hospital, Changsha 410000, China)

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (8186030147)。

收稿日期: 2022-12-09; **修订日期:** 2023-03-01。

作者简介: 吴听潮, 中南大学湘雅医院硕士研究生, 主要从事钙磷代谢方面的研究。

通信作者: 胡忠良, Email: huzhongliang@csu.edu.cn

Abstract

Background and Aims: Secondary hyperparathyroidism (SHPT) is one of the most challenging complications of chronic kidney disease (CKD), characterized by a series of calcium and phosphorus metabolism disorders, osteomalacia, and malabsorption, which severely affects the quality of life of patients. Currently, clinical treatment is unsatisfactory, and no ideal target molecules have been discovered. This study was conducted to identify candidate target molecules for SHPT, so as to provide new targets for its treatment.

Methods: The specimens of 5 fresh normal parathyroid tissues and 15 SHPT patient parathyroid tissues were collected from the Department of Pathology of Xiangya Hospital between 2017 and 2020. Among them, 2 normal parathyroid tissues and 5 SHPT patient parathyroid tissues were used for RNA transcriptome sequencing to obtain the differentially expressed genes, and the core genes were identified through functional enrichment analysis, PPI network construction and topology algorithms. The expressions of the core genes in the remaining normal parathyroid tissues and SHPT patient parathyroid tissues were validated using qRT-PCR and Western blot, respectively. Immunohistochemical staining was performed to detect the expressions of the core genes in the paraffin sections of 36 SHPT patient parathyroid tissues, and 16 normal parathyroid tissues that were inadvertently resected during thyroid surgery.

Results: A total of 1 323 differentially expressed genes were identified by RNA sequencing, and 10 key genes were screened through construction of PPI network and topological algorithm. Among them, dipeptidyl peptidase 4 (DPP4) was further validated due to its close association with diabetes. Results of qRT-PCR showed that the mRNA expression level of DPP4 in the parathyroid tissue of SHPT patients was significantly higher than that in normal parathyroid tissue ($P=0.005\ 1$); results of Western blot showed that the protein expression level of DPP4 in the parathyroid tissue of SHPT patients was significantly higher than that in normal parathyroid tissue ($P=0.006\ 0$); results of immunohistochemical staining showed that the positive rate of DPP4 in the parathyroid tissue of SHPT patients was significantly higher than that in normal parathyroid tissue ($P=0.006\ 9$).

Conclusion: The expression level of DPP4 is significantly upregulated in the parathyroid tissue of patients with SHPT, indicating that DPP4 may be involved in the occurrence and development of SHPT, and may be a potential therapeutic target for drug treatment of SHPT.

Key words

Hyperparathyroidism, Secondary; Dipeptidyl Peptidase 4; Protein Interaction Maps

CLC number: R653.2

继发性甲状旁腺功能亢进 (secondary hyperparathyroidism, SHPT) 是慢性肾脏疾病 (chronic kidney disease, CKD) 的严重并发症之一^[1], 其发生通常伴随着甲状旁腺激素的升高和钙磷代谢的紊乱以及维生素D的缺乏等病理现象^[2], 导致患者的生存质量下降, 临床多以甲状旁腺切除术进行治疗^[3]。尽管目前对SHPT发病机制研究较为广泛但其阐述仍不明确, 因此, 破解SHPT发病机制对于临床CKD患者的治疗与诊断尤为重要。本研究旨在寻找SHPT组织中的差异表达基因。

本研究通过对正常甲状旁腺组织和SHPT组织

转录组测序数据进行分析, 鉴别出差异常表达基因, 随后使用这些差异表达基因构建蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络并应用拓扑算法识别出二肽基肽酶4 (dipeptidyl peptidase 4, DPP4)。通过qRT-PCR及Western blot法, 验证了DPP4在继发性甲状旁腺功能亢进组织中的表达明显高于正常甲状旁腺组织。

DPP4/CD26是一种II型跨膜蛋白, 在各种细胞表面^[4]和多种肿瘤细胞中广泛表达^[5], 已有研究发现, 抑制DPP4可改善II型糖尿病、肾病群体的内皮功能障碍^[6]以及在慢性肾衰动物模型中抑制

DPP4可减轻蛋白尿的增加^[7]。然而，DPP4在SHPT中的功能尚不明确，本研究旨在分析DPP4在正常甲状旁腺组织与SHPT甲状旁腺组织的表达差异，并探讨其在SHPT中的表达及诊疗的临床意义。

1 材料与方法

1.1 临床资料

本研究共使用2017—2020年中南大学湘雅医院病理科获取的20例甲状旁腺组织样本，包括5例正常甲状旁腺组织和15例SHPT组织，组织均冻存于液氮中以便实验使用。随机选取2例正常甲状旁腺组织和5例SHPT组织进行RNA-seq测序，其余进行后续实验。15例SHPT组织来自以下患者：(1)CKD 5期；(2)SHPT患者在中南大学湘雅医院行甲状旁腺切除术，从恶性甲状腺手术中误切的甲状旁腺组织中获得5例正常甲状旁腺标本。所有标本分离后立即在无菌操作下装入低温保存管，标记患者病理编号和组织类型，-196℃液氮保存。另选取湘雅医院存档的52例甲状旁腺标本：其中继发性甲状旁腺亢进石蜡标本36例，甲状腺手术误切正常甲状旁腺石蜡标本16例，所有患者均为行甲状腺手术，术后病理证实为甲状旁腺。所有样本均经中南大学基础医学院伦理委员会批准（伦理编号：2022-KT175）。

1.2 方法

1.2.1 差异表达基因(differential expression genes, DEG)识别及功能分析 所有甲状旁腺组织样本均被送往北京华大基因组研究所进行高通量检测。纯化总RNA，并对其进行富集处理。使用RSEM工具进行基因定量表达分析，并用Noisseq方法（分别计算每个基因在处理组和对照组中的平均表达量，随后计算该基因在两组间的差异倍数以及偏离度概率值(probability, prob)，最后按照差异倍数 ≥ 2 及偏离概率值 ≥ 0.8 的标准筛选出差异表达基因)分析不同样本间基因定量表达结果的差异，从而识别出DEG。将所有DEG上传到DAVID数据库(www.david.ncifcrf.gov)进行GO功能注释和KEGG富集分析。

1.2.2 构建蛋白质-蛋白质相互作用网络(protein-protein interaction, PPI)网络 将514个 $|\log_2FC| \geq 2$ 及 $\text{prob} \geq 0.8$ 的DEG上传到STRING数据库(functional protein association networks, <https://string-db.org>)构建

PPI网络。使用默认参数进行网络构建(meaning of network edges: confidence; minimum required interaction score: 0.400)^[8-9]。此外，一些与其他基因交互过少的基因(即设定参数后，在生成的PPI网络中与其他基因并无关联的基因)也将被从网络中剔除。

1.2.3 识别核心基因 有研究^[10]表明，基因的重要性与其蛋白质在生物学过程中的重要程度直接相关。也就是说，越重要的蛋白质其基因越可能是核心基因。本研究使用Cytoscape软件探索PPI网络中的关键蛋白质。将PPI网络导入Cytoscape软件，利用“cytohubba”(一款可以通过多种拓扑算法探索PPI网络中核心基因的插件)中的EcCentricity拓扑算法识别关键基因。

1.2.4 qRT-PCR 用TRIzol法提取总RNA^[11]并测定RNA浓度，然后使用逆转录试剂盒(SureScript™ First-Strand cDNA Synthesis Kit, GeneCopoeia)合成同一质量的cDNA，按照All-in-One™ qRT-PCR Mix指令进行qRT-PCR。DPP4的引物正向：5'-TGG CGT GTT CAA GTG TGG AAT AGC-3'；反向：3'-ATG TTG GTG TGC TGT GCC TAG-5'。所有实验均重复3次。

1.2.5 Western blot 提取蛋白后，通过BCA法测定蛋白浓度，酶标仪测定每组孵育蛋白吸光值的平均值，并绘制相应的标准曲线，当标准曲线的 $R^2 \approx 0.99$ 时，可用标准曲线的计算公式来计算待测蛋白的浓度，将待测蛋白的吸光值代入标准曲线公式，计算蛋白浓度与上样体积。用10%SDS-PAGE分离蛋白，转移到聚偏二氟乙烯膜上。膜溶解于TBST的5%脱脂牛奶中，并与抗GAPDH的一抗(Proteintech, 1:2 000)和DPP4/CD26兔多克隆抗体(CST, 1:2 000)在4℃下孵育过夜。然后用TBST洗涤3次，每次10 min，用适当的二抗(Honorgene, 1:300)进一步孵育1 h，冲洗3次后，用ECL系统检测信号。

1.2.6 HE染色 制备厚度为3~4 μm的石蜡组织切片，用松节油脱蜡15 min，然后依次在无水乙醇、95%酒精和75%酒精中浸泡。切片染色5 min，碳酸锂染返蓝，流水冲洗5 min。伊红染色20 s，用水冲洗5 min，然后在无水乙醇、95%酒精、75%酒精中浸泡5 min，最后用中性树脂封片显微镜下观察。

1.2.7 免疫组化染色 对52例(SHPT组36例，正

常甲状旁腺组 16 例) 福尔马林石蜡包埋 (FFPE) 全组织切片进行免疫组化处理。将切片烘烤 12 h 候, 浸没于松节油中 10 min, 依次使用无水乙醇、蒸馏水、PBS 浸泡, 随后将切片放入 EDTA 抗原修复液 (pH 值 9.0) 中, 在高压锅中修复抗原 15 min, 降温后用免疫组化笔圈出组织, 加内源性过氧化物酶, 37 °C 烤箱孵育 20 min, 用 PBS 洗涤。全组织切片与一抗 4 °C 孵育过夜后使用 PBS 洗涤, 二抗室温孵育 20 min。随后依次使用 DAB 显色液孵育、苏木素染色、碳酸锂反蓝, 封片后显微镜下观察 DPP4 的表达。本研究使用的抗体为兔 DPP4/CD26 多克隆抗体 (CST, 1:200)。

1.3 统计学处理

数据由 SPSS 20.0 统计软件进行分析, 组间比较采用独立样本 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 DEG 识别及功能分析

使用 RSEM 工具对基因表达进行定量分析, 并采用 FPKM 方法计算表达量。最终识别出 1 323 个 DEG, 其中上调基因 648 个, 下调基因 675 个 (图 1)。GO 功能注释和 KEGG 富集分析如图 2 所示。GO 富集分析 (图 2A) 表明在细胞组分 (cellular component) 中, DEG 主要分布在细胞器和细胞膜; 在分子功能 (molecular function) 方面, 前 3 位的分别为结合、催化和信号转导; 而生物学过程 (biological process) 则主要集中在细胞活动、单生物活动和代谢活动。通路分析显示 DEG 主要富集在信号转导、癌症和免疫系统通路 (图 2B)。

2.2 PPI 网络构建

在构建 PPI 网络过程中, 有 95 个基因与其他基因交互过少而被剔除。最后, 共有 419 个节点 (每个节点代表 1 个 DEG) 构成了最终的 PPI 网络 (图 3)。核心基因的识别与验证通过第二代高通量测序技术共识别出了 1 323 个 DEG。为了研究这些 DEG 的生物学功能, 对所有 DEG 进行了 GO 功能注释和 KEGG 富集分析, 并通过构建 PPI 网络对它们进行进一步分析。最后将 PPI 网络导入 Cytoscape 进行筛选通过拓扑算法共识别出 10 个关键基因:

PDGFRA、ETV4、DPP4、TGM2、THBD、FOS、JUN、ANO1、MMP-9、DACT2。通过在 PubMed 等文献数据库中检索以及查阅相关网站 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>) 后发现 DPP4 是这 10 个基因中与内分泌系统联系最为密切的基因。因此, 选择 DPP4 作为核心基因并进行验证。

2.3 DPP4 在正常甲状旁腺组织中与 SHPT 组织中的表达

为了对比 DPP4 在正常甲状旁腺组织中与 SHPT 组织基因表达的差异, 本研究检测了 3 例正常甲状旁腺组织与 4 例 SHPT 组织, 发现 DPP4 mRNA 在 SHPT 患者甲状旁腺组织中表达较正常甲状旁腺组织明显升高 ($P=0.005 1$) (图 4A)。用 Western blot 在 3 例正常甲状旁腺组织与 6 例 SHPT 患者甲状旁腺组织, 以及用免疫组化在 16 例正常甲状旁腺组织与 36 例 SHPT 患者甲状旁腺组织中验证 DPP4 蛋白表达差异, Western blot 结果提示, DPP4 在 SHPT 患者甲状旁腺组织中的表达明显上调 ($P=0.005 1$) (图 4B); 免疫组化结果显示, DPP4 在 SHPT 组织中阳性率明显高于正常甲状旁腺组织 ($P=0.006 9$) (图 5)。

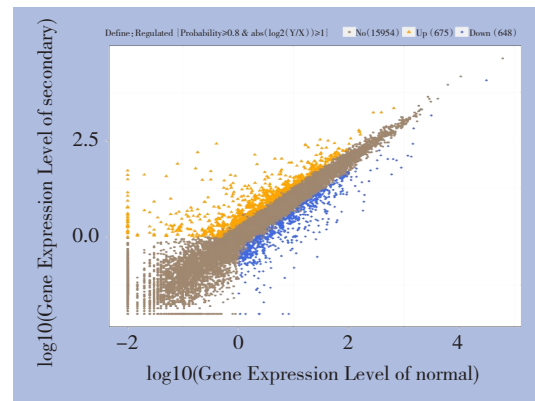


图 1 正常甲状旁腺组织和 SHPT 甲状旁腺组织基因表达散点图 (X、Y 坐标轴均取基因表达量的对数值, 蓝色表示下调基因, 橙色表示上调基因, 褐色则是非显著差异基因)

Figure 1 Scatter plots of gene expression in normal parathyroid tissue and SHPT parathyroid tissue (with logarithmic values on both the X and Y axes; blue representing down-regulated genes, orange representing up-regulated genes, and brown representing non-significantly different genes)

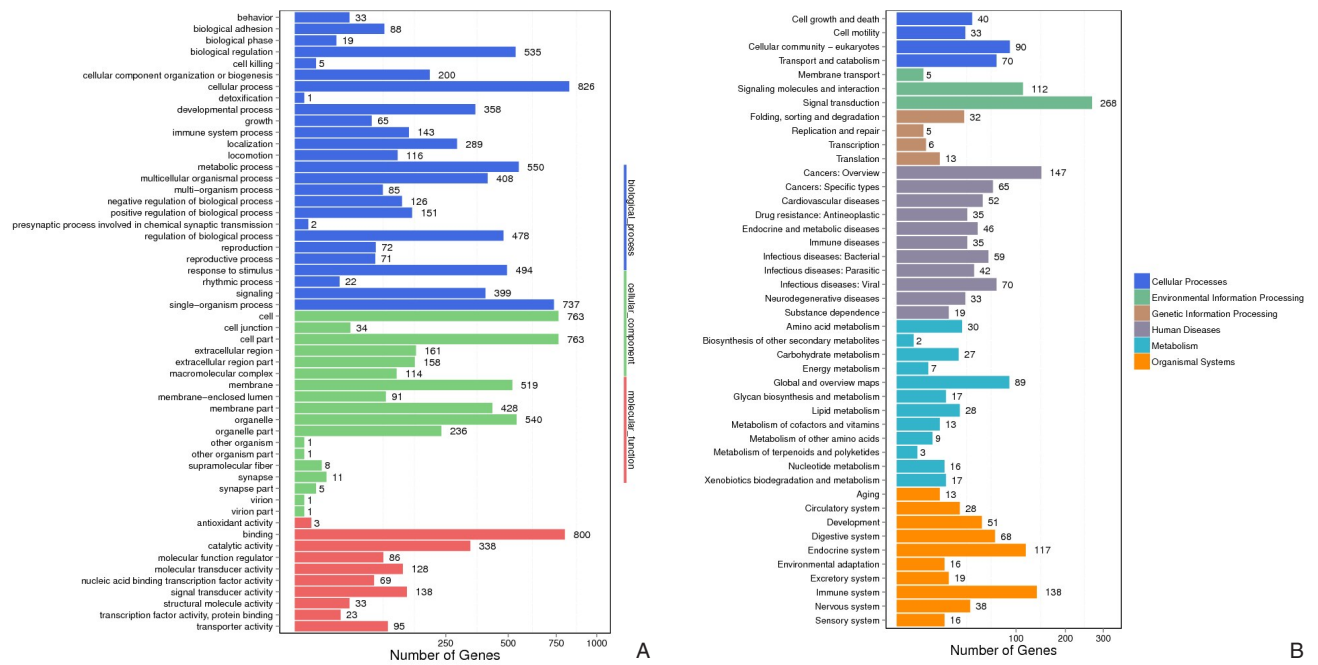


图2 GO功能注释和KEGG富集分析 A: GO分析(X轴代表DEG的数量,由平方根表示;Y轴表示GO注释项,蓝色代表生物学过程,棕色代表细胞组分,橙色代表分子功能);B: KEGG富集分析(X轴代表DEG的数量;Y轴表示二级KEGG通路,二级通路又分别属于不同的一级通路,图中用不同颜色表示一级通路类别)

Figure 2 GO functional annotation and KEGG enrichment analysis A: GO analysis (X-axis representing the number of DEGs, represented by the square root; Y-axis representing GO annotation items, with blue color standing for biological processes, brown color standing for cellular components, and orange color standing for molecular function); B: KEGG analysis (X-axis representing the number of DEGs; Y-axis representing second-level KEGG pathways, which are belong to different first-level pathway and represented by different colors in the graph)

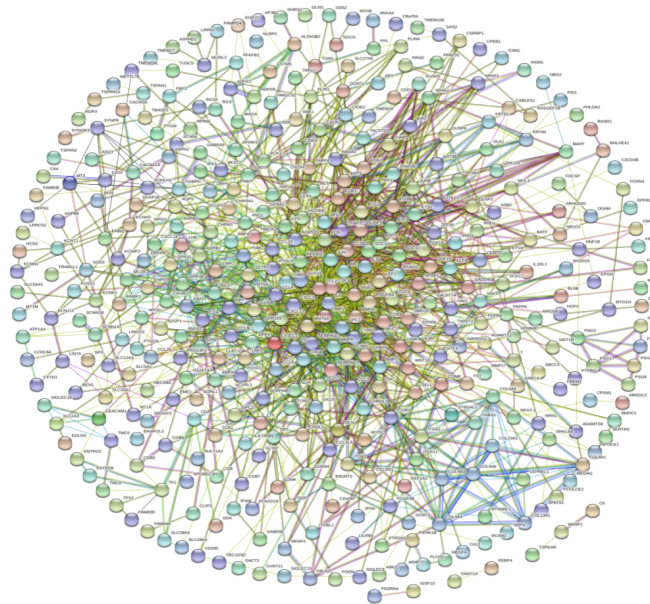


图3 PPI网络(每个节点代表由1个单一的蛋白质编码基因座产生的所有蛋白质;节点之间的线代表蛋白质与蛋白质之间的关联,其目的是具体而有意义的,即蛋白质共同促进了一个共同的功能,但这并不一定意味着它们相互之间有物理上的结合)

Figure 3 PPI network (each node representing all the proteins produced by a single protein-encoding gene locus; the lines between nodes representing the associations between proteins, with specific and meaningful purposes, indicating that the proteins collectively promote a common function, but this does not necessarily mean that they are physically bound to each other)

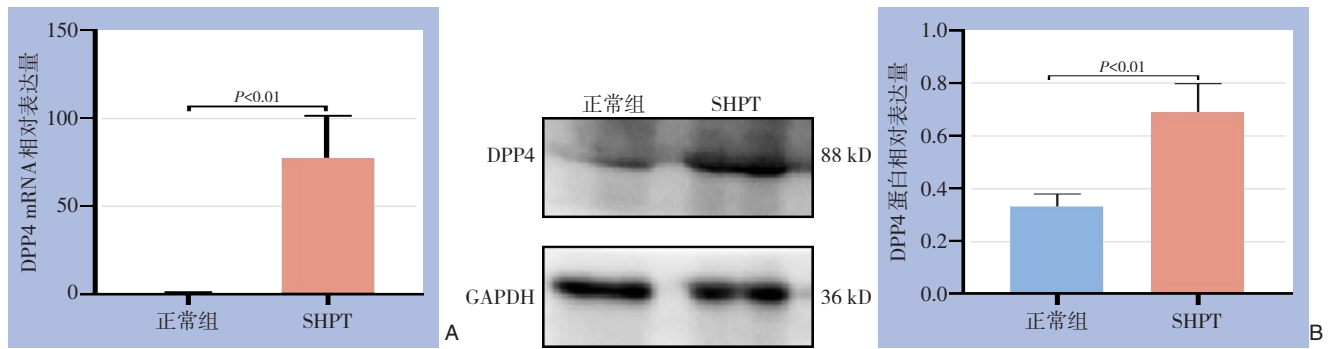


图4 DPP4在正常甲状旁腺组织与SHPT患者甲状旁腺组织中的表达 A: DPP4 mRNA的表达; B: DPP4蛋白的表达
Figure 4 Expression of DPP4 in normal parathyroid tissue and SHPT patient parathyroid tissue A: Expression of DPP4 mRNA; B: Expression of DPP4 protein

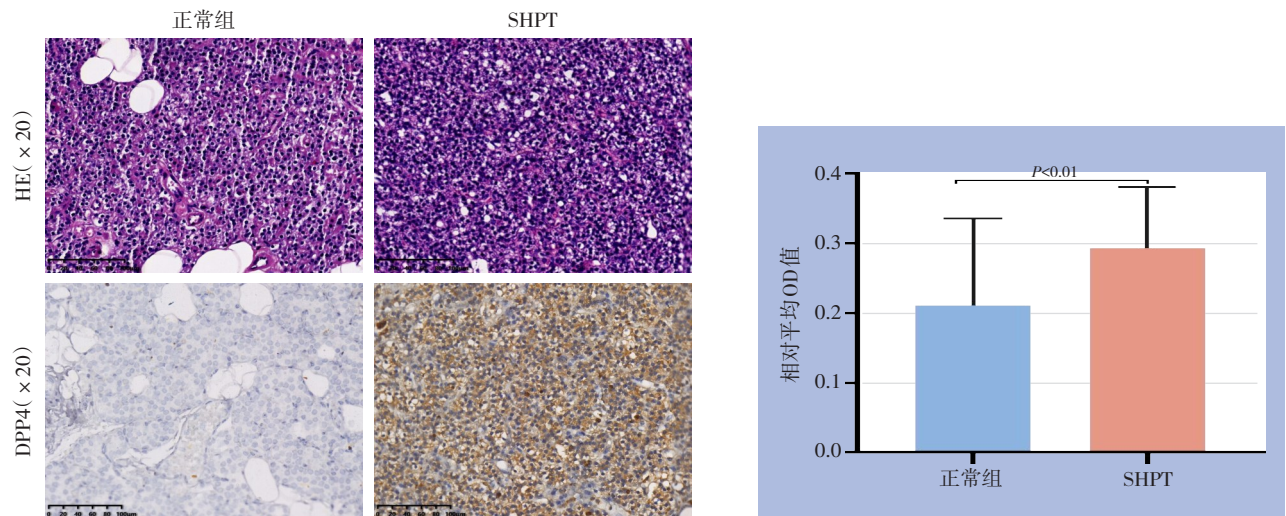


图5 正常甲状旁腺组织与SHPT患者甲状旁腺组织中DPP4蛋白的免疫组化检测

Figure 5 Immunohistochemical detection of DPP4 protein in normal parathyroid tissue and SHPT patient parathyroid tissue

3 讨论

SHPT是CKD患者的常见并发症之一,其症状包括PTH升高与矿物质代谢失衡以及维生素D和1,25-二羟基维生素D(1,25-(OH)₂D)的缺乏等^[12],研究^[13]表明,SHPT发展后骨折风险增加,极大降低了患者的生存质量。实验发现,成纤维细胞生长因子23(fibroblast growth factor 23, FGF-23)可在CKD大鼠模型中血清含量升高^[14],然而面对SHPT的治疗,若能破解SHPT的发病机制将为SHPT患者创造福祉。

本研究通过第二代高通量测序技术,共识别出了1323个DEG。为了研究这些DEG的生物学功能,对所有DEG进行了GO功能注释和KEGG富集分析,并通过构建PPI网络对它们进行进一步分析。最终发现其中的DPP4与内分泌疾病密切相关,有进一步研究的价值。

DPP4是一种II型跨膜蛋白,属于脯氨酸寡肽酶家族,在各种细胞表面^[4]和多种肿瘤细胞中广泛表达^[5]。在免疫系统中,DPP4表达于特定的淋巴细胞群,即CD4⁺CD45RO⁺记忆T细胞,并在T细胞激活后上调^[15-16]。除了作为T细胞激活的标志外,CD26还作为事实上的成本刺激分子与T细胞信号转导过程相关^[15]。

DPP4是一种细胞表面蛋白酶,属于脯氨酸寡肽酶家族。在一组特定的T淋巴细胞上表达,激活后上调^[16]。越来越多的实验发现DPP4的表达与多种疾病存在相关性,在肺癌^[17]和胶质瘤^[18]等肿瘤中具有诊疗或指导预后的意义,其表达水平与癌症进展和肿瘤恶性行为相关^[19-21]。DPP4抑制剂是晚期CKD患者常用的抗糖尿病药物^[22],其通过增加血清中胰高血糖素样肽1(glucagon-like peptide 1, GLP-1)浓度,从而增加胰岛素分泌,改善血糖控制^[23],由此可见,DPP4在内分泌系统疾病治疗中

已经发挥了一定作用。特定人群体内 DPP4 的活性与 PTH 含量呈正相关^[24]，已有研究^[25]发现，糖尿病患者发生 SHPT 的风险增加，在 2~4 期 CKD 患者中，与非糖尿病患者相比，糖尿病患者在 CKD 病程中发生 SHPT 的时间更早。故此，DPP4 或在 SHPT 的病程进展中发挥了重要作用。

抑制 DPP4 的活性已被证明可加强肠道溃疡的愈合^[26]，并增强了肠道内营养物质（如氨基酸）的作用，肠道内化合物通过释放内源激素 GLP-2 调节局部浓度和 DPP4 抑制提供了黏膜保护^[27-28]。CKD 患者中常可见肠道微生物组成和功能的改变以及肠道屏障功能的破坏^[29]，通过改善肠道环境，益生菌治疗既可以减少人和动物体内的尿毒症毒素（如硫酸吡啶酚和对甲酚）^[30-31]，又可以通过改善肠道环境来改善人和动物的肾功能^[32-33]，在 5/6 肾切除大鼠尿毒症动物模型中，已发现使用合生素改善肠道环境可以改善肾功能，这或许是 SHPT 的一种药物治疗方法^[34]。DPP4 的活性抑制或可通过肠道菌群的调控作用于 SHPT 的治疗。

本研究发现 DPP4 在 SHPT 患者的甲状旁腺组织内 mRNA 及蛋白水平的表达明显高于正常甲状旁腺组织，这意味着 DPP4 或是 SHPT 诊疗的关键分子。然而，有报道^[35]称，在缺血性心脏病中 PTH 可抑制 DPP4 的活性。事实上，不同疾病背后的调节机制十分复杂，或存在多种通路同时调控 PTH 与 DPP4 之间的关系，在不同的疾病背景下其调节方式侧重通路不同，可能呈现多种调节结果。由于甲状旁腺细胞培养的困难，本研究尚未在细胞层面上印证 DPP4 对于甲状旁腺细胞功能方面的影响和深层次的调节机制，今后将在后续研究中完善以及在动物实验中验证 DPP4 对于 SHPT 治疗的效果。综上所述，笔者认为 DPP4 可能参与 SHPT 的发展，或可作为 SHPT 治疗靶点分子之一。

利益冲突：所有作者均声明不存在利益冲突。

作者贡献声明：吴昕潮负责实验完成及分析、文章撰写；周文轩负责 DPP4 的筛选；杜瑶、程灵超、王暑负责标本收集；胡忠良提供科研思路、文章审校。

参考文献

[1] Xu Y, Evans M, Soro M, et al. Secondary hyperparathyroidism and adverse health outcomes in adults with chronic kidney disease[J].

Clin Kidney J, 2021, 14(10):2213-2220. doi: 10.1093/ckj/sfab006.

- [2] Fraser WD. Hyperparathyroidism[J]. Lancet, 2009, 374(9684):145-158. doi: 10.1016/S0140-6736(09)60507-9.
- [3] 余键涛, 夏发达, 戴斌, 等. 2022 版美国内分泌外科医师协会《继发性及三发性甲状旁腺功能亢进症确定性外科治疗指南》外科部分解读[J]. 中国普通外科杂志, 2022, 31(11):1405-1413. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2022.11.001.
- She JT, Xia FD, Dai B, et al. Interpretation of surgical part of American Association of Endocrine Surgeons "Guidelines for definitive surgical treatment of secondary and tertiary hyperparathyroidism" 2022 edition[J]. China Journal of General Surgery, 2022, 31(11): 1405-1413. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2022.11.001.
- [4] Röhrborn D, Wronkowitz N, Eckel J. DPP4 in diabetes[J]. Front Immunol, 2015, 6:386. doi: 10.3389/fimmu.2015.00386.
- [5] Enz N, Vliegen G, de Meester I, et al. CD26/DPP4 - a potential biomarker and target for cancer therapy[J]. Pharmacol Ther, 2019, 198:135-159. doi: 10.1016/j.pharmthera.2019.02.015.
- [6] Awal HB, Nandula SR, Domingues CC, et al. Linagliptin, when compared to placebo, improves CD34+ve endothelial progenitor cells in type 2 diabetes subjects with chronic kidney disease taking metformin and/or insulin: a randomized controlled trial[J]. Cardiovasc Diabetol, 2020, 19(1): 72. doi: 10.1186/s12933-020-01046-z.
- [7] Benetti A, Martins FL, Sene LB, et al. Urinary DPP4 correlates with renal dysfunction, and DPP4 inhibition protects against the reduction in megalin and podocin expression in experimental CKD[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2021, 320(3):F285-296. doi: 10.1152/ajprenal.00288.2020.
- [8] Bellosillo NA, Bachelier L, Villacian J. HIV drug resistance tests: an update on methods for calculating phenotypic fold change from a viral genotype[J]. Clin Infect Dis, 2009, 48(5):687. doi: 10.1086/597016.
- [9] Hou J, Chi X. Predicting protein functions from PPI networks using functional aggregation[J]. Math Biosci, 2012, 240(1): 63-69. doi: 10.1016/j.mbs.2012.06.002.
- [10] Ning K, Ng HK, Srihari S, et al. Examination of the relationship between essential genes in PPI network and hub proteins in reverse nearest neighbor topology[J]. BMC Bioinformatics, 2010, 11:505. doi: 10.1186/1471-2105-11-505.
- [11] Li DM, Ren WC, Wang X, et al. A modified method using TRIzol reagent and liquid nitrogen produces high-quality RNA from rat pancreas[J]. Appl Biochem Biotechnol, 2009, 158(2):253-261. doi: 10.1007/s12010-008-8391-0.
- [12] Cunningham J, Locatelli F, Rodriguez M. Secondary hyperparathyroidism: pathogenesis, disease progression, and therapeutic options[J]. Clin J Am Soc Nephrol, 2011, 6(4): 913-921. doi: 10.2215/CJN.06040710.
- [13] Geng S, Kuang Z, Peissig PL, et al. Parathyroid hormone independently predicts fracture, vascular events, and death in

- patients with stage 3 and 4 chronic kidney disease[J]. *Osteoporos Int*, 2019, 30(10):2019–2025. doi: [10.1007/s00198-019-05033-3](https://doi.org/10.1007/s00198-019-05033-3).
- [14] Hasegawa H, Nagano N, Urakawa I, et al. Direct evidence for a causative role of FGF23 in the abnormal renal phosphate handling and vitamin D metabolism in rats with early-stage chronic kidney disease[J]. *Kidney Int*, 2010, 78(10): 975–980. doi: [10.1038/ki.2010.313](https://doi.org/10.1038/ki.2010.313).
- [15] Ohnuma K, Dang NH, Morimoto C. Revisiting an old acquaintance: CD26 and its molecular mechanisms in T cell function[J]. *Trends Immunol*, 2008, 29(6):295–301. doi: [10.1016/j.it.2008.02.010](https://doi.org/10.1016/j.it.2008.02.010).
- [16] Lambeir AM, Durinx C, Scharpé S, et al. Dipeptidyl-peptidase IV from bench to bedside: an update on structural properties, functions, and clinical aspects of the enzyme DPP IV[J]. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 2003, 40(3):209–294. doi: [10.1080/713609354](https://doi.org/10.1080/713609354).
- [17] Jang JH, Janker F, de Meester I, et al. The CD26/DPP4-inhibitor vildagliptin suppresses lung cancer growth via macrophage-mediated NK cell activity[J]. *Carcinogenesis*, 2019, 40(2): 324–334. doi: [10.1093/carcin/bgz009](https://doi.org/10.1093/carcin/bgz009).
- [18] Han YD, Sun YX, Zhang YS, et al. High DPP4 expression predicts poor prognosis in patients with low-grade glioma[J]. *Mol Biol Rep*, 2020, 47(3):2189–2196. doi: [10.1007/s11033-020-05321-w](https://doi.org/10.1007/s11033-020-05321-w).
- [19] Havre PA, Abe M, Urasaki Y, et al. The role of CD26/dipeptidyl peptidase IV in cancer[J]. *Front Biosci*, 2008, 13:1634–1645. doi: [10.2741/2787](https://doi.org/10.2741/2787).
- [20] Pro B, Dang NH. CD26/dipeptidyl peptidase IV and its role in cancer[J]. *Histol Histopathol*, 2004, 19(4): 1345–1351. doi: [10.14670/HH-19.1345](https://doi.org/10.14670/HH-19.1345).
- [21] Cordero OJ, Salgado FJ, Nogueira M. On the origin of serum CD26 and its altered concentration in cancer patients[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2009, 58(11):1723–1747. doi: [10.1007/s00262-009-0728-1](https://doi.org/10.1007/s00262-009-0728-1).
- [22] Chen JJ, Wu CY, Jenq CC, et al. Association of glucagon-like peptide-1 receptor agonist vs dipeptidyl peptidase-4 inhibitor use with mortality among patients with type 2 diabetes and advanced chronic kidney disease[J]. *JAMA Netw Open*, 2022, 5(3):e221169. doi: [10.1001/jamanetworkopen.2022.1169](https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2022.1169).
- [23] Tolhurst G, Reimann F, Gribble FM. Nutritional regulation of glucagon-like peptide-1 secretion[J]. *J Physiol*, 2009, 587(1): 27–32. doi: [10.1113/jphysiol.2008.164012](https://doi.org/10.1113/jphysiol.2008.164012).
- [24] Kim SW, Cho EH. High levels of serum DPP-4 activity are associated with low bone mineral density in obese postmenopausal women[J]. *Endocrinol Metab (Seoul)*, 2016, 31(1): 93–99. doi: [10.3803/EnM.2016.31.1.93](https://doi.org/10.3803/EnM.2016.31.1.93).
- [25] Wahl P, Xie HL, Scialla J, et al. Earlier onset and greater severity of disordered mineral metabolism in diabetic patients with chronic kidney disease[J]. *Diabetes Care*, 2012, 35(5): 994–1001. doi: [10.2337/dc11-2235](https://doi.org/10.2337/dc11-2235).
- [26] Fujiwara K, Inoue T, Yorifuji N, et al. Combined treatment with dipeptidyl peptidase 4 (DPP4) inhibitor sitagliptin and elemental diets reduced indomethacin-induced intestinal injury in rats via the increase of mucosal glucagon-like peptide-2 concentration[J]. *J Clin Biochem Nutr*, 2015, 56(2): 155–162. doi: [10.3164/jcbn.14-111](https://doi.org/10.3164/jcbn.14-111).
- [27] Wang JH, Inoue T, Higashiyama M, et al. Umami receptor activation increases duodenal bicarbonate secretion via glucagon-like peptide-2 release in rats[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2011, 339(2):464–473. doi: [10.1124/jpet.111.184788](https://doi.org/10.1124/jpet.111.184788).
- [28] Inoue T, Wang JH, Higashiyama M, et al. Dipeptidyl peptidase IV inhibition potentiates amino acid- and bile acid-induced bicarbonate secretion in rat duodenum[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2012, 303(7):G810–816. doi: [10.1152/ajpgi.00195.2012](https://doi.org/10.1152/ajpgi.00195.2012).
- [29] Armani RG, Ramezani A, Yasir A, et al. Gut microbiome in chronic kidney disease[J]. *Curr Hypertens Rep*, 2017, 19(4): 29. doi: [10.1007/s11906-017-0727-0](https://doi.org/10.1007/s11906-017-0727-0).
- [30] Nakabayashi I, Nakamura M, Kawakami K, et al. Effects of synbiotic treatment on serum level of p-cresol in haemodialysis patients: a preliminary study[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2011, 26(3):1094–1098. doi: [10.1093/ndt/gfq624](https://doi.org/10.1093/ndt/gfq624).
- [31] Furuse SU, Ohse T, Jo-Watanabe A, et al. Galacto-oligosaccharides attenuate renal injury with microbiota modification[J]. *Physiol Rep*, 2014, 2(7):e12029. doi: [10.14814/phy2.12029](https://doi.org/10.14814/phy2.12029).
- [32] Ranganathan N, Ranganathan P, Friedman EA, et al. Pilot study of probiotic dietary supplementation for promoting healthy kidney function in patients with chronic kidney disease[J]. *Adv Ther*, 2010, 27(9):634–647. doi: [10.1007/s12325-010-0059-9](https://doi.org/10.1007/s12325-010-0059-9).
- [33] Yoshifuji A, Wakino S, Irie J, et al. Gut Lactobacillus protects against the progression of renal damage by modulating the gut environment in rats[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2016, 31(3):401–412. doi: [10.1093/ndt/gfv353](https://doi.org/10.1093/ndt/gfv353).
- [34] Iwashita Y, Ohya M, Yashiro M, et al. Dietary Changes Involving Bifidobacterium longum and Other Nutrients Delays Chronic Kidney Disease Progression[J]. *Am J Nephrol*, 2018, 47(5): 325–332. doi: [10.1159/000488947](https://doi.org/10.1159/000488947).
- [35] Huber BC, Brunner S, Segeth A, et al. Parathyroid hormone is a DPP-IV inhibitor and increases SDF-1-driven homing of CXCR4 (+) stem cells into the ischaemic heart[J]. *Cardiovasc Res*, 2011, 90(3):529–537. doi: [10.1093/cvr/cvr014](https://doi.org/10.1093/cvr/cvr014).

(本文编辑 宋涛)

本文引用格式: 吴昕潮, 周文轩, 程灵超, 等. 继发性甲状旁腺功能亢进疾病相关分子的筛选与验证[J]. 中国普通外科杂志, 2023, 32(3): 400–407. doi: [10.7659/j.issn.1005-6947.2023.03.009](https://doi.org/10.7659/j.issn.1005-6947.2023.03.009)

Cite this article as: Wu TC, Zhou WX, Cheng LC, et al. Screening and validation of molecules associated with secondary hyperparathyroidism[J]. *Chin J Gen Surg*, 2023, 32(3):400–407. doi: [10.7659/j.issn.1005-6947.2023.03.009](https://doi.org/10.7659/j.issn.1005-6947.2023.03.009)