

骨性关节炎 mRNA 差异表达谱及竞争性内源 RNA 调控的网络分析

<https://doi.org/10.3969/j.issn.2095-4344.3072>

李嘉程, 梁学振, 刘金豹, 许波, 李刚

2095-4344.3072

投稿日期: 2020-02-12

送审日期: 2020-02-22

采用日期: 2020-03-18

在线日期: 2020-09-25

中图分类号:

R446; R447; R363

文章编号:

2095-4344(2021)08-01212-06

文献标识码: B

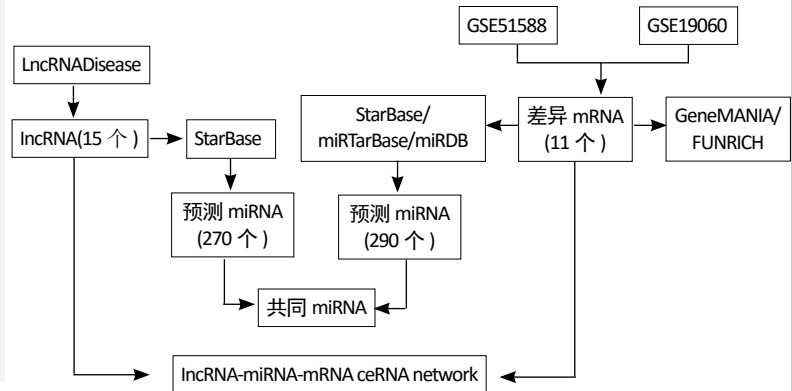
文章快速阅读:

文章特点—

△近年来关于微小RNA在骨性关节炎发病机制中起作用的研究很多,但是竞争性内源RNA在骨性关节炎中相关作用却鲜见报道;

△分析差异表达谱构建骨竞争性内源RNA,对骨性关节炎的发病机制进行研究,可寻找更有效的治疗和预防方法。

骨性关节炎相关的 lncRNA-miRNA-mRNA ceRNA 调控网络流程图



文题释义:

ceRNA 网络: 目前指出引起骨软骨关节炎的可能的原因包括: 软骨退变、自我吞噬、机械力学改变、软骨过度增生、内部免疫、氧化应激、疼痛等。

基因芯片: 基因芯片的测序原理是杂交测序方法, 即通过与一组已知序列的核酸探针杂交进行核酸序列测定的方法, 在一块基片表面固定了序列已知的靶核苷酸的探针。

摘要

背景: 目前指出引起骨软骨关节炎的可能的原因包括: 软骨退变、自我吞噬、机械力学改变、软骨过度增生、内部免疫、氧化应激及疼痛等。

目的: 骨性关节炎由多种因素导致关节软骨退行性疾病, 实验旨在通过生物信息学方法探讨骨性关节炎的发病机制。

方法: 检索GEO数据库中关于骨性关节炎的相关芯片数据集GSE1588和GSE19060, 借助R语言分析差异基因, 利用miRDB, miRDBase和StarBase数据库分别预测骨性关节炎相关mRNA的靶向miRNAs, 构建miRNA-mRNA调控网络, 采用GeneMANIA和FUNRICH对上述调控网络中的mRNA进行分析; 检索LncRNADisease病数据库与骨性关节炎相关的lncRNA, 利用Starbase数据库预测其miRNAs, 构建lncRNA-miRNA-mRNA ceRNA调控网络。

结果与结论: ①利用R语言分析共筛选出11个显著差异mRNA; ②通过miRDB, miRDBase和starBase和预测的靶向miRNA与上述11个差异mRNA交叉映射确定290个miRNAs参与骨性关节炎相关miRNA-mRNA调控网络的构建; ③在LncRNADisease数据库中检索到15个与骨性关节炎发病相关的lncRNA; ④利用Starbase数据库预测270个miRNAs, 构建出5个lncRNA, 106个miRNA和8个mRNA的lncRNA-miRNA-mRNA ceRNA调控网络, 通过FUNRICH得出7个主要的生物学过程和2条主要的信号通路; ⑤进一步分析显示, 差异表达mRNA主要和蛋白质代谢作用、细胞通讯、信号转导、免疫反应、新陈代谢、能量途径及细胞生长的生物学过程有关, 通过而参与骨性关节炎的发病过程, 为骨性关节炎治疗靶点的确定提供了思路。

关键词: 骨; 关节炎; 软骨; 基因; 免疫; RNA; 生物信息学; 数据挖掘; 调控网络

Differential mRNA expression profile and competitive endogenous RNA regulatory network in osteoarthritis

Li Jiacheng, Liang Xuezheng, Liu Jinbao, Xu Bo, Li Gang

First Clinical School of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250014, Shandong Province, China

Li Jiacheng, MD candidate, First Clinical School of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250014, Shandong Province, China

Corresponding author: Li Gang, MD, Professor, Chief physician, First Clinical School of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250014, Shandong Province, China

Abstract

BACKGROUND: The possible causes of osteochondroarthritis have been identified as cartilage degeneration, autophagy, mechanical changes, cartilage hypertrophy, internal immunity, oxidative stress, and pain.

山东中医药大学第一临床医学院, 山东省济南市 250014

第一作者: 李嘉程, 男, 1993年生, 山东省青岛市人, 汉族, 山东中医药大学在读博士。

通讯作者: 李刚, 医学博士, 教授, 主任医师, 山东中医药大学第一临床医学院, 山东省济南市 250014

<https://orcid.org/0000-0001-8122-1830> (李刚)

基金资助: 山东省中医经典名方协同创新开放课题(2019KFY7), 项目负责人: 李刚

引用本文: 李嘉程, 梁学振, 刘金豹, 许波, 李刚. 骨性关节炎 mRNA 差异表达谱及竞争性内源 RNA 调控的网络分析 [J]. 中国组织工程研究, 2021, 25(8):1212-1217.



OBJECTIVE: To explore the pathogenesis of osteoarthritis that is a degenerative disease of articular cartilage caused by a variety of factors.

METHODS: GSE51588 and GSE19060, the chip data sets related to osteoarthritis in GEO database, were retrieved, and differential genes were analyzed with the help of R language. miRDB, miRTarbase and StarBase databases were used to predict the targeted miRNAs of osteoarthritis related mRNAs respectively, and miRNA-mRNA regulatory network was constructed. GeneMANIA and FUNRICH were used to analyze the mRNAs mentioned in the regulatory network. lncRNA-miRNA-mRNA ceRNA regulatory network was constructed by retrieving LncRNADisease database and osteoarthritis related lncRNA, using Starbase database to predict their miRNAs.

RESULTS AND CONCLUSION: A total of 11 significantly differentially expressed mRNAs were screened by R language analysis. Through the cross-mapping of miRDB, miRTarbase and starBase and the predicted targeted miRNAs and the above 11 differentially expressed mRNAs, 290 miRNAs were identified to be involved in the construction of the miRNA-mRNA regulatory network related to osteoarthritis. Fifteen lncRNAs related to the pathogenesis of osteoarthritis were retrieved in the LncRNADisease database, 270 miRNAs were predicted using Starbase database, and the lncRNA-miRNA-mRNA ceRNA regulatory network consisting of 5 lncRNAs, 106 miRNAs and 8 mRNAs was constructed. Seven major biological processes and two major signaling pathways were obtained through FUNRICH. Finding from our further analysis indicate that differentially expressed mRNA is mainly related to the biological processes of protein metabolism, cell communication, signal transduction, immune response, metabolism, energy pathway and cell growth. By participating in the pathogenesis of osteoarthritis, it provides ideas for the determination of therapeutic targets for osteoarthritis.

Key words: bone; arthritis; cartilage; gene; immune; RNA; bioinformatics; data mining; regulatory network

Funding: the Shandong Provincial Collaborative Innovation Open Project for TCM Classic Famous Prescription, No. 2019KFY7 (to LG)

How to cite this article: LI JC, LIANG XZ, LIU JB, XU B, LI G. Differential mRNA expression profile and competitive endogenous RNA regulatory network in osteoarthritis. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu.* 2021;25(8):1212-1217.

0 引言 Introduction

骨性关节炎是由多种因素导致关节软骨的非炎症性退行性变及关节边缘骨赘形成,是一种常见的骨关节病变,多在老年人中出现,骨性关节炎的发病率较高,且病因尚不明确^[1],当今中国正逐渐步入老龄化社会,其患病率逐年上升。骨性关节炎已成为全世界中老年健康的严重威胁,这一公共卫生问题受到全球的广泛关注^[2]。临床上西医治疗骨性关节炎多采用药物治疗,包括非类固醇类镇痛消炎药、透明质酸钠和氨基葡萄糖等,但只能缓解症状,而且有些药物还有一定的不良反应^[3]。从临床治疗效果来看,目前针对骨性关节炎的药物仅仅局限于缓解及改善症状,却不能起到真正逆转和治愈的效果,此外,由于发生骨性关节炎的过程交错复杂,众多因素分子参与其中,目前难以发现有效的生物预测因子,使得上述治疗方法所使用的药物靶向性均不强。因此,深入理解骨性关节炎发生发展过程中的分子机制,探究潜在的治疗靶点,对于阐述其治病的科学性具有重要的意义。

目前研究证实,miRNA在骨性关节炎发病机制中起重要作用,可直接或间接调控软骨细胞表达,防止骨性关节炎退行性病变^[4],lncRNA-miRNA-mRNA ceRNA调控网络与类风湿性关节炎、肝癌、肺癌、帕金森病和膀胱癌的发生密切相关^[5-7]。然而,关于骨性关节炎的类似研究仍较缺乏。

实验通过生物信息学方法分析骨性关节炎发生相关差异表达基因,构建起长链非编码RNA(long non-coding RNA, lncRNA)、微小RNA(microRNA, miRNA)和mRNA之间的竞争性内源RNA(competing endogenous RNA, ceRNA)调控网络,并结合GeneMANIA和FUNRICH进行相关功能分析,为探索骨性关节炎的发病机制提供了理论依据。

1 资料和方法 Data and methods

1.1 设计 生物信息大数据整合分析。

1.2 时间及地点 于2019年11月至2020年1月在山东中医药大学附属医院实验室完成。

1.3 数据资料收集 在高通量基因表达(Gene Expression Omnibus, GEO)数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)检索,检索词为“Osteoarthritis”“Homo sapiens”,检索时间范围在2009年1月至2019年12月。从检索结果

中筛选软骨标本,根据检索结果从GEO数据库下载芯片GSE51588(平台GPL13497, Agilent-026652探针,全人类基因组芯片4x44K v2)和GSE19060(平台GPL570, Affymetrix人类基因组阵列U133 Plus 2.0)^[8-9]。数据集中纳入了58份样本,其中13份为人正常膝关节软骨样本,45份为人骨性关节炎软骨样本,下载芯片中矩阵及平台文件。

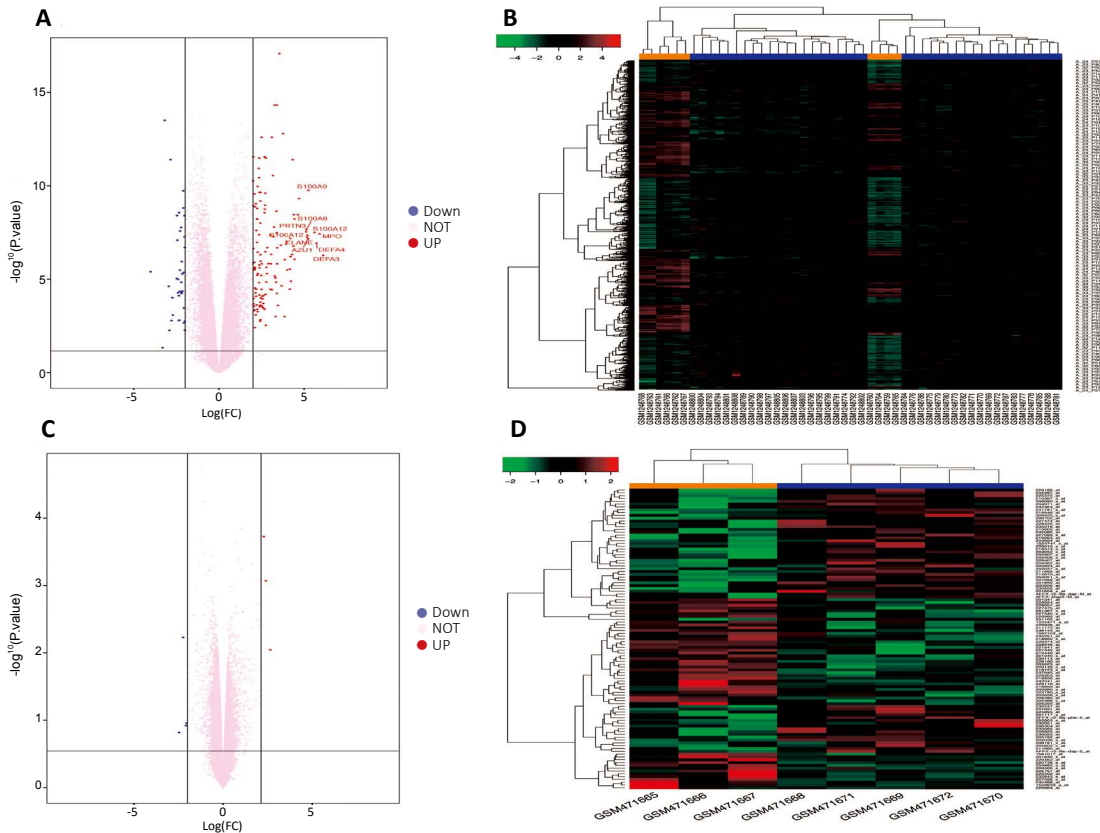
1.4 方法

1.4.1 差异表达基因筛选 运用R语言(版本3.6.2)软件RStudio(版本1.2.5033)的Limma包对GEO数据库下载的芯片进行差异基因的分析,以logFC(log₂ fold change, log₂差异倍数)>1或者<-1,并且校正后P<0.05为筛选参数,筛选出骨性关节炎软骨组织和正常组织中差异表达的mRNA,绘制差异表达的mRNA的热图和火山图。将芯片的差异表达mRNA取交集,logFC大于0代表此差异mRNA在骨性关节炎中上调,反之则为下调。

1.4.2 预测mRNA结合的miRNA 根据StarBase数据库(<http://starbase.sysu.edu.cn/index.php>)、miRTarBase数据库(<http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/php/index.php>)和miRDB数据库(<http://mirdb.org/>)预测调控差异mRNA的miRNA^[10-12]。miRDB数据库是一个用于miRNA目标预测和功能注释的在线数据库,其所有靶点都是通过对数千个miRNA-靶点相互作用(miRNA-target interactions, MTI)的高通量测序实验的分析而开发出来的。miRTarBase数据库是一个积累了36万多个经过实验验证的microRNA-mRNA靶向关系的数据库,其数据构建主要通过手工检索相关文献并系统地挖掘文本来筛选与miRNA功能研究相关的研究文章获得。starBase v3.0是一个开放源码平台,其从多维测序数据中识别出超过110万miRNA-ncRNA,250万miRNA-mRNA,210万RBP-RNA和150万RBP-RNA相互作用。

上述3个数据库中至少2个数据库预测得到的miRNA才纳入研究,以构建miRNA-mRNA调控网络。

1.4.3 预测lncRNA结合的miRNA 在LncRNADisease数据库(<http://www.cuilab.cn/lncrnadisease#fragment-1>)中搜索^[13],检索词为“Osteoarthritis”,得到与骨性关节炎相关的lncRNA,通过StarBase数据库(<http://starbase.sysu.edu.cn/index.php>),预测得到骨性关节炎的lncRNA-miRNA关联,以构建骨性关节炎



图注：以 $\log_{2}FC > 1$ 或者 < -1 ，并且校正后 $P < 0.05$ 为筛选标准制作火山图 (A, C)，红色的点代表显著上调基因，绿色代表显著下调基因，热图 (B, D) 橙色和蓝色分别代表正常和骨性关节炎对照

图 1 | GSE51588(A 和 B) 和 GSE19060(C 和 D) 差异表达 mRNA 的火山图和聚类图
Figure 1 | Volcano and cluster diagrams of differentially expressed mRNAs of GSE51588 (A and B) and GSE19060 (C and D)

炎可能的 lncRNA 相关的 ceRNA 网络，研究骨性关节炎可能的发病机制。

1.4.4 ceRNA 调控网络的构建 运用 Cytoscape 软件 (版本 3.7.1) 分别构建 miRNA-mRNA 和 lncRNA-miRNA 调控关系网络，运用 merge 功能得到 lncRNA-miRNA-mRNA 的 ceRNA 网络，连线代表节点之间存在调控关系。运用 Cytoscape 软件中的 GeneMANIA 插件预测与差异 mRNA 共表达的基因^[14]，构建网络。使用 FUNRICH 分析差异 mRNA 生物学过程和通路。

1.5 主要观察指标 检测的差异表达 mRNA 及生物学过程，ceRNA 构建情况。

1.6 统计学分析 实验运用 R 软件 (版本 3.6.2) 的 limma 包分析系列矩阵文件中的差异基因，以 $\log_{2}FC(\log_{2} \text{ fold change}, \log_{2} \text{ 差异倍数}) > 1$ 或者 < -1 ，并且校正后 $P < 0.05$ 为筛选参数。

2 结果 Results

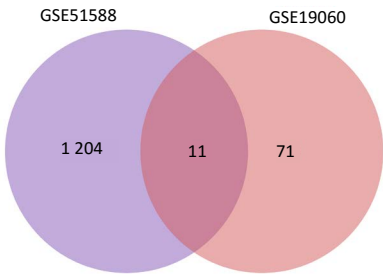
2.1 差异表达 mRNA 实验涵盖了 45 份人骨性关节炎软骨样本和 13 份人正常膝关节软骨样本，以 $\log_{2}FC > 1$ 或者 < -1 ，并且校正后 $P < 0.05$ 为筛选标准，将两个数据集分别进行差异分析，得到两组差异 mRNA，取交集得到共同差异基因，结果骨性关节炎组与正常组比较共获得 11 个差异表达的 mRNA (上调 6 个，下调 5 个)，使用 R 语言分别制作差异表达基因的火山图和热图，使用 jveen 软件 (<http://jvenn.toulouse.inra.fr/app/example.html>) 绘制韦恩图^[15]，见图 1, 2。

2.2 mRNA 预测的 miRNA 在 StarBase、miRTarBase 和 miRDB 数据库中至少 2 个数据库预测得到的 miRNA 才纳入研究，最

后得出 290 个预测 miRNA，见图 3。

2.3 差异表达 mRNA 的 ceRNA 网络 通过 LncRNADisease 数据库得到 15 个与骨性关节炎相关的 lncRNA，通过 StarBase 数据库，预测得到骨性关节炎的 lncRNA-miRNA 关联预测 miRNA 共 270 个。使用 Cytoscape v3.7.1 进行 lncRNA-miRNA-mRNA 网络构建，见图 4，其中包括差异表达 mRNA 8 个，共同预测 miRNA 106 个，有调控关系的 lncRNA 5 个。

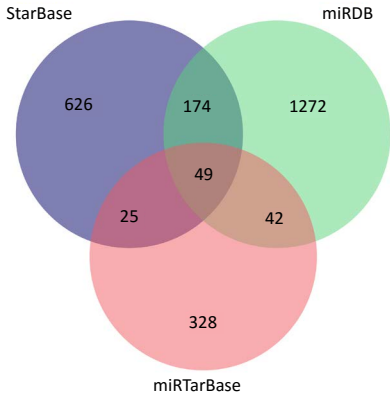
2.4 差异 mRNA 共表达基因及生物学过程预测 使用 Cytoscape v3.7.1 软件中的 GeneMANIA 插件对差异表达 mRNA 进行分析，结果显示共预测 20 个与差异 mRNA 共表达的基因，见图 5。通过对差异表达 mRNA 的分析发现，内质网应激相关蛋白 4(SFRP4) 在骨性关节炎过程显示出高表达，而有研究表明在成骨细胞中高表达的 SFRP4 转基因小鼠，发生了由于骨形成减少的骨量丢失，体外研究表明 SFRP4 对成骨细胞的增殖有抑制作用^[16]；重组人硫酸肝素 -3-O- 磺基转移酶 1(HS3ST1) 在骨性关节炎中低表达，有研究表明，内皮细胞中的 HS3ST1 是介导抗炎活性的成分之一，抗凝血酶在缺乏 HS3ST1 的脓毒性休克小鼠中未能诱发抗炎作用^[17]；丝甘蛋白聚糖 (SRGN) 参与调节卵巢癌耐药性的生物过程有基因表达、细胞生长、凋亡过程和细胞死亡，抑制 SRGN 基因表达可诱导乳腺癌细胞凋亡，并下调 JAK/STAT 信号通路蛋白的表达水平^[18-19]。使用 FUNRICH 分析差异 mRNA 生物学过程和通路，得出 7 个主要的生物学过程，见图 6，与蛋白质代谢作用、细胞通讯、信号转导、免疫反应、新陈代谢、能量途径及细胞生长有关，此外有 2 条主要的信号通路，分别是 TRAIL 信号通路和 mTOR 信号通路。



图注：图中交集为 11 个差异表达的 mRNA

图 2 | GSE51588 和 GSE19060 的差异表达 mRNA 的韦恩图

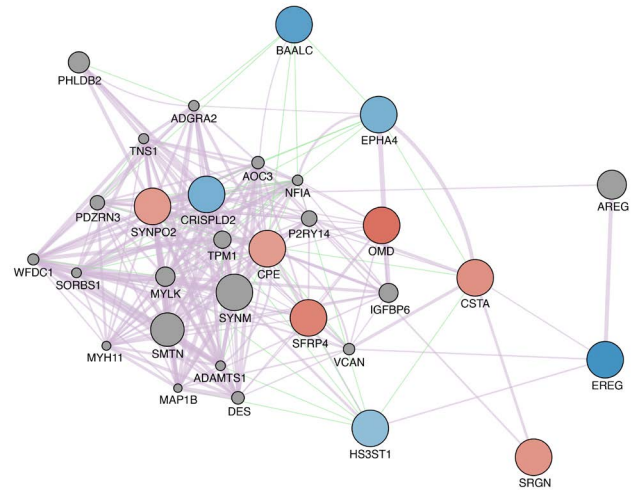
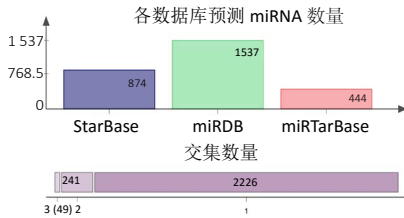
Figure 2 | Venn diagram of differentially expressed mRNAs of GSE51588 and GSE19060



图注：交集为 StarBase、miRTarBase 和 miRDB 数据库中至少 2 个数据库预测得到的 miRNA

图 3 | 差异表达 mRNA 预测的 miRNA 韦恩图

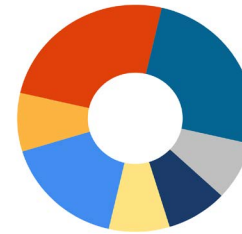
Figure 3 | Venn diagram of miRNAs predicted by differentially expressed mRNAs



图注：灰色圆圈代表共表达的 mRNA，圆圈大小代表相关性强弱。红色和蓝色的圆圈分别代表上调和下调的差异表达 mRNA

图 5 | 通过 GeneMANIA 功能对差异表达的 mRNA 分析后显示共表达网络

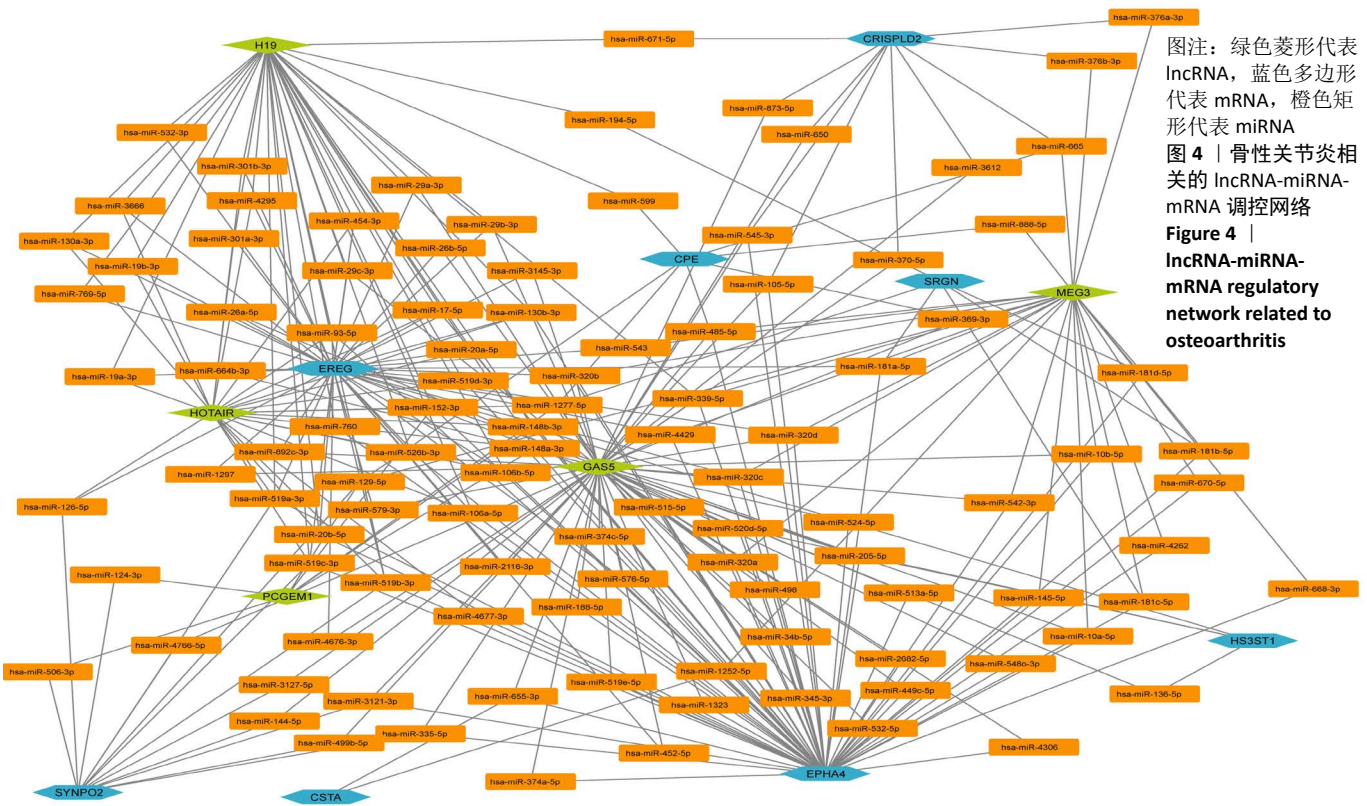
Figure 5 | Co-expression network of differentially expressed mRNAs analyzed using GeneMANIA



图注：差异表达的 mRNA 主要和蛋白质代谢作用、细胞通讯、信号转导、免疫反应、新陈代谢、能量途径及细胞生长的生物学过程有关

图 6 | FUNRICH 的分析功能得出差异表达的 mRNA

Figure 6 | Differentially expressed mRNAs obtained through FUNRICH analysis



图注：绿色菱形代表 lncRNA，蓝色多边形代表 mRNA，橙色矩形代表 miRNA

图 4 | 骨性关节炎相关的 lncRNA-miRNA-mRNA 调控网络

Figure 4 | lncRNA-miRNA-mRNA regulatory network related to osteoarthritis

3 讨论 Discussion

近年来,各种非编码 RNA 作为 ceRNA 成为针对多种疾病的一大研究热点, ceRNA 假说揭示了一种 RNA 间相互作用的新机制^[20]。miRNA 作为一个转录后调控的重要因子,其活性可被 lncRNA 通过“海绵”吸附的方式调控 ceRNA^[21]。lncRNA 作为 ceRNA 竞争性地与 miRNA 结合从而影响 miRNA 导致的基因沉默,从而调节编码基因的蛋白质水平,参与靶基因的表达调控, ceRNA 构建了一个复杂的作用网络,正常生理状态下 ceRNA 网络中的各种分子之间处于一定的平衡状态,一旦平衡被打破就会导致疾病的发生。

骨性关节炎是由多种因素引起的以关节软骨变性、骨质丢失、关节边缘骨赘形成及软骨下骨质增生为特征的慢性、渐进性、退行性关节疾病^[22]。目前在临床上治疗骨性关节炎的手段较多^[23],主要包括药物防治、饮食调控、运动疗法和手术治疗,但仍然未发现特效方法,这提示发掘骨性关节炎的病因和分子机制对于治疗和预防至关重要。如今,随着高通量测序和基因微阵列广泛应用于探究疾病的调控作用机制,能够在基因和蛋白表达水平上研究包括骨性关节炎在内的很多疾病。

为了更好地阐述 mRNA 在骨性关节炎中的潜在机制,实验利用 GEO 数据集 GSE51588 和 GSE19060 分析了骨性关节炎和正常组织的 mRNA 差异表达情况,共筛选出 11 个差异表达的 mRNA(6 个上调基因,5 个下调基因),通过 FUNRICH 分析发现,这些差异表达的 mRNA 与 2 个信号通路相关,其中哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)是一个重要的真核细胞信号,其稳定性影响 T 细胞中细胞因子的表达,参与免疫抑制,影响转录和蛋白质合成,调节细胞的生长、凋亡和自噬等。哺乳动物雷帕霉素靶蛋白抑制剂已经应用于实体瘤、器官移植、类风湿关节炎等疾病等治疗研究中^[24]。虽然现在普遍认为哺乳动物雷帕霉素靶蛋白信号在哺乳动物衰老中起着关键作用,但发生这种情况的机制仍不清楚。有证据表明,哺乳动物雷帕霉素靶蛋白复合体 1 抑制 mRNA 翻译,减少蛋白毒性和氧化应激的积累,延缓衰老,而抑制哺乳动物雷帕霉素靶蛋白复合体 1,可以增加自噬,进而减缓衰老,有助于清除受损的蛋白质和线粒体等细胞器,减少衰老因子的累积及相关疾病的发生^[25]。其中抑制细胞凋亡途径为研制骨性关节炎治疗药物提供了潜在的靶点。肿瘤坏死因子相关的凋亡诱导配体(TNF-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL)是肿瘤坏死因子超家族一员,最主要的生物学特征是选择性细胞毒性,其信号通路包括凋亡信号传导通路、生存信号传导通路以及线粒体调控枢纽^[26],在骨关节炎中的软骨也有所表达^[27]。软骨细胞凋亡是一个多细胞因子、多信号传导通路共同参与的复杂病理过程。此外,自噬和细胞凋亡之间的相互关系,以及 miRNA 参与的 mTOR 及 TRAIL 信号通路在凋亡调控中的新发现等都将为骨性关节炎的干预和治疗提供新的思路。

有文章指出引起骨软骨关节炎的可能原因包括:软骨

退变、自我吞噬、机械力学改变、软骨过度增生、内部免疫、氧化应激及疼痛等^[28]。软骨细胞是关节软骨中惟一的细胞,关节软骨的稳定依赖于软骨细胞,而软骨细胞又可以维持细胞外基质的平衡。因此,损害软骨细胞的功能和存活将会导致关节软骨的损害^[29],骨性关节炎在疾病发展变化的过程中最先侵犯关节软骨,其生物学机制在骨性关节炎的病程中起着关键作用。

通过 FUNRICH 分析发现,差异表达的 mRNA 主要和蛋白代谢作用、细胞通讯、信号转导、免疫反应、新陈代谢、能量途径及细胞生长的生物学过程有关。①蛋白质代谢:骨性关节炎的发生主要是由软骨细胞凋亡和细胞外基质降解引起^[30],且二者密切相关,细胞外基质主要由组织液、II 型胶原和蛋白多糖组成,细胞外基质在关节软骨生理病理变化中具有重要作用,参与调节软骨的合成和分解代谢平衡等生物学过程;②免疫反应:体液和细胞免疫在骨性关节炎的发展中具有重要的作用,有报道表明,在骨性关节炎患者滑膜组织中出现单核细胞浸润,并显示主要含有 CD3⁺T 细胞。研究还发现,T 淋巴细胞在滑膜中会出现早期、中期和晚期的活化标记^[31],这些结果表明,在大多数骨性关节炎患者中存在免疫应答这一生物学过程;③细胞通讯、信号转导及细胞生长。有研究发现,骨关节炎的发生是在宏观生物力学改变的基础上,启动了细胞通讯系统中的细胞转导通路机制,激发了程序化的“破坏与修复”机制,其中软骨细胞凋亡、分解代谢酶、自由基以及相关细胞因子的免疫应答有可能就是其发病的“轴心”机制^[32]。

实验仍有一定的局限性,主要表现在以下几个方面:首先,纳入的样本数量有限,这可能导致筛选的 lncRNA, miRNAs 和 mRNAs 的数量有所偏差,所分析的生物学过程也有所缺失,如有研究发现多种细胞因子(神经生长因子及胰岛素样生长因子等)在骨性关节炎的发生发展中起着重要的作用^[33-34],下一步该课题组将进一步扩大样本来证实上述结果;其次,实验结果仅涉及骨性关节炎软骨标本,其他样本来源(如骨组织及韧带组织)将进一步研究以更加准确地阐释骨性关节炎的生理病理过程;最后,实验仅对骨性关节炎的基因表达芯片进行分析,而未分析 RNA 测序数据,缺乏识别新特征的能力。

综上所述,骨性关节炎是一种由多种因素导致的关节疾病,发病机制复杂。实验通过整合分析骨性关节炎软骨中 mRNA 表达差异,通过预测成功地构建了 lncRNA 相关的 ceRNA 调控网络,揭示了 5 个 lncRNA 可能通过 106 个 miRNA 间接调控差异表达的 mRNA 而参与骨性关节炎的发病过程,为骨性关节炎的作用机理研究提供了新的思路,为其治疗提供了潜在的靶点。然而,未来还需要进一步的实验研究来验证这一调控效应。

作者贡献:第一作者负责论文的设计、构思和成文。第二作者负责芯片数据的提取和整理。第三作者负责数据的校对和与分析。第四作者负责图形可视化分析与英文翻译。第五作者为通讯作者,负责审阅文章

质量并提供软件技术支持。

经费支持: 该文章接受了“山东省中医经典名方协同创新开放课题(2019KFY7)”的资助。所有作者声明, 经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

利益冲突: 文章的全部作者声明, 在课题研究和文章撰写过程, 没有因其岗位角色影响文章观点和对数据结果的报道, 不存在利益冲突。

写作指南: 该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

文章查重: 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行3次查重。

文章外审: 文章经小同行外审专家双盲外审, 同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

生物统计学声明: 文章统计学方法已经通过山东中医药大学第一临床医学院生物统计学专家审核。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章, 根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享 4.0”条款, 在合理引用的情况下, 允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展, 同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献, 并为之建立索引, 用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

4 参考文献 References

[1] 夏聪敏, 许波, 李刚, 等. 基于网络药理学探讨桂枝芍药知母汤治疗骨性关节炎的分子机制 [J]. 中华中医药学刊, 2018, 36(11): 2681-2684.

[2] 李嘉程, 许波, 李刚, 等. 基于网络药理学研究杜仲抗骨质疏松的分子机制 [J]. 中国现代中药, 2018, 20(8): 28-34.

[3] 王利群, 康坤丽. 膝关节骨性关节炎中医治疗进展 [J]. 中医临床研究, 2015, 15(15): 114-117.

[4] 何仁豪. 骨性关节炎发病机制及与 microRNA 相关性研究进展 [J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2012, 26(11): 1045-1047.

[5] FANG XN, YIN M, LI H, et al. Comprehensive analysis of competitive endogenous RNAs network associated with head and neck squamous cell carcinoma. *Sci Rep.* 2018; 8(1): 10544.

[6] JIANG H, MA R, ZOU S, et al. Reconstruction and analysis of the lncRNA-miRNA-mRNA network based on competitive endogenous RNA reveal functional lncRNAs in rheumatoid arthritis. *Mol Biosyst.* 2017; 13(6): 1182.

[7] SUI J, LI YH, ZHANG YQ, et al. Integrated analysis of long non-coding RNA associated ceRNA network reveals potential lncRNA biomarkers in human lung adenocarcinoma. *Int J Oncol.* 2016; 49(5): 2023.

[8] CHOU CH, WU CC, SONG IW, et al. Genome-wide expression profiles of subchondral bone in osteoarthritis. *Arthritis Res Ther.* 2013; 15(6): R190.

[9] SUN Y, MAUERHAN DR, HONEYCUTT PR, et al. Analysis of meniscal degeneration and meniscal gene expression. *BMC Musculoskeletal Disorders.* 2010; 11(1): 19-20.

[10] LI JH, LIU S, ZHOU H, et al. Starbase v2.0: Decoding miRNA-ceRNA, miRNA-ncRNA and protein-RNA interaction networks from large-scale clip-seq data. *Nucleic Acids Res.* 2013; 42(Database issue): D92-D97.

[11] CHOU CH, CHANG NW, SHRESTHA S, et al. miRTarBase 2016: updates to the experimentally validated miRNA-target interactions database. *Nucleic Acids Res.* 2016; 44(Database issue): D239-D247.

[12] WONG N, WANG X. miRDB: an online resource for microRNA target prediction and functional annotations. *Nucleic Acids Res.* 2015; 43(Database issue): D146-D152.

[13] GENG C, ZIYUN W, DONGQING W, et al. lncRNADisease: a database for long-non-coding RNA-associated diseases. *Nucleic Acids Res.* 2013; 41(Database issue): D983-D986.

[14] MONTOJO J, ZUBERI K, RODRIGUEZ H, et al. GeneMANIA Cytoscape plugin: fast gene function predictions on the desktop. 2010; 26(22): 2927.

[15] BARDOU P, MARIETTE J, ESCUDIÉ F, et al. jvenn: an interactive Venn diagram viewer. *BMC Bioinformatics.* 2014; 15(1): 293.

[16] NAKANISHI R, AKIYAMA H, KIMURA H, et al. Osteoblast-Targeted Expression of Sfrp4 in Mice Results in Low Bone Mass. *J Bone Miner Res.* 2008; 23(2): 271-277.

[17] YANG L, DINARVAND P, QURESHI SH, et al. Engineering D-helix of antithrombin in alpha-1-proteinase inhibitor confers antiinflammatory properties on the chimeric serpin. *Thromb Haemost.* 2014; 112(7): 164-175.

[18] 马剑锋, 张艳彩, 孙慧. 下调 SRGN 基因表达对乳腺癌细胞凋亡及 JAK/STAT 信号通路的影响 [J]. 癌症进展, 2018, 16(6): 698-701.

[19] 许丁文, 熊彦, 严慧深, 等. 基于生物信息学分析丝甘蛋白聚糖对卵巢癌耐药性的影响及作用机制 [J]. 中国药房, 2019, 30(1): 46-51.

[20] SALMENA L, POLISENO L, TAY Y, et al. A ceRNA Hypothesis: The Rosetta Stone of a Hidden RNA Language? *Cell.* 2011; 146(3): 358.

[21] BALLANTYNE MD, MCDONALD R, BAKER A. lncRNA/MicroRNA interactions in the vasculature. *Clin Pharm Ther.* 2016; 99(5): 494-501.

[22] 李西海, 刘献祥. 骨关节炎的核心病机 — 本痿标痹 [J]. 中医杂志, 2014, 55(14): 1248-1249.

[23] 郑晓芬. 骨关节炎发病机制和治疗的最新进展 [J]. 中国组织工程研究, 2017, 21(20): 3255-3262.

[24] SAXTON RA, SABATINI DM. mTOR Signaling in growth, metabolism, and disease. *Cell.* 2017; 168(6): 960-976.

[25] LAPLANTE M, SABATINI DM. mTOR signaling at a glance. *J Cell Sci.* 2009; 122(3): 301-304.

[26] JIN Z, EL-DEIRY WS. Distinct Signaling Pathways in TRAIL- versus Tumor Necrosis Factor-Induced Apoptosis. *Mol Cell Biol.* 2006; 26(21): 8136-8148.

[27] LEE SY, KOO JM, YOO HS, et al. The expression of TRAIL and its receptors in human osteoarthritic cartilages. *Korean J Med.* 2008; 74: 296-304.

[28] GOLDRING MB, BERENBAUM F. Emerging targets in osteoarthritis therapy. *Curr Opin Pharm.* 2015; 22: 51-63.

[29] 许颖, 范凯健, 王婷玉. 骨关节炎的发病机制及其药物治疗进展 [J]. 实用药物与临床, 2018, 21(12): 104-109.

[30] CHEN D, SHEN J, ZHAO W, et al. Osteoarthritis: toward a comprehensive understanding of pathological mechanism. *Bone Res.* 2017; 5: 16044.

[31] GEURTS J, PATEL A, HIRSCHMANN MT, et al. Elevated marrow inflammatory cells and osteoclasts in subchondral osteosclerosis in human knee osteoarthritis. *J Orthop Res.* 2016; 34(2): 262-269.

[32] 张文贤, 王小燕, 冯康虎, 等. 创伤性骨关节炎软骨细胞损坏与修复机制 [J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(46): 8727-8732.

[33] SHANG X, WANG Z, TAO H. Mechanism and therapeutic effectiveness of nerve growth factor in osteoarthritis pain. *Ther Clin Risk Manag.* 2017; 13: 951-956.

[34] NI Q, TAN Y, ZHANG X, et al. Prenatal ethanol exposure increases osteoarthritis susceptibility in female rat offspring by programming a low-functioning IGF-1 signaling pathway. *Sci Rep.* 2015; 5: 14711.