

骨关节炎坏死性凋亡关键基因的筛选与验证

袁长深¹, 官岩兵², 李哲², 容伟明², 廖书宁², 陈乐伟², 梅其杰¹, 段戡¹<https://doi.org/10.12307/2023.141>

投稿日期: 2022-04-12

采用日期: 2022-05-26

修回日期: 2022-06-08

在线日期: 2022-06-23

中图分类号:

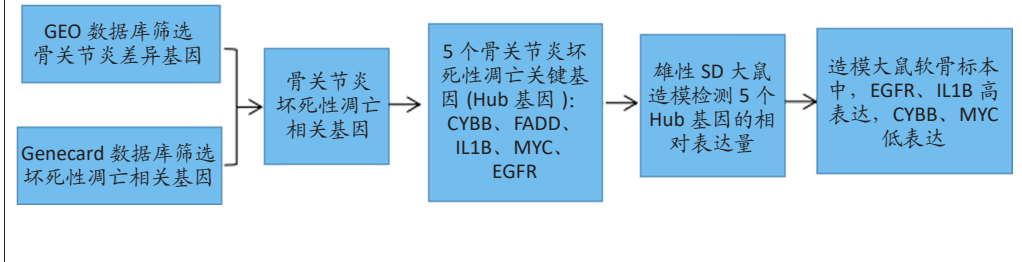
R459.9; R319; R684.3

文章编号:

2095-4344(2023)05-00695-06

文献标识码: A

文章快速阅读: 基于生物信息学及动物实验筛选并验证骨关节炎坏死性凋亡的关键基因



文题释义:

骨关节炎:是一种与慢性、低度炎症相关的退行性关节疾病,好发于中老年人群,常伴有关节疼痛、活动困难等症状,甚至会引起残疾而导致劳动力丧失。

坏死性凋亡:是一种由死亡受体介导、具有广泛炎症特性并受RIPK1-RIPK3-MLKL复合物严格调控的新型细胞死亡途径,可引发疼痛、细胞外基质受损及软骨破坏等典型骨关节炎表现。

摘要

背景:骨关节炎与慢性、低度炎症密切相关。坏死性凋亡是一种具有广泛炎症特性的新型细胞死亡途径,可影响骨关节炎进展,但目前尚未发现骨关节炎坏死性凋亡的相关靶点。

目的:基于生物信息学挖掘骨关节炎坏死性凋亡关键基因,并利用动物实验加以验证,为从坏死性凋亡角度防治骨关节炎提供新的靶点。
方法:分别从GEO数据库与GeneCards数据库筛选出骨关节炎相关基因和坏死性凋亡相关基因,继而对两者取交集获得骨关节炎坏死性凋亡基因,进一步进行GO及KEGG富集分析,构建PPI网络,通过Cytoscape软件的5种计算方法获得骨关节炎坏死性凋亡关键基因(Hub基因),最后选用雄性SD大鼠建立膝关节骨关节炎中期模型,通过RT-PCR检测Hub基因在SD大鼠骨关节炎中期模型中的表达情况。

结果与结论:①共筛选出38个骨关节炎坏死性凋亡基因,GO及KEGG分析发现其主要在白细胞活性、T细胞受体及白细胞介素17信号通路等方面显著富集;通过Cytoscape的5种不同算法筛选出CYBB、FADD、IL1B、MYC及EGFR 5个Hub基因;②RT-PCR检测结果显示,与正常对照组比较,雄性SD大鼠骨关节炎中期模型软骨中EGFR、IL1B基因呈高表达($P < 0.05$),CYBB、MYC基因呈低表达($P < 0.05$),FADD基因表达无明显变化($P > 0.05$);③结果显示,CYBB、IL1B、MYC及EGFR可作为骨关节炎坏死性凋亡的关键基因,有望成为防治骨关节炎的新靶点。

关键词:骨关节炎;坏死性凋亡;关键基因;生物信息学;实验验证

Screening and verification of key genes of necroptosis in osteoarthritis

Yuan Changshen¹, Guan Yanbing², Li Zhe², Rong Weiming², Liao Shuning², Chen Lewei², Mei Qijie¹, Duan Kan¹

¹Third Department of Orthopedics, The First Affiliated Hospital of Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530023, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China; ²Graduate School, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530000, Guangxi Zhuang Autonomous Region

Yuan Changshen, Master, Associate chief physician, Third Department of Orthopedics, The First Affiliated Hospital of Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530023, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Corresponding author: Duan Kan, MD, Chief physician, Third Department of Orthopedics, The First Affiliated Hospital of Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530023, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Abstract

BACKGROUND: Osteoarthritis is closely related to chronic and low-grade inflammation. Necroptosis is a new cell death pathway with extensive inflammatory characteristics, which can affect the progression of osteoarthritis, but the related targets of necroptosis in osteoarthritis have not been found.

OBJECTIVE: To explore the key genes of necroptosis in osteoarthritis based on bioinformatics and verify them with animal experiments, so as to provide new targets for the prevention and treatment of osteoarthritis from the perspective of necroptosis.

¹广西中医药大学第一附属医院骨三科, 广西壮族自治区南宁市 530023; ²广西中医药大学研究生院, 广西壮族自治区南宁市 530000

第一作者: 袁长深, 男, 1978年生, 硕士, 副主任医师, 主要从事骨与关节疾病的基础与临床研究。

通讯作者: 段戡, 博士, 主任医师, 广西中医药大学第一附属医院骨三科, 广西壮族自治区南宁市 530023

<https://orcid.org/0000-0001-5749-9859> (袁长深)

基金资助: 国家自然科学基金(82060875), 项目负责人: 袁长深; 国家自然科学基金(82160912), 项目负责人: 段戡; 广西中医药大学自然科学基金项目(2019QN022), 项目负责人: 袁长深; 中医学广西一流学科(桂教科研[2018]12号)(2019XK030), 项目负责人: 袁长深

引用本文: 袁长深, 官岩兵, 李哲, 容伟明, 廖书宁, 陈乐伟, 梅其杰, 段戡. 骨关节炎坏死性凋亡关键基因的筛选与验证 [J].

中国组织工程研究, 2023, 27(5):695-700.



METHODS: Osteoarthritis- and necroptosis-related genes were screened from GEO database and GeneCard database respectively, and then the intersection of them was taken to obtain osteoarthritic necroptosis genes. Gene ontology and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes enrichment analyses were further carried out to construct a protein-protein interaction network. The key genes of osteoarthritic necroptosis (Hub genes) were identified through five calculation methods using Cytoscape software. Finally, male Sprague-Dawley rats were selected to metaphase models of osteoarthritis. The expression of Hub genes in the metaphase models of osteoarthritis of male Sprague-Dawley rats detected by RT-PCR.

RESULTS AND CONCLUSION: A total of 38 osteoarthritic necroptosis genes were identified. Gene ontology and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes enrichment analyses showed that they were significantly enriched in leukocyte activity, T cell receptor and interleukin-17 signal pathway. Five Hub genes, CYBB, FADD, IL1B, MYC and EGFR, were screened by the five different algorithms of Cytoscape. RT-PCR showed that EGFR and IL1B were highly expressed in the metaphase models of osteoarthritis of male Sprague-Dawley rats ($P < 0.05$), while CYBB and MYC were lowly expressed ($P < 0.05$), but FADD had no significant changes ($P > 0.05$). To conclude, CYBB, IL1B, MYC, and EGFR, as the key genes of osteoarthritic necroptosis, are expected to become new targets for the prevention and treatment of osteoarthritis.

Key words: osteoarthritis; necroptosis; key gene; bioinformatics; experiment validation

Funding: the National Natural Science Foundation of China, Nos. 82060875 (to YCS) and 82160912 (to DK); the Natural Science Research Project of Guangxi University of Chinese Medicine, No. 2019QN022 (to YCS); Guangxi First-Class Discipline of Traditional Chinese Medicine, No. 2019XK030 (to YCS)

How to cite this article: YUAN CS, GUAN YB, LI Z, RONG WM, LIAO SN, CHEN LW, MEI QJ, DUAN K. Screening and verification of key genes of necroptosis in osteoarthritis. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2023;27(5):695-700.

0 引言 Introduction

骨关节炎是一种好发于中老年人群的慢性、退行性关节疾病,常伴有关节疼痛、活动困难等症状,甚至会引起残疾而导致劳动力丧失。目前全世界范围内罹患骨关节炎的人数超过 2.5 亿^[1],在 60 岁以上人群中,约有 10% 的男性和 18% 的女性受其困扰^[2]。虽然骨关节炎发病原因不明,但随着研究不断深入,骨关节炎被定义为一种慢性、低度炎症性疾病的观点逐渐为人们所接受。骨关节炎中的慢性、低度炎症参与关节软骨破坏,而被破坏的软骨则会进一步损伤关节中平滑的骨骼连接结构,导致软骨下骨硬化及骨赘形成等,加快骨关节炎进展^[3-4]。因而,从炎症角度探索骨关节炎的发病机制就显得尤为重要。

坏死性凋亡是一种由死亡受体介导、具有广泛炎症特性并受 RIPK1-RIPK3-MLKL 复合物严格调控的新型细胞死亡途径,常引发疼痛、细胞外基质受损及软骨破坏等典型骨关节炎表现^[5-6]。在骨关节炎软骨中,受肿瘤坏死因子 α 等炎症因子刺激后,坏死性凋亡标志物 RIPK1 及 RIPK3 表达上调^[7],抑制坏死性凋亡可明显减轻关节软骨破坏,延缓骨关节炎进展^[8],有效证实了坏死性凋亡在骨关节炎发展进程中发挥重要作用。目前有关骨关节炎坏死性凋亡的报道少见,其作用机制尚不明确。因此,利用有效手段挖掘出坏死性凋亡在骨关节炎中的潜在作用靶点,有利于从坏死性凋亡角度进一步探讨骨关节炎的发病机制。

生物信息学作为当前生物医学领域利用现代化信息手段进行辅助研究的一种新兴技术,可从基因分子角度探讨疾病间的潜在作用规律。故而,此次研究基于生物信息学,挖掘出坏死性凋亡参与骨关节炎发生、发展的关键基因,并通过雄性 SD 大鼠造模加以验证,旨在为阐明骨关节炎发病机制提供新思路。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 生信分析+实验验证的“干湿相结”型。

1.2 时间及地点 实验于 2022-01-01/03-30 在广西中医药大学及江西中洪博元生物技术有限公司完成。

1.3 材料

1.3.1 生信数据库及分析工具 GEO 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)、GeneCards 数据库 (<https://www.genecards.org/>)、String 在线分析网站 (<https://cn.string-db.org/>)、Cytoscape 软件(版本 3.9.1)、SPSS 20.0 统计学软件。

1.3.2 实验动物 6 只雄性 SD 大鼠,六七周龄,体质量 200-300 g, SPF 级,购于北京华阜康生物科技股份有限公司,许可证号: SCXK(京)2019-0008。饲养条件:普通饲料饲养,温度 20-26 °C,湿度 40%-70%,模拟自然光照 12 h/d。实验已获江西中洪博元生物技术有限公司动物实验伦理审查批准(编号: 2022012001)。

1.3.3 实验试剂 液氮; MolPure Bone RNA Kit 骨组织 RNA 提取试剂盒(HB210329, YEASEN); HiScript II Q RT SuperMix for qPCR (+gDNA wiper)(R223-01, Vazyme); ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix(Q711-02, Vazyme); 50×TAE 缓冲液(T1060, Solarbio); 6×DNA Loading Buffer(GH101-01, TRANS); 50 bp DNA Ladder(MD108, TIANGEN); Gsafe Red plus 核酸染料(GK20002, GLPBIO); 琼脂糖粉(75510-019, Invitrogen)。

1.3.4 实验设备 -80 °C 冰箱(BDF-86V348, BIOBASE); 医用低温保存箱(DW-25L262, Haier); 移液枪(0.1-2.5 μ L、0.5-10 μ L、20-200 μ L、100-1 000 μ L 各一把, eppendorf); 常温离心机(TD-4M, BIOBASE); 全自动样品快速研磨仪(Tiss-12, 上海净信实业发展有限公司); 高速台式冷冻离心机(H1750R, 湖南湘仪实验室仪器开发有限公司); 微型离心机(D1008E, SCJLOGEX); 旋涡混合器(XH-C, 常州越新仪器制造有限公司); 紫外分光光度仪(NP80, NanoPhotometer); 电泳仪(DYY-8C, 北京六一生物技术有限公司); 普通 PCR 扩增仪(TC-EA, 杭州博日科技有限公司); 荧光 PCR 仪(CFX Connect™ 实时, 伯乐生命医学产品有限公司); 超高灵敏度化学发光成像系统仪(Chemi Doc™ XRS+, 伯乐生命医学产品有限公司)。

1.4 实验方法

1.4.1 骨关节炎坏死性凋亡关键基因的生物信息学筛选

骨关节炎差异表达基因的筛选: GEO 数据库是美国官方机构所开发并定期更新的信息共享网站,已囊括世界各科

研场所上传的各种生理或病理状态相关基因数据, 可供免费查阅与使用。在该网站搜索栏输入“osteoarthritis”作为检索词, 获取骨关节炎基因芯片 GSE55235。此芯片包含 10 例骨关节炎患者及 10 名健康人群的基因表达数据。通过数据分析及可视化软件 R 语言的“limma”包, 并以 $P \leq 0.05$ 和 $|\logFC| \geq 1$ 为输出条件, 筛选骨关节炎的差异表达基因。

骨关节炎坏死性凋亡基因的筛选: GeneCards 是一非盈利机构创建并维护的综合生物信息数据库, 可提供简明基因组、蛋白质组及相关人类基因的查询服务。在此数据库中以“necroptosis”为关键词, 筛选出坏死性凋亡相关基因; 再使用 R 语言软件“VennDiagram”包将骨关节炎相关基因与先前已经筛选出的坏死性凋亡相关基因作交集, 进而获得既在骨关节炎表达, 又在坏死性凋亡中表达的骨关节炎坏死性凋亡基因。

GO 批注和 KEGG 途径富集分析: 基因本体论 (GO) 和京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 是生物信息学中常用的基因富集方式, 可从细胞成分 (CC)、分子功能 (MF)、生物过程 (BP) 及信号通路角度揭示疾病分子层面的潜在机制。在 R 语言中下载“clusterProfiler”“DOSE”和“pathview”3 个包后, 对骨关节炎坏死性凋亡相关基因进行处理及注释, 以便于后续分析。

骨关节炎坏死性凋亡基因 PPI 网络构建: String 数据库是一个分析蛋白质与蛋白质之间相互作用的在线资源平台。为揭示骨关节炎坏死性凋亡相关基因相互作用关系, 使用 String 数据库以综合得分 ≥ 0.4 为输出条件, 构建蛋白互作网络 (PPI 网络), 便于骨关节炎坏死性凋亡关键基因的鉴定。**骨关节炎坏死性凋亡关键基因的筛选:** Cytoscape 是一款可视化导出数据结果的生物信息学统计工具, 可对骨关节炎坏死性凋亡基因的 PPI 网络进行拓扑学分析。利用其“CytoHubba”插件中 Degree(度中心性)、Closeness(接近中心性)、Betweenness(中介中心性)、Stress(压力中心性) 及 BottleNeck(瓶颈中心性) 5 种不同计算方法各自筛选出排名前 10 的基因, 交集后得到 Hub 基因即骨关节炎坏死性凋亡关键基因。

1.4.2 Hub 基因的动物实验验证

雄性 SD 大鼠骨关节炎造模: 由于膝骨关节炎中期关节软骨中存在显著坏死性凋亡现象^[8], 故采用改良 Hulth 法制造膝骨关节炎中期模型^[9]。取 6 只雄性 SD 大鼠, 按随机数字法分为正常对照组及骨关节炎组, 每组 3 只。适应性饲养 7 d 后, 骨关节炎组使用 1.5% 戊巴比妥钠 (45 mg/kg) 腹腔注射麻醉后, 剪除左后肢膝关节周围毛发, 常规消毒, 髌旁内侧打开膝关节, 切断前交叉韧带, 切除内侧半月板, 采用“前抽屉实验”确认前交叉韧带完全断裂。正常对照组大鼠左后肢不做处理。6 周后取左后肢膝关节软骨, 用于后续 RT-PCR 检测。

RT-PCR 法检测软骨标本 Hub 基因表达情况: 用骨组织 RNA 提取试剂盒 (HB210329, YEASEN) 提取 6 只雄性 SD 大鼠

组织工程实验动物造模过程的相关问题:

造模目的	制造骨关节炎中期模型
选择动物的条件	雄性 SD 大鼠, 六七周龄, 体质量 200-300 g
模型与所研究疾病的关系	坏死性凋亡关键基因在骨关节炎中期模型中可能存在差异性表达
动物来源及品系	SPF 级, 购于北京华阜康生物科技股份有限公司, 许可证号: SCXK(京)2019-0008
造模技术描述	麻醉后, 髌骨内侧打开左后肢膝关节, 切断前交叉韧带, 切除内侧半月板, 行“前抽屉实验”确认前交叉韧带完全断裂, 证明手术成功
动物数量及分组方法	6 只, 按随机数字法分为正常对照组及骨关节炎组, 每组 3 只
造模成功评价指标	6 周后, 大体可见骨关节炎组关节软骨局部失去透明光泽, 表面结节状膨隆不整, 软骨表面磨损, 可见小裂隙, 小溃疡, 残存有软骨纤维状, 且以胫骨内侧平台软骨明显, 符合参考文献 [10] 所描述膝骨关节炎中期病理改变, 证明膝骨关节炎中期模型造模成功
造模后观察指标	CYBB、FADD、IL1B、MYC 和 EGFR 基因在软骨标本中的相对表达量
造模后动物处理	造模后继续单笼饲养, 术后 1 周开始驱赶雄性 SD 大鼠运动, 每天 30 min
伦理委员会批准	实验已通过江西中洪博元生物技术有限公司动物实验伦理审查 (编号: 2022012001)

(3 只对照组、3 只骨关节炎组) 软骨组织中的总 RNA, 利用紫外可见分光光度计测定 mRNA 的浓度和纯度, 琼脂糖凝胶电泳检测提取的 RNA 质量, 通过 mRNA 反转录试剂盒合成 cDNA, 利用荧光 PCR 仪进行荧光定量 PCR(荧光染料法), 以 β -actin 作为内参, 操作体系及反应程序: 2 \times miRNA Universal SYBR qPCR Master Mix 10 μ L, cDNA 1 μ L, 上游引物 0.4 μ L, 下游引物 0.4 μ L, RNase Free ddH₂O 8.2 μ L; 预变性 95 $^{\circ}$ C 10 min, 循环 1 次; 变性 95 $^{\circ}$ C 10 s, 退火 58 $^{\circ}$ C 30 s, 延伸 72 $^{\circ}$ C 30 s, 循环 40 次。5 个 Hub 基因 (CYBB、FADD、IL1B、MYC、EGFR) 相对表达量根据 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算, 基因及内参引物信息见表 1。相对表达量是指目的基因在骨关节炎组中的表达相对于在正常对照组表达的倍数。在 $P < 0.05$ 的情况下, 如果 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 小于 1, 说明目的基因在骨关节炎组中低表达, 大于 1 则说明高表达, 否则表达无差异。

表 1 | Hub 基因及内参引物信息

Table 1 | Information on Hub genes and internal reference primers

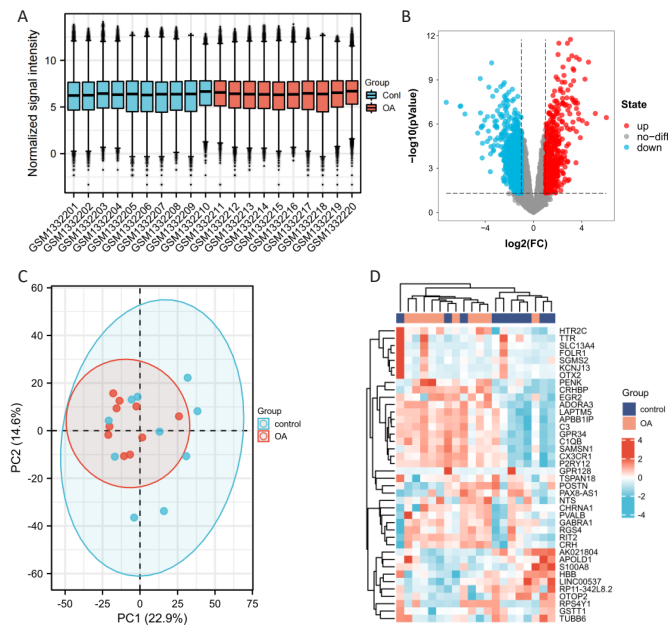
基因	引物序列 (5'-3')	产物长 (bp)	退火温度 ($^{\circ}$ C)
β -actin F	GCC ATG TAC GTA GCC ATC CA	375	58.0
β -actin R	GAA CCG CTC ATT GCC GAT AG		
CYBB F	GCG ATG GAC TGG TGG TAA CT	90	58.0
CYBB R	AAT GGT TTT GGT GGA GGA TG		
FADD F	TGA CGG ATC TCA AGT TCC TG	253	56.4
FADD R	ACA ATG TCA AAT GCC ACC C		
IL1B F	CAG ACC CCA AAA GAT TAA GGA TTG	263	57.6
IL1B R	CTA GCA GGT CGT CAT CAT CC		
EGFR F	AGC CAC CTA TCT GCA CCA TC	331	59.6
EGFR R	GAA CTG TTG CTA TTT GCA CTC AGA		
MYC F	TCA GAC ACC GAG GAA AAC GAC	180	60.1
MYC R	TTG AAC GGA CAG GAT GTA GGC		

1.5 主要观察指标 坏死性凋亡参与骨关节炎发生、发展的关键基因。

1.6 统计学分析 应用 SPSS 20.0 软件进行统计分析。所有实验重复 3 次，定量结果采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组之间定量数值比较采用独立样本 *T* 检验， $P < 0.05$ 则代表差异有显著性意义。统计学方法已由广西中医药大学第一附属医院郭锦荣审核。

2 结果 Results

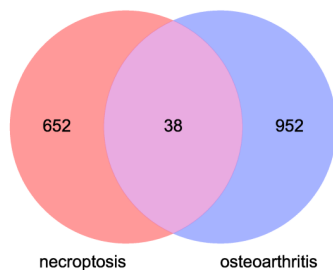
2.1 骨关节炎差异表达基因的获得 对骨关节炎基因芯片 GSE55235 进行差异表达分析，进行数据标准化，得到骨关节炎差异表达基因共 990 个；进行可重复性主成分分析 (PCA) 验证，选取前 50 个差异基因进行可视化热图处理，见图 1。



图注：A 为数据标准化校正图；B 为骨关节炎差异基因火山图，红色为上调基因，蓝色为下调基因；C 为重复性主成分分析验证图，同类散点越为密集，重复性也就越高，红色代表骨关节炎标本，蓝色代表正常标本；D 为前 50 位骨关节炎差异基因可视化热图，红色为高表达，蓝色为低表达

Figure 1 | Related information of differentially expressed genes

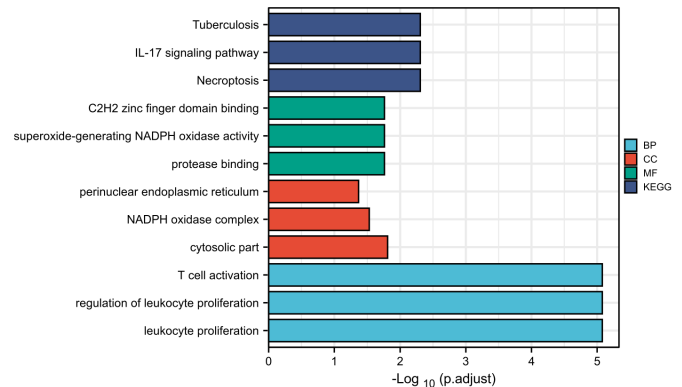
2.2 骨关节炎坏死性凋亡基因的获得 在 GeneCards 数据库的检索窗口中以“necroptosis”为关键词，共筛选出 690 个坏死性凋亡相关基因，利用 R 语言软件“VennDiagram”包将获得的 990 个骨关节炎差异表达与 690 个坏死性凋亡相关基因作交集，共获得 38 个骨关节炎坏死性凋亡基因，见图 2。



图注：蓝色为骨关节炎基因，红色为坏死性凋亡基因，粉色为交集基因

Figure 2 | Intersection of osteoarthritis- and necroptosis-related genes

2.3 GO 和 KEGG 富集分析 通过 R 语言 Bioconductor 包对 38 个骨关节炎坏死性凋亡基因进行 GO 和 KEGG 富集分析，结果发现骨关节炎坏死性凋亡基因主要在白细胞增殖、T 细胞活化、白细胞介素 17 信号通路等方面显著富集，见图 3，表 2。



图注：BP 代表生物过程；CC 代表细胞成分；MF 代表生物功能；KEGG 代表通路富集

Figure 3 | Gene ontology and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes enrichment analyses

表 2 | GO 及 KEGG 富集分析结果

Table 2 | Enrichment analysis results of Gene ontology and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes enrichment analyses

富集类型	ID	富集功能描述	富集比	P 值
BP	GO:0070661	白细胞增殖	9/37	< 0.05
BP	GO:0070663	白细胞增殖的调节	8/37	< 0.05
BP	GO:0042110	T 细胞活化	10/37	< 0.05
CC	GO:0044445	胞浆部分	5/37	< 0.05
CC	GO:0043020	NADPH 氧化酶复合物	2/37	< 0.05
CC	GO:0097038	核周内质网	2/37	< 0.05
MF	GO:0002020	蛋白酶结合	4/36	< 0.05
MF	GO:0016175	产生超氧化物的 NADPH 氧化酶活性	2/36	< 0.05
MF	GO:0070742	C ₂ H ₂ 锌指结构域结合	2/36	< 0.05
KEGG	hsa04217	坏死性凋亡	5/24	< 0.05
KEGG	hsa04657	白细胞介素 17 信号通路	4/24	< 0.05
KEGG	hsa05152	肺结核	5/24	< 0.05

2.4 PPI 网络构建及 Hub 基因筛选 采用 String 数据库建立共同疾病基因的 PPI 互作网络，该网络包含 34 个节点和 70 条边，见图 4。通过网络拓扑分析，并利用 5 种不同计算方法分别筛选出排名前 10 位的基因，进行交集后得到 5 个 Hub 基因：CYBB、FADD、IL1B、MYC 及 EGFR，见表 3 及图 5。

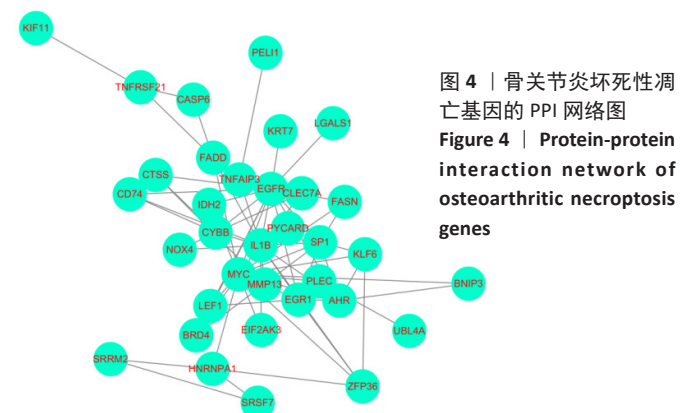


Figure 4 | Protein-protein interaction network of osteoarthritic necroptosis genes

表 3 | Hub 基因 5 种不同算法的相应得分

Table 3 | Corresponding scores of five different algorithms of Hub genes

Hub 基因	算法 (分)				
	度中心性	接近中心性	中介中心性	压力中心性	瓶颈中心性
CYBB	6	17	34	134	3
FADD	5	18	196	294	6
IL1B	15	23	410	888	14
MYC	16	24	439	748	26
EGFR	13	19	211	424	5

表 4 | 两组大鼠软骨标本中 Hub 基因相对表达量

($\bar{x} \pm s$)

Table 4 | Relative expression of Hub genes in cartilage specimens of Sprague-Dawley rats

Hub 基因	正常对照组	骨关节炎组	F 值	P 值
CYBB	1.000 0±0.166 3	0.842 8±0.044 5	11.312	0.049 0
EGFR	1.000 0±0.298 4	2.026 1±0.332 7	0.073	0.000 1
IL1B	1.000 0±0.672 9	9.661 8±5.019 6	8.474	0.008 0
FADD	1.000 0±0.223 4	1.341 9±0.307 7	0.106	0.052 0
MYC	1.000 0±0.198 8	0.628 0±0.091 2	2.345	0.002 0

表注: 经归一化处理, 正常对照组目标基因相对表达量为 1

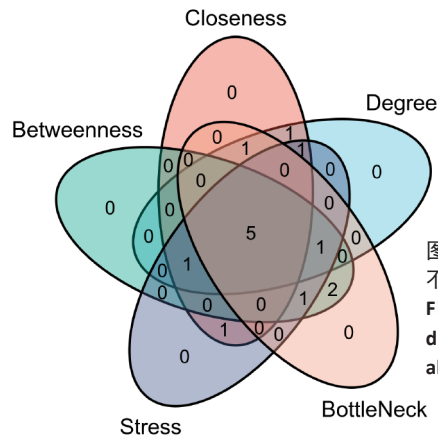
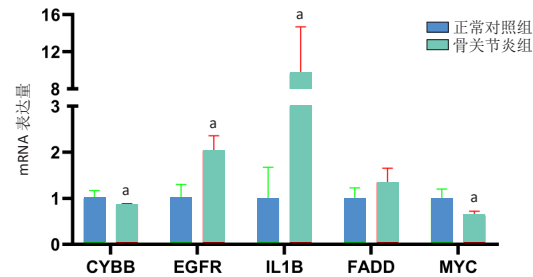


图 5 | 拓扑学分析中 5 种不同算法交集图
Figure 5 | Intersection diagram of five different algorithms



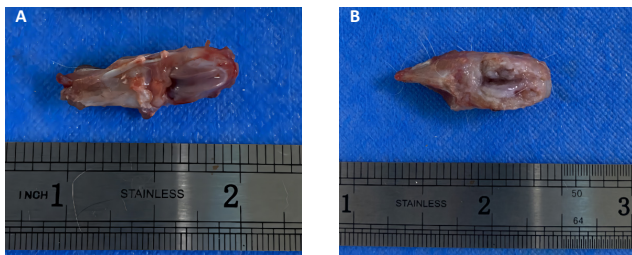
图注: 与正常对照组比较, ^a $P < 0.05$

图 7 | 两组大鼠关节软骨中 5 个 Hub 基因相对表达量柱状图

Figure 7 | Histogram of relative expression of five Hub genes

2.5 Hub 基因的动物实验验证

2.5.1 大体观察 造模 48 h 后, 骨关节炎组大鼠左后肢出现肿胀、屈伸功能障碍, 跳步、拖步、活动减少等症状。6 周后, 用 1.5% 戊巴比妥钠 (150 mg/kg) 腹腔过量注射麻醉至死, 用咬骨钳将雄性 SD 大鼠左后肢膝关节离断, 取膝关节组织 (股骨髁及胫骨平台) 对比, 大体可见: 正常对照组关节软骨色泽均匀, 表面平滑; 骨关节炎组关节软骨局部失去透明光泽, 表面结节状膨隆不整, 软骨表面磨损, 可见小裂隙, 小溃疡, 残存有软骨纤维状, 且以胫骨内侧平台软骨明显, 符合膝骨关节炎中期病理改变^[10], 见图 6, 证明膝骨关节炎中期模型造模成功。



图注: A 为正常对照组, 关节软骨色泽均匀, 表面平滑; B 为骨关节炎组, 关节软骨局部失去透明光泽, 表面结节状膨隆不整, 软骨表面磨损, 可见小裂隙, 小溃疡, 残存有软骨纤维状, 且以胫骨内侧平台软骨明显
图 6 | 骨关节炎组与对照组对比图

Figure 6 | Comparison between osteoarthritis model and normal model

2.5.2 大鼠软骨标本中 Hub 基因相对表达量 5 个 Hub 基因相对表达量情况如表 4 及图 7 所示, 与正常对照组比较, 骨关节炎组中 EGFR、IL1B 基因高表达 ($P < 0.05$), CYBB、MYC 基因低表达 ($P < 0.05$), FADD 基因表达无明显变化 ($P > 0.05$)。

3 讨论 Discussion

骨关节炎是好发于中老年人群的常见骨科疾病, 目前病因尚未明确。虽有研究表明, 坏死性凋亡从炎症角度参与了骨关节炎进展, 但作用机制不详^[11]。因此, 基于生物信息学及动物实验挖掘出骨关节炎坏死性凋亡的关键基因, 对从坏死性凋亡角度进一步探讨骨关节炎发病机制具有重要意义。

通过 GEO 及 GeneCards 数据库分别筛选出骨关节炎相关基因与坏死性凋亡相关基因, 交集后获得 38 个骨关节炎坏死性凋亡基因; 进而通过 GO 及 KEGG 分析发现, 骨关节炎坏死性凋亡基因主要在白细胞增殖、T 细胞活化、白细胞介素 17 信号通路等方面显著富集。坏死性凋亡又称为炎性细胞死亡, 已成为骨关节炎等多种炎症性疾病调控机制之一^[12-13]。白细胞作为身体防御系统的重要组成部分, 当炎症反应出现时会引起白细胞的有效募集^[14]。关节炎是骨关节炎的重要特征之一, 在给予富含白细胞的血浆后, 骨关节炎关节中软骨磨损的部分会覆盖再生的纤维软骨^[15], 提示白细胞可能介导坏死性凋亡发挥炎症作用, 进而调控软骨的重塑。部分学者认为, 骨关节炎早期阶段关节中存在由活化 T 细胞诱导的炎症反应^[16], 而 T 细胞的稳态又在一定程度上依赖于 RIPK3 介导的坏死性凋亡^[17]。由此可以推断, 坏死性凋亡可能调控 T 细胞稳态引起关节炎, 加速骨关节炎退变。此外, 也有证据表明坏死性凋亡在炎症触发时会释放出丰富的炎症递质, 放大 Th17 细胞的效应子功能分泌白细胞介素 17^[18], 进而通过白细胞介素 1/ 白细胞介素 17 信号通路诱导软骨破坏加快, 在骨关节炎发展中起关键作用^[19]。

进一步通过网络拓扑分析, 利用 5 种不同计算方法分别筛选出排名前 10 位的基因进行交集, 结果获得 5 个 Hub 基因: CYBB、FADD、IL1B、MYC 及 EGFR; 且 RT-PCR 检测结果

提示, CYBB、IL1B、MYC 及 EGFR 基因在 SD 大鼠骨关节炎软骨组织中存在显著差异性表达, 其中 EGFR、IL1B 呈高表达, CYBB、MYC 呈低表达, 而 FADD 无显著差异。查阅相关文献, 虽未发现以上 4 个差异表达基因 (CYBB、IL1B、MYC 及 EGFR) 从坏死性凋亡角度调控骨关节炎的研究报道, 但却与骨关节炎及坏死性凋亡存在相关联系。

坏死性凋亡依赖于 MLKL 的激活, 激活的 MLKL 则会引起活性生物体内由 IL1B 编码的白细胞介素 1 β 的加工和释放^[20], 而白细胞介素 1 β 的释放又是骨关节炎患者关节软骨变性的重要因素^[21]。坏死性肌纤维中释放的肌腱蛋白受到坏死性凋亡的严格控制, 并能通过其 N 端组装域和 EGF 样域直接激活肌肉干细胞中的 EGFR 蛋白, 进而促进包括骨骼肌肉在内的多种细胞类型的细胞增殖^[22]; 而在特定信号通路中, EGFR 可在上游 miR-7 的诱导后激活下游 MEGF9 促进关节软骨降解, 加快骨关节炎进展^[23]。MYC 的消耗或缺失可促进 RIPK1-RIPK3 相互作用, 从而稳定 RIPK1 和 RIPK3 的表达并促进坏死性凋亡^[24], 而其家族成员 C-MYC 的表达却可以通过减少软骨细胞谷氨酰胺代谢水平, 减轻骨关节炎^[25]。CYBB 又称 NOX2, 部分来源于炎症小体 NLRP3 刺激后过量积累的活性氧^[26], 而由线粒体功能障碍引起的活性氧水平增加是衰老的标志之一, 可破坏软骨中合成代谢和分解代谢活动平衡, 促进基质破坏并伴有软骨细胞凋亡^[27]; 而坏死性凋亡标志物 RIPK1 又可部分控制线粒体活性氧的水平, 导致坏死体激活和 Caspase 丢失, 使细胞凋亡转变为坏死性凋亡^[28], 但这却与雄性 SD 大鼠软骨组织中 CYBB 基因呈低表达现象相反, 可能是实验操作误差所致, 有待进一步考证。

综上所述, 通过生物信息学及动物实验的综合分析, 发现 CYBB、IL1B、MYC 及 EGFR 基因在雄性 SD 大鼠骨关节炎软骨中存在显著差异性表达, 是骨关节炎坏死性凋亡的关键基因, 这为今后骨关节炎防治提供一种新思路。但研究也存有不足局限之处, 例如: 使用 GEO 数据库获取骨关节炎差异基因时, 上传数据的科研人员对骨关节炎分期诊断可能存在主观性认知, 很难确保下载数据样本都具有相同的骨关节炎分期; 此外, 虽然进行了动物实验, 但样本量偏少, 难免出现分析偏差, 以期同病理分期、大样本数据、多实验标本优化此研究方案。

作者贡献: 文章撰写由袁长深副主任医师完成, 资料收集、数据分析由官岩兵、李哲、廖书宁、陈乐伟、容伟明硕士研究生完成, 实验设计及文章评估由段骥教授与梅其杰副教授完成, 雄性 SD 大鼠骨关节炎造模及 RT-PCR 检测由江西中洪博元生物技术有限公司协作完成。

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中不存在利益冲突。

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。

版权转让: 文章出版前全体作者与编辑部签署了文章版权转让协议。

出版规范: 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。

4 参考文献 References

- [1] HUNTER DJ, BIERMA-ZEINSTRAS S. Osteoarthritis. *Lancet*. 2019;393(10182):1745-1759.
- [2] NELSON AE. Osteoarthritis year in review 2017: clinical. *Osteoarthritis Cartilage*. 2018;26(3):319-325.
- [3] SHEN J, ABU-AMER Y, O'KEEFE RJ, et al. Inflammation and epigenetic regulation in osteoarthritis. *Connect Tissue Res*. 2017;58(1):49-63.
- [4] LATOURTE A, KLOPPENBURG M, RICHETTE P. Emerging pharmaceutical therapies for osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2020;16(12):673-688.
- [5] 董方, 商建峰, 方微, 等. 坏死性凋亡在心血管疾病发生发展中的作用及其机制进展 [J]. *中华心血管病杂志*, 2021,49(7):728-732.
- [6] CHENG J, DUAN X, FU X, et al. RIP1 Perturbation Induces Chondrocyte Necroptosis and Promotes Osteoarthritis Pathogenesis via Targeting BMP7. *Front Cell Dev Biol*. 2021;9:638382.
- [7] RIEGGER J, BRENNER RE. Evidence of necroptosis in osteoarthritic disease: investigation of blunt mechanical impact as possible trigger in regulated necrosis. *Cell Death Dis*. 2019;10(10):1-12.
- [8] JEON J, NOH HJ, LEE H, et al. TRIM24-RIP3 axis perturbation accelerates osteoarthritis pathogenesis. *Ann Rheum Dis*. 2020;79(12):1635-1643.
- [9] WANG J, CHEN L, JIN S, et al. MiR-98 promotes chondrocyte apoptosis by decreasing Bcl-2 expression in a rat model of osteoarthritis. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2016;48(10):923-929.
- [10] 王云峰, 白人骁, 张扬, 等. 改良 Hulth 模型复制膝不同时期骨关节炎的实验研究 [J]. *天津医科大学学报*, 2009,15(3):400-404.
- [11] LEE SW, RHO JH, LEE SY, et al. Leptin protects rat articular chondrocytes from cytotoxicity induced by TNF- α in the presence of cyclohexamide. *Osteoarthritis Cartilage*. 2015;23(12):2269-2278.
- [12] YANG T, CAO C, YANG J, et al. miR-200a-5p regulates myocardial necroptosis induced by Se deficiency via targeting RNF11. *Redox Biol*. 2018;15:159-169.
- [13] LI X, YAO X, ZHU Y, et al. The Caspase Inhibitor Z-VAD-FMK Alleviates Endotoxic Shock via Inducing Macrophages Necroptosis and Promoting MDCs-Mediated Inhibition of Macrophages Activation. *Front Immunol*. 2019;10:1824.
- [14] KOURTZELIS I, MITROULIS I, VON RENESSE J, et al. From leukocyte recruitment to resolution of inflammation: the cardinal role of integrins. *Leukoc Biol*. 2017;102(3):677-683.
- [15] JAYARAM P, KANG GE, HELDT BL, et al. Novel assessment of leukocyte-rich platelet-rich plasma on functional and patient-reported outcomes in knee osteoarthritis: a pilot study. *Regen Med*. 2021;16(9):823-832.
- [16] GUO N, YE S, ZHANG K, et al. A critical epitope in CD147 facilitates memory CD4+ T-cell hyper-activation in rheumatoid arthritis. *Cell Mol Immunol*. 2019;16(6):568-579.
- [17] ROSSHIRT N, TRAUTH R, PLATZER H, et al. Proinflammatory T cell polarization is already present in patients with early knee osteoarthritis. *Arthritis Res Ther*. 2021;23(1):37.
- [18] TAKEUCHI Y, OHARA D, WATANABE H, et al. Dispensable roles of Gsdmd and Rip3 in sustaining IL-1 β production and chronic inflammation in Th17-mediated autoimmune arthritis. *Sci Rep*. 2021;11(1):18679.
- [19] NA HS, PARK JS, CHO KH, et al. Interleukin-1-Interleukin-17 Signaling Axis Induces Cartilage Destruction and Promotes Experimental Osteoarthritis. *Front Immunol*. 2020;11:730.
- [20] GUTIERREZ KD, DAVIS MA, DANIELS BP, et al. MLKL Activation Triggers NLRP3-Mediated Processing and Release of IL-1 β Independently of Gasdermin-D. *J Immunol*. 2017;198(5):2156-2164.
- [21] LIAO CR, WANG SN, ZHU SY, et al. Advanced oxidation protein products increase TNF- α and IL-1 β expression in chondrocytes via NADPH oxidase 4 and accelerate cartilage degeneration in osteoarthritis progression. *Redox Biol*. 2020;28:101306.
- [22] ZHOU S, ZHANG W, CAI G, et al. Myofiber necroptosis promotes muscle stem cell proliferation via releasing Tenascin-C during regeneration. *Cell Res*. 2020;30(12):1063-1077.
- [23] JIANG L, ZHOU X, XU K, et al. miR-7/EGFR/MEGF9 axis regulates cartilage degradation in osteoarthritis via PI3K/AKT/mTOR signaling pathway. *Bioengineered*. 2021;12(1):8622-8634.
- [24] SEONG D, JEONG M, SEO J, et al. Identification of MYC as an antinecrotic protein that stifles RIPK1-RIPK3 complex formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020;117(33):19982-19993.
- [25] JIANG K, JIANG T, CHEN Y, et al. Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes Modulate Chondrocyte Glutamine Metabolism to Alleviate Osteoarthritis Progression. *Mediators Inflamm*. 2021;2021:2979124.
- [26] LICHY M, SZOBI A, HRDLIČKA J, et al. Different signalling in infarcted and non-infarcted areas of rat failing hearts: A role of necroptosis and inflammation. *Cell Mol Med*. 2019;23(9):6429-6441.
- [27] COLLINS JA, WOOD ST, NELSON KJ, et al. Oxidative Stress Promotes Peroxiredoxin Hyperoxidation and Attenuates Pro-survival Signaling in Aging Chondrocytes. *J Biol Chem*. 2016;291(13):6641-6654.
- [28] DERAGON MA, MCCAIG WD, PATEL PS, et al. Mitochondrial ROS prime the hyperglycemic shift from apoptosis to necroptosis. *Cell Death Discov*. 2020;6(1):132.

(责任编辑: GW, ZN, ZJP)