

## 绝经后骨质疏松小鼠骨髓间充质干细胞免疫相关因子抗体芯片检测及关键差异基因分析

杨杉杉<sup>1,2</sup>, 欧阳仁俊<sup>1,2</sup>, 田佳<sup>1,2</sup>, 令狐敏<sup>1,2</sup>, 王振<sup>1,2</sup>, 杨晓红<sup>1</sup><https://doi.org/10.12307/2024.182>

投稿日期: 2023-05-13

采用日期: 2023-07-11

修回日期: 2023-08-16

在线日期: 2023-08-28

中图分类号:

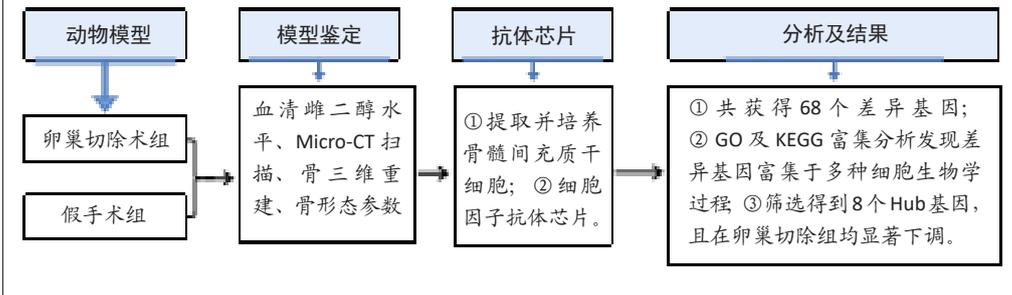
R459.9; R318; R782

文章编号:

2095-4344(2024)25-03947-08

文献标识码: A

文章快速阅读: 绝经后骨质疏松小鼠骨髓间充质干细胞免疫相关因子抗体芯片检测



文题释义:

**绝经后骨质疏松:** 是一种与衰老有关的常见病, 主要发生在绝经后妇女, 由于雌激素缺乏导致骨量减少及骨组织结构变化, 使骨脆性增多, 易于骨折。**抗体芯片:** 蛋白芯片的一种, 具有微型化、集成化、高通量化的特点, 可以用于检测某一特定的生理或病理过程相关蛋白的表达丰度, 主要用于信号转导、蛋白质组学、肿瘤及其他疾病的相关研究。

摘要

**背景:** 近年来, 绝经后骨质疏松症骨骼与免疫系统之间相互作用机制的研究已成为热点, 但关键免疫相关因子表达改变对绝经后骨质疏松症的影响尚不明确, 仍需进一步探索。**目的:** 通过生物信息学方法探讨绝经后骨质疏松症小鼠骨髓间充质干细胞免疫相关因子差异化表达情况。**方法:** 通过卵巢切除手术构建绝经后骨质疏松症小鼠模型, 采用全骨髓贴壁法获取骨髓间充质干细胞并稳定传代至第2代, 使用RayBio L-Series Mouse Antibody Array 308 Glass Slide Kit免疫相关因子抗体芯片检测卵巢切除组及假手术组小鼠骨髓间充质干细胞中存在差异表达的蛋白, 对检测结果进行GO、KEGG富集分析及PPI网络分析, 通过MCC、EPC及MNC算法所得值筛选共同的Hub基因。**结果与结论:** 共获得68个差异表达基因。GO分析发现差异表达基因富集于免疫系统过程、胞外区、信号受体结合等条目。KEGG分析发现差异基因主要富集于细胞因子-细胞因子受体的相互作用、肿瘤坏死因子信号通路和趋化因子信号通路等条目。通过对68个差异表达基因构建PPI网络分析进一步筛选得到了8个Hub基因, 绘制小提琴图和相关性矩阵发现8个Hub基因的表达水平在卵巢切除组均较假手术组显著下调。结果显示, 绝经后骨质疏松症小鼠骨髓间充质干细胞存在差异性表达的免疫相关因子, 筛选得到其中的关键基因主要涉及细胞因子-细胞因子受体的相互作用、免疫系统相关过程等具有潜在靶向的信号通路及细胞生物学过程, 为绝经后骨质疏松症的诊治和预防提供新的靶点。**关键词:** 骨质疏松; 绝经后骨质疏松症; 骨髓间充质干细胞; 卵巢切除; 免疫相关因子; 生物信息学

## Detection of immune-related cytokines of bone marrow mesenchymal stem cells in postmenopausal osteoporosis mice by antibody chip and analysis of key differential genes

Yang Shanshan<sup>1,2</sup>, Ouyang Renjun<sup>1,2</sup>, Tian Jia<sup>1,2</sup>, Linghu Min<sup>1,2</sup>, Wang Zhen<sup>1,2</sup>, Yang Xiaohong<sup>1</sup><sup>1</sup>Department of Prosthodontics, Affiliated Stomatological Hospital of Zunyi Medical University, Zunyi 563006, Guizhou Province, China; <sup>2</sup>Key Laboratory of Basic Pharmacology, Zunyi Medical University, Zunyi 563006, Guizhou Province, China

Yang Shanshan, Master candidate, Department of Prosthodontics, Affiliated Stomatological Hospital of Zunyi Medical University, Zunyi 563006, Guizhou Province, China; Key Laboratory of Basic Pharmacology, Zunyi Medical University, Zunyi 563006, Guizhou Province, China

**Corresponding author:** Yang Xiaohong, MD, Professor, Department of Prosthodontics, Affiliated Stomatological Hospital of Zunyi Medical University, Zunyi 563006, Guizhou Province, China

Abstract

**BACKGROUND:** In recent years, research on the interaction mechanism between the immune system and the skeleton in postmenopausal osteoporosis has become a hot topic. However, the impact of changes in key immune-related cytokine expression on postmenopausal osteoporosis remains unclear and requires further exploration.<sup>1</sup>遵义医科大学附属口腔医院口腔修复科, 贵州省遵义市 563006; <sup>2</sup>遵义医科大学基础药理教育部重点实验室, 贵州省遵义市 563006

第一作者: 杨杉杉, 女, 1996年生, 云南省陆良县人, 汉族, 遵义医科大学在读硕士, 主要从事骨质疏松方面的研究。

通讯作者: 杨晓红, 博士, 教授, 遵义医科大学附属口腔医院口腔修复科, 贵州省遵义市 563006

<https://orcid.org/0009-0006-2604-5049> (杨杉杉)

基金资助: 国家自然科学基金(8206030955), 项目负责人: 杨晓红; 贵州省科技计划项目(黔科合基础-ZK[2023]一般540), 项目负责人: 杨晓红; 遵义市科技计划项目[遵市科合HZ字(2022)424号], 项目负责人: 杨晓红; 遵义医科大学研究生科研基金立项课题(ZYK203), 项目负责人: 王振

引用本文: 杨杉杉, 欧阳仁俊, 田佳, 令狐敏, 王振, 杨晓红. 绝经后骨质疏松小鼠骨髓间充质干细胞免疫相关因子抗体芯片检测及关键差异基因分析 [J]. 中国组织工程研究, 2024, 28(25):3947-3954.



**OBJECTIVE:** To investigate the differential expression of immune-related cytokines in bone marrow mesenchymal stem cells of mice with postmenopausal osteoporosis by bioinformatics methods.

**METHODS:** Postmenopausal osteoporosis mouse model was established through ovariectomy. Bone marrow mesenchymal stem cells were obtained by the whole bone marrow adherence method and passaged to passage 2. RayBio L-Series Mouse Antibody Array 308 Glass Slide Kit immune-related factor antibody chip was used to detect the differentially expressed proteins in bone marrow mesenchymal stem cells from ovariectomy and sham-operation mice. Gene ontology, Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes enrichment analysis, and protein-protein interaction network analysis were performed to screen common Hub genes by MCC, EPC, and MNC algorithms.

**RESULTS AND CONCLUSION:** This study identified a total of 68 differentially expressed genes. Gene ontology analysis revealed that the differentially expressed genes were enriched in terms including "immune system processes", "extracellular regions", and "signal receptor binding". Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes pathway analysis revealed that the differentially expressed genes were mainly enriched in "cytokine-cytokine receptor interactions", "tumor necrosis factor signaling pathways", and "chemokine signaling pathways". Further screening was performed by constructing a protein-protein interaction network analysis of these 68 differentially expressed genes to identify 8 Hub genes. The violin plot and correlation matrix showed that the expression levels of these 8 Hub genes were significantly down-regulated in the ovariectomy group compared to the sham-operation group. These results demonstrated that there was differential expression of immune-related factors in bone marrow mesenchymal stem cells of postmenopausal osteoporosis mice, and key genes involved in cytokine-cytokine receptor interactions, immune system-related processes, and potential targeted signaling pathways and cellular biological processes were identified, providing new promising targets for the diagnosis, treatment, and prevention of postmenopausal osteoporosis.

**Key words:** osteoporosis; postmenopausal osteoporosis; bone marrow mesenchymal stem cell; ovariectomy; immune-related factor; bioinformatics

**Funding:** National Natural Science Foundation of China, No. 8206030955 (YXH); Guizhou Provincial Science and Technology Plan Project, No. ZK[2023]540 (to YXH); Zunyi Science and Technology Plan Project, No. HZ(2022)424 (to YXH); Postgraduate Scientific Research Fund of Zunyi Medical University, No. ZYK203 (to WZ)

**How to cite this article:** YANG SS, OUYANG RJ, TIAN J, LINGHU M, WANG Z, YANG XH. Detection of immune-related cytokines of bone marrow mesenchymal stem cells in postmenopausal osteoporosis mice by antibody chip and analysis of key differential genes. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2024;28(25):3947-3954.

## 0 引言 Introduction

骨质疏松症是一种由多种因素共同作用所导致的骨骼完整性破坏、骨形成与吸收呈负平衡及骨重建失衡，进而造成骨量丢失的疾病<sup>[1-2]</sup>。骨质疏松症尤其多见于绝经后女性，该人群中雌激素水平相对缺乏导致骨重建过程更加活跃甚至出现失衡，免疫系统持续低度活化，处于促炎症状态。炎症递质，如肿瘤坏死因子 $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、白细胞介素(interleukin, IL)1、IL-6、IL-7、IL-17及前列腺素E2(prostaglandin E2, PGE2)均能诱导巨噬细胞集落刺激因子(macro phage colony-stimulating factor, M-CSF)和核因子 $\kappa$ B活化体受体配体(receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand, RANKL)的表达，破骨细胞活性超过成骨细胞，导致骨量丢失大于骨形成<sup>[1]</sup>。

免疫学临床研究表明，绝经后女性患者外周血中的CD19<sup>+</sup>B淋巴细胞数量较少，而这些免疫细胞分泌更多的是粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(granulocyte macrophage colony stimulating factor, GM-CSF)<sup>[3]</sup>。绝经后骨质疏松症(postmenopausal osteoporosis, POP)患者的外周血中性粒细胞-淋巴细胞比值较高<sup>[4]</sup>，在雌激素缺乏的病理状态下，TNF- $\alpha$ 、IL-1等免疫相关因子的高表达可显著抑制骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal cells, BMSCs)的活性及成骨分化能力，进而引起BMSCs介导的骨形成异常，最终促使骨质疏松症快速发展<sup>[5]</sup>。总之，POP患者体内细胞因子表达和免疫细胞谱发生改变<sup>[6]</sup>。研究表明，POP患者和卵巢切除(ovariectomy, OVX)动物模型均出现T淋巴细胞中TNF- $\alpha$ 表达水平增加，TNF- $\alpha$ 可加速成骨细胞凋亡，并通过B细胞产生RANK间接刺激破骨细胞生成，从而引发POP期间的骨量丢失<sup>[7]</sup>。YU等<sup>[8]</sup>研究发现，雌激素缺失可造成肠道菌群依赖性的骨髓Th17细胞及TNF<sup>+</sup>T细胞的扩增，以激活RANKL的表达和活性，从而造成骨质疏松；相反，通过阻断Th17细胞和TNF<sup>+</sup>T细胞从肠道排出可预防OVX诱导的骨丢失。

近年来，随着各种测序技术的飞速发展，许多疾病都可以通过基因表达谱分析来进行更深入的研究，为研究疾病的发生与发展提供了全新的方向<sup>[9]</sup>。周子墨等<sup>[10]</sup>通过生物信息学分析老年骨质疏松症的差异表达基因并构建m6A相关蛋白差异表达谱，使用蛋白相互作用(protein-protein interaction

networks, PPI)网络筛选出关键基因(CCR5、TAC1、VAMP2、CSF1等)，这些基因均与人BMSCs的免疫及炎症反应相关。KIM等<sup>[11]</sup>通过外显子组测序数据发现，小鼠模型巨噬细胞的基因芯片中最常见的突变基因为Dnmt3a，它的造血特异性突变会使得破骨细胞生成增多从而导致骨量降低，该过程由包括来自Dnmt3a突变巨噬细胞的Irf3-NF- $\kappa$ B信号通路介导的IL-20等促炎细胞因子共同参与完成。QIAN等<sup>[12]</sup>通过加权基因共表达网络分析(weighted correlation network analysis, WGCNA)来筛选与绝经状态相关的基因模块，筛选出12个基因(NUP133, PSMD12, PPWD1等)，并在PPI网络和共表达网络中被鉴定为枢纽基因；在绝经后妇女中，只有PPWD1基因的表达与骨密度相关，因此PPWD1被认为是POP潜在的诊断性生物标志物。目前，虽然学界已开展过大量针对POP的研究，也涉及了一些基因层面的研究，但在骨免疫方面还存在一些不足，尤其是关键免疫相关因子的改变对POP的影响尚不明确，仍需要进一步探索。

鉴于此，该研究通过构建POP小鼠模型，采用全骨髓贴壁法获取BMSCs并稳定传代至第2代，使用RayBio L-Series Mouse Antibody Array 308 Glass Slide Kit免疫相关因子抗体芯片检测POP及正常小鼠BMSCs中存在差异表达的蛋白，对检测结果进行基因本体论(gene ontology, GO)、京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)富集分析及PPI网络分析，并筛选关键的Hub基因，为POP的诊治和预防提供新的思路与方向，为免疫介导干细胞进行骨组织修复与再生提供理论依据。

## 1 材料和方法 Materials and methods

**1.1 设计** 随机对照动物实验，组间比较采用两独立样本t检验。

**1.2 时间及地点** 实验于2022年1月至2023年2月在遵义医科大学基础药理教育部重点实验室完成。

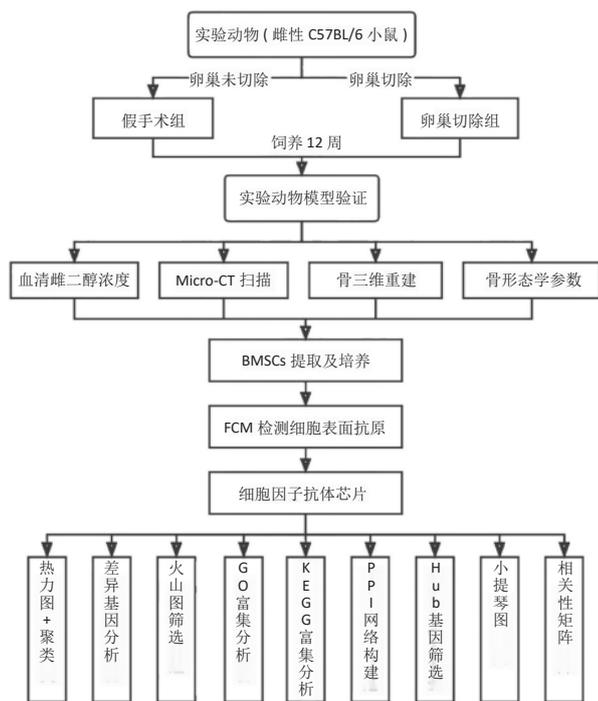
### 1.3 材料

**1.3.1 实验动物** 雌性C57BL/6J小鼠60只，6周龄，体重(18.36±3.65)g，购于斯贝福生物技术有限公司(北京)，许可证号：SCXK(京)2019-0010。该研究获得遵义医科大学伦理委员会批准，审批号为伦审(2020)2-473号，实验结果报道遵从ARRIVE(the Animal Research: Reporting of in vivo

Experiments guidelines) 动物实验报道指南。

1.3.2 实验仪器及试剂 超净工作台(苏净安泰, 中国); CO<sub>2</sub> 恒温培养箱(Thermo Scientific, 美国); 高压灭菌锅(HIRAYAMA, 日本); 倒置相差显微镜(Olympus, 日本); 低速离心机(中佳科学仪器有限公司, 中国); 高速离心机(Beckman Coulter, 美国); 超纯水机(Millipore, 法国); 流式细胞仪(Beckmen, 美国); 实时荧光定量 PCR 仪(BIO-RAD, 美国); PCR 反转录仪(BIO-RAD, 美国); 移液枪(Eppendorf, 德国); 细胞培养瓶(Nest, 美国); α-MEM(Gibco, 美国); 胎牛血清(Gibco, 澳大利亚); 磷酸盐缓冲液(Solarbio, 中国); 0.25% 胰蛋白酶(Solarbio, 中国); 青霉素链霉素混合液(Solarbio, 中国); β-甘油磷酸钠(Solarbio, 中国); 二甲基亚砜(Solarbio, 中国); 吲哚美辛(Solarbio, 中国); 维生素 C(Sigma, 中国); IBMX(Solarbio, 中国); 油红 O 染液(Solarbio, 中国); 茜素红染液(Solarbio, 中国); Trizol(TAKARA, 日本); RNA 反转录试剂盒(生工生物, 中国); 荧光定量试剂盒(生工生物, 中国); 相关引物(生工生物, 中国); BCA 蛋白试剂盒(Solarbio, 中国)。

1.4 实验方法 实验技术路线图如图 1 所示。



图注: BMSCs 为骨髓间充质干细胞; FCM 为流式细胞术。

图 1 | 实验技术路线图

Figure 1 | Flow chart of the experiment

1.4.1 POP 小鼠模型的建立 选取雌性 C57BL/6 小鼠 30 只, 使用 1% 戊巴比妥钠溶液以 50 mg/kg 剂量麻醉小鼠后剃除其背部毛发完成备皮, 用碘伏消毒备皮部位的皮肤, 随后剪开背部皮肤, 分层剥离皮下、脂肪及腹腔层。随机抽取其中 15 只小鼠找到脏层的双侧卵巢, 结扎和剪弃, 建立 POP 小鼠模型, 作为卵巢切除组; 剩余 15 只小鼠仅剪去卵巢周围组织作为假手术组。两组小鼠在室内温度 20–26 °C, 相对湿度 40%–70% 的条件下饲养 12 周。

1.4.2 POP 小鼠模型的验证 建模后 12 周, 取假手术组和卵巢切除组小鼠各 3 只, 注射 1% 戊巴比妥钠溶液麻醉, 固定并剪去小鼠胡须。用乙醇轻轻擦拭眼周皮肤待其自然干燥,

轻轻按压待取血部位的眼部皮肤使眼球充血突出。将小鼠头部朝下, 用弯头镊摘取眼球, 同时用指腹按压小鼠心脏部位加快滴血速度。将取出的血液收集于无菌无酶的 PE 管中, 静置 2–4 h 后可见血液分层, 吸取 100 μL 上层血清转移至新的无菌无酶的 PE 管中, 采用 ELISA 试剂盒检测血清中雌二醇水平。取血完成后采用颈椎脱臼法处死小鼠, 取出小鼠长骨, 去净骨上附着的软组织, 以 40 g/L 多聚甲醛溶液浸泡, 送至重庆医科大学附属口腔医院进行 Micro-CT 扫描及分析, 以 10.44 μm 分辨率扫描小鼠长骨(电流 500 mA、电压 160 kV), 通过计算机软件进行骨形态分析和三维重建。

1.4.3 BMSCs 的提取与培养 每组选取 6 只小鼠, 注射 1% 戊巴比妥钠溶液麻醉小鼠后采用颈椎脱臼法处死, 用体积分数 75% 乙醇浸泡 5 min, 取出小鼠置于超净工作台内, 组织剪分离小鼠长骨, 用无菌纱布去净骨上附着的软组织, 灭菌 PBS 冲洗 1 min, 置于含体积分数 15% 胎牛血清、1% 青霉素-链霉素混合液的 α-MEM 完全培养基中, 剪去胫骨以及股骨两端, 将其浸泡于完全培养基中, 用吸取完全培养基的 1 mL 注射器反复冲洗骨髓腔, 将混合液转移至 25 cm<sup>2</sup> 的透气培养瓶中, 轻轻振荡培养瓶, 静置于 37 °C、体积分数 5% CO<sub>2</sub> 细胞孵育箱中培养。观察细胞的生长状态, 每 2 d 更换 1 次完全培养基, 待贴壁细胞生长融合达到 85% 后, 用 0.25% 胰蛋白酶消化 1 min, 镜下观察贴壁细胞脱落后用 5% 完全培养基终止消化, 以 1 : 2 进行传代, BMSCs 传代至第 2 代后用于以下实验。

1.4.4 流式细胞仪检测细胞表面分子标志 将培养好的第 2 代 BMSCs 用 0.25% 胰蛋白酶消化, 以 300×g 低速离心 5 min, 弃上清, 用完全培养基重悬, 计数, 取 1.0×10<sup>9</sup> L<sup>-1</sup> 细胞(1 mL) 于新的 1.5 mL PE 管中, 300×g 低速离心 5 min, 弃上清, 用 100 μL 完全培养基重悬, 按说明书分别加入相应抗体及同型对照(PE 及 FITC 荧光标记的 CD106、CD44、CD29、CD34、CD45 抗小鼠抗体), 避光孵育 20 min, 加入 1.5 mL 灭菌 PBS 洗掉多余的流式抗体, 1 400 r/min 低速离心 5 min, 弃上清, 用 200 μL 完全培养基重悬, 200 目尼龙网过滤, 装入流式管中, 上机检测。

1.4.5 茜素红染色及油红 O 染色 将培养至第 3 代的 BMSCs, 按 1.0×10<sup>7</sup> L<sup>-1</sup> 细胞浓度加至 6 孔板内, 每孔 2 mL, 置于 37 °C、体积分数 5% CO<sub>2</sub> 细胞孵育箱内培养。待细胞密度达底板 85% 时, 弃去完全培养基, 分别加入成骨和成脂诱导培养基并诱导培养 21 d 及 14 d 后, 弃去诱导培养基, 加入 2 mL 40 g/L 多聚甲醛溶液固定 20 min, PBS 轻缓冲洗去除多聚甲醛溶液, 向成骨诱导组每孔中加入 1.2 mL 茜素红染液静置染色 10 min, 成脂诱导组每孔中加入 1.5 mL 油红 O 染液静置染色 30 min, PBS 轻缓冲洗去除残留染液, 于光学显微镜下观察染色结果并拍照。

1.4.6 BMSCs 的细胞因子抗体芯片检测 将培养好的第 2 代 BMSCs 用 0.25% 胰蛋白酶消化, 以 1 000 r/min 低速离心 5 min, 重悬后计数使细胞浓度为 3×10<sup>9</sup> L<sup>-1</sup>, 将细胞悬液转移至 1.5 mL 冻存管中, 以 800 r/min 低速离心 5 min, 弃上清液, 转移至 -80 °C 超低温冰箱中存储。假手术组和卵巢切除组均重复 3 个样本。采用 BCA 蛋白试剂盒按说明书操作提取样本中的总蛋白制备蛋白样本。利用细胞因子抗体芯片阵列对样品中的蛋白质初始氨基基团进行生物素化, 封闭载玻片阵列, 此过程类似于蛋白免疫印迹法, 将生物素标记的样品添加到

预先印有捕获抗体的载玻片上, 载玻片孵育后将与靶蛋白结合, 加入链霉亲和素偶联荧光染料 (Cy3 等效物), 待载玻片干燥后使用激光荧光扫描获取可视化信号。

#### 1.4.7 细胞因子抗体芯片数据分析

(1) 聚类热力图及差异表达基因的分析: 荧光检测后获得芯片扫描图, 对扫描图结果进行计算机分析后得到荧光值, 以荧光值作为原始值, 通过原始值去除背景信号值获得修正值, 以标准化方法通过阳参点做数据校正, 得到标准值并以此结果的  $\log_2$  来绘制聚类热力图。蛋白聚类分析是根据样品蛋白表达谱的相近程度将蛋白进行聚类, 直观展示蛋白在不同样品中的差异表达情况。其中横坐标为样本, 纵坐标为差异蛋白, 不同颜色表示不同的蛋白表达水平, 颜色由绿色经黑色至红色表示表达量从低到高。

通过计算卵巢切除组与假手术组表达量标准值的比值获得差异倍数 (fold change, FC)。FC 反映样本之间同一个蛋白表达量的变化倍数, 使用两独立样本  $t$  检验对两组之间的差异进行比较。依据 FC 值以及  $t$  检验的显著性水平, 可将每一个基因分为以下 3 类: ①上调基因: 需满足  $FC \geq 1.3$  且  $P < 0.05$ ; ②下调基因: 需满足  $FC \leq 0.667$  且  $P < 0.05$ ; ③无差异基因:  $1/1.5 < FC < 1.5$  或  $P \geq 0.05$ 。绘制火山图描述差异表达蛋白的整体分布情况。以  $\log_2 FC$  为横坐标, 代表蛋白在两组样本中差异表达倍数的对数;  $-\log_{10}(P \text{ 值})$  为纵坐标, 代表蛋白表达量变化差异的统计学显著性。

(2) 差异表达基因的 GO 及 KEGG 富集分析: 通过芯片检测结果并查找 NCBI 数据库进行搜索分析得到样本蛋白对应的 mRNA。借助 R 语言安装包 “ChIPseeker” 对富集峰进行注释; 特定基因组区域的热图由 deepTools 绘制。通过 GO 富集分析找到差异 mRNAs 主要参与的功能途径及信号传导途径。mRNAs 对应的 GO 注释分为 3 类: 生物过程 (biological process, BP)、细胞成分 (cellar component, CC) 和分子功能 (molecular function, MF)。根据富集结果采用 R 语言绘制 GO 富集性饼图、柱状图以及气泡图。KEGG 路径分析是将基因映射到 KEGG 途径的功能分析。通过 KEGG 数据库系统分析基因产物在细胞中的代谢途径以及这些基因产物的功能, 采用的基本方法是超几何分布。KEGG 富集性气泡图横轴表示富集因子, 纵轴表示路径; 气泡的面积越大, 则富集的基因数越多; Rich Factor 表示位于该通路的差异基因数与位于该通路的总基因数的比值, 其比值越大, 则富集的程度越大。P 值表示与条件相关途径的重要性, P 值越小, 则置信程度越高, 说明该途径越有意义。矫正后的 P 值  $< 0.05$  被认为差异有显著性意义。

(3) PPI 网络的构建: 通过 String 数据库 (<https://cn.string-db.org/>) 分析编码差异蛋白的 mRNAs 之间的相互作用, 构建 PPI 网络。

(4) 关键 Hub 基因获取: 通过 cytoHubba (版本 0.1) 将 PPI 网络图所得数据进行 Hub 基因筛选, 运用边缘渗透分量 (edge permeability component, EPC)、最大邻域分量 (maximum neighborhood component, MNC) 及最大集团中心性 (maximal clique centrality, MCC) 分析算法得到各自排名前 10 的 Hub 基因, 绘制韦恩图筛选出 3 种算法所得的共同 Hub 基因。对以上共同 Hub 基因绘制蛋白表达的小提琴图及相关性矩阵。

1.4.8 RT-qPCR 检测关键因子的表达 第 2 代假手术组和卵巢切除组小鼠 BMSCs 样本用于检测 GREM1 mRNA 的表达。根据 Trizol 说明书从样品中提取 RNA, 用 RNA 反转录试剂

盒对样品 RNA 进行反转录为 cDNA。将目的基因的引物序列 (GREM1: 5'-ATG AGA CGA AGT GGG GAG CT-3'; 3'-TTA CAG TGG GCA GGA GGA GT-5';  $\beta$ -actin: 5'-CTG GCA CCA CAC CTT CTA CA-3'; 3'-GGT ACG ACC AGA GGC ATA CA-5') 用 qRT-PCR 进行扩增反应, 配置扩增反应体系, 上 qRT-PCR 仪, 设置条件: 第 1 阶段 (预变性): 95 °C 5 min; 第 2 阶段 (变性): 95 °C 10 s; 第 3 阶段 (退火): 60 °C, 20 s; 第 4 阶段 (延伸): 70 °C, 1-10 s; 第 2-4 阶段反复循环 40 次。用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算基因表达的相对倍数。

1.5 主要观察指标 ①卵巢切除组与假手术组之间差异表达的基因筛选; ②差异表达基因的 GO 及 KEGG 富集分析; ③ PPI 蛋白互作网络分析及 Hub 基因筛选。

1.6 统计学分析 使用 GraphPad Prism 8.0 及 R 语言对数据进行统计分析, 组间比较采用两独立样本  $t$  检验, 以双尾  $P < 0.05$  为差异有显著性意义; 相关性矩阵采用 Pearson's 相关性系数, 以双尾  $P < 0.05$  为两组数据之间具有显著相关性,  $r$  取值介于 -1 至 1 之间, 其绝对值越接近 1 表明相关性越强, 当  $r$  取值为正时表明两组之间呈现正相关关系, 当  $r$  取值为负时表明两组之间呈现负相关关系。数据均采用  $\bar{x} \pm s$  形式进行描述。该文统计学方法已经通过遵义医科大学统计学专家审核。

## 2 结果 Results

2.1 POP 小鼠模型的鉴定结果 建模术后 12 周, 使用 ELISA 试剂盒检测假手术组与卵巢切除组血清雌二醇水平, 见图 2A, 卵巢切除组小鼠血清雌二醇水平低于假手术组, 差异有显著性意义 ( $t=13.368, P < 0.001$ )。Micro CT 扫描假手术组与卵巢切除组小鼠的股骨并进行形态学分析, 见图 2B-D, 结果显示与假手术组相比, 卵巢切除组骨小梁数目 (Tb.N,  $t=5.188, P=0.003$ )、骨小梁厚度 (Tb.Th,  $t=5.124, P=0.003$ ) 与骨体积分数 (BV/TV,  $t=4.677, P=0.005$ ) 均显著低于假手术组, 而卵巢切除组骨表面积体积比 (BS/BV,  $t=5.650, P=0.002$ ) 及骨小梁间隙 (Tb.Sp,  $t=12.779, P < 0.001$ ) 均显著高于假手术组, 表明卵巢切除组小鼠存在明显的骨质疏松样改变。

2.2 BMSCs 的形态及鉴定结果 经全骨髓贴壁法培养后, 在光学显微镜下观察两组 BMSCs 的生长情况及细胞形态, 可见两组 BMSCs 均能贴壁生长, 呈梭形或扁平多角形, 具有间充质干细胞形态特征, 见图 3。

取第 2 代小鼠骨髓间充质干细胞进行流式检测 CD34、CD45、CD44、CD106 和 CD29 等标志物的表达, 结果显示: CD44、CD106 和 CD29 抗原高表达, CD34 和 CD45 抗原低表达, 具有间充质干细胞特性, 见图 4。

卵巢切除组和假手术组 BMSCs 成骨诱导 21 d 后行茜素红染色, 光学显微镜下可见两组 BMSCs 均有钙化结节的产生, 见图 5A, 具有成骨分化潜能。卵巢切除组和假手术组 BMSCs 成脂诱导 14 d 后行油红 O 染色, 光学显微镜下可见两组 BMSCs 均有脂滴的产生, 见图 5B, 具有成脂分化潜能。两组 BMSCs 均符合骨髓间充质干细胞特性。

2.3 抗体芯片检测结果 通过细胞因子抗体芯片检测假手术组和卵巢切除组中存在差异表达的蛋白, 荧光检测后获得荧光扫描图, 见图 6A。以卵巢切除组的蛋白表达量与假手术组的蛋白表达量的比值作为差异倍数。其中上调组需满足  $FC \geq 1.3$  且  $P$  值  $< 0.05$ ; 下调组需满足  $FC \leq 0.7$  且  $P$  值  $< 0.05$ 。差异蛋白聚类热力图与火山图揭示两组样本中存在明

显差异表达且具有统计学意义的蛋白, 见图 6B, C。结果显示, 与假手术组相比, 卵巢切除组中表达上调的蛋白有 3 个, 分别是 Gremlin, GHR, Ax1; 下调的有 VE-Cadherin, M-CSF, Prolactin, IL-16, CXCL5, TNF-beta/TNFSF1B, IFN-gamma R1, VEGF-D, Soggy-1 等 65 个蛋白。

**2.4 差异表达 mRNAs 的 GO 富集分析** 在 NCBI 数据库进行搜索并查找分析, 得到样本蛋白对应的 mRNAs 进行 GO 富集分析, 见图 7。GO 功能富集分析结果表明: mRNA 在生物过程中主要参与细胞表面受体信号通路、对刺激反应的调节、细胞迁移、多细胞生物过程的调节、白细胞游走、免疫系统过程等; 细胞成分中主要相关的有胞外区、细胞外间隙、细胞表面、细胞解剖实体、细胞外周等; 而分子功能中主要包含信号受体结合、细胞因子受体结合、信号受体调节活性、受体配体活性、信号受体激活活性等。

**2.5 差异表达 mRNAs 的 KEGG 富集分析** KEGG 富集分析结果显示差异基因主要富集于细胞因子-细胞因子受体的相互作用、病毒蛋白与细胞因子和细胞因子受体的相互作用、TNF 信号通路、趋化因子信号通路、JAK-STAT 信号通路、类风湿性关节炎等, 见图 8, 其中显著性最高的是细胞因子-细胞因子受体的相互作用。

**2.6 PPI 分析和 Hub 基因筛选** 芯片检测样本中 308 种蛋白, 结果显示 68 种蛋白存在差异, 通过 String 数据库分析存在差异表达的 mRNAs 间的相互作用, 构建 PPI 网络, 见图 9。结果显示, 网络包含 49 个节点和 239 条边, 网络中平均节点度为 9.67, 集聚系数为 0.614, PPI 富集  $P$  值为  $< 1.0 \times 10^{-16}$ 。将 String 数据分析结果导入 Cytoscape 软件进一步分析, 通过 cytoHubba(版本 0.1) 进行 Hub 基因筛选, 运用 MCC、MNC 和 EPC 算法分别获得了排名前 10 的基因作为 Hub 基因, 见图 10A-C(图中 Hub 基因标记为黄色), 颜色越深代表 ranked score 排名越靠前。将 3 种算法所得 Hub 基因绘制韦恩图, 见图 10D, 取交集或并集增加 Hub 基因可信度, 最终得到 8 个共同的 Hub 基因, 分别为 CXCL10、CCL5、CXCL5、IL-10、CXCL15、CXCL13、CCR7 和 IL-15。对以上 8 个 Hub 基因绘制差异表达小提琴图, 见图 11, 图中可见在卵巢切除组中以上 8 个基因较假手术组均显著下调; 再对以上 8 个基因的表达水平绘制相关性矩阵, 见图 12, 图中可见不同的 Hub 基因之间存在较强的正相关关系, 说明各基因的表达水平的上升及下降趋势一致, 这与图 10 所示各基因均为下调基因的结果相一致。

**2.7 RT-qPCR 初步验证芯片检测基因** 芯片检测结果显示假手术组与卵巢切除组中有 68 种蛋白存在差异表达, 上调的蛋白有 3 种, 分别是 Gremlin, AXL, GHR。其中 Gremlin 为上调组中差异最明显的蛋白, Gremlin 在假手术组与卵巢切除组的表达差异倍数为 1.73 倍。既往文献指出 Gremlin 与骨分化具有相关性, 因此选择 Gremlin 作为后续实验研究。采用 RT-qPCR 检测 GREM1 在假手术组及卵巢切除组 BMSCs 中的表达量, 发现卵巢切除组 GREM1 的表达高于假手术组 ( $P < 0.05$ ), 与芯片筛选结果一致, 见图 13。

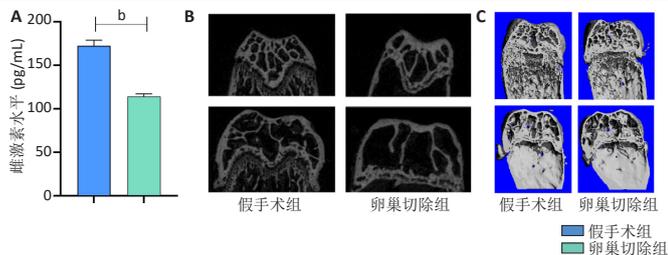
### 3 讨论 Discussion

骨质疏松症是一个日益严重的公共卫生问题, 造成了极大的医疗、社会和经济负担<sup>[13]</sup>。在中国, 预计到 2035 年,

与骨质疏松症相关的疾病每年花费将高达 1 429.8 亿元<sup>[14]</sup>。众所周知, 骨质疏松症与骨重建失衡有明确关系, 而雌激素缺乏是骨质疏松症最重要的发病机制之一<sup>[15]</sup>。在绝经女性中, 雌激素缺乏会使得 RANKL 的受体激活因子表达上调<sup>[16]</sup>, 并通过结合单核细胞膜上的 RANK 进一步激活 NF- $\kappa$ B 通路, 从而上调 c-Fos 基因的表达<sup>[17]</sup>。此外, RANKL 通过启动一系列信号分子如 p38、细胞外信号调节激酶 (extracellular regulated protein kinases, ERK) 和 c-Jun N-末端激酶 (c-Jun N-terminal kinase, JNK) 的磷酸化以激活丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 通路<sup>[18]</sup>。两种途径的激活都会促使单核细胞分化为破骨细胞, 并启动包括基质金属蛋白酶和碱性磷酸酶等在内的基因转录程序, 最终促进骨吸收和骨量丢失<sup>[19]</sup>。同时, 雌激素缺乏会导致免疫网络失衡并上调肿瘤坏死因子  $\beta$  以抑制骨形成<sup>[20]</sup>。

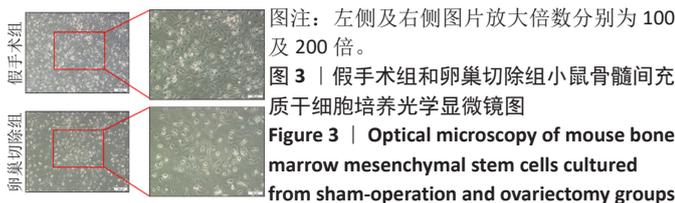
越来越多的证据表明, 免疫系统和骨骼系统具有许多共同的调节分子, 包括细胞因子、受体、信号分子和转录因子<sup>[21]</sup>。虽然骨免疫学最初主要集中于破骨细胞免疫调节的研究, 但其范围已逐渐扩展到广泛的分子和细胞相互作用, 包括成骨细胞和破骨细胞、淋巴细胞和破骨细胞、成骨细胞和造血细胞之间的相互作用<sup>[22]</sup>。研究发现, Schnurri-3(SHN3) 是一种锌指蛋白, 并被鉴定为一种可参与调节免疫球蛋白基因 V(D)J 重组的 DNA 结合蛋白<sup>[23]</sup>; SHN3 通过蛋白水解 RUNX2 在调控骨形成中起着重要作用。CENCI 等<sup>[24]</sup>结合 CD4<sup>+</sup> 和 CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞亚群在骨质疏松症妇女体内分布的改变, 提出了 T 细胞在绝经后骨丢失发病机制中发挥重要作用的可能性, 并通过构建 T 细胞缺陷的裸鼠进行实验发现, 在未经卵巢切除的情况下就能引起显著的骨丢失, 表明雌激素对骨骼的调节与免疫系统之间存在联系。TEITELBAUM<sup>[25]</sup>认为绝经后雌激素水平降低可刺激 T 细胞中干扰素的高表达, 进而增强巨噬细胞的 II 类主要组织相容性复合物反式激活因子的表达, 由此产生抗原递呈并促使分泌 TNF- $\alpha$  的效应 T 细胞激活并迅速增殖, 从而增加周围环境中细胞因子的水平; TNF- $\alpha$  促进骨髓基质细胞表达 RANKL, 从而激活巨噬细胞的 RANK 信号转导, 诱导其分化为破骨细胞。雌激素调节 T 细胞免疫反应和 T 细胞介导的自身免疫参与骨质疏松症的可能性仍有很大的争议<sup>[26]</sup>。因此, POP 与骨免疫之间的作用机制值得进一步探索。

该研究通过微阵列基因芯片技术筛选样本中存在差异表达的蛋白, 共检测 308 种蛋白, 其中 68 种蛋白的表达存在较大差异倍数且具有统计学意义。对 68 种差异蛋白所属的 mRNA 进行 GO、KEGG 富集分析, 发现它们涉及了多种生物学过程及相关通路。在生物过程这一层面, 多数基因富集于细胞表面受体信号通路且相关性较高; 在分子功能这一层面, 参与基因数量最多且相关性最高的是信号受体结合; 在细胞成分这一层面, 多数基因富集于胞外区、细胞外间隙和细胞解剖实体且相关性均较高; 这些差异蛋白主要富集在细胞因子-细胞因子受体相互作用、病毒蛋白与细胞因子和细胞因子的相互作用、趋化因子、TNF、JAK-STAT 和 PI3K-Akt 信号通路, 类风湿性关节炎、Th17 细胞分化和白细胞介素 17 信号通路。根据 PPI 的数据进行 Hub 基因筛选, 最终得到可靠度较高的 8 个 Hub 基因, 包括 CXCL10、CCL5、CXCL5、IL-10、CXCL15、CXCL13、CCR7 和 IL-15。



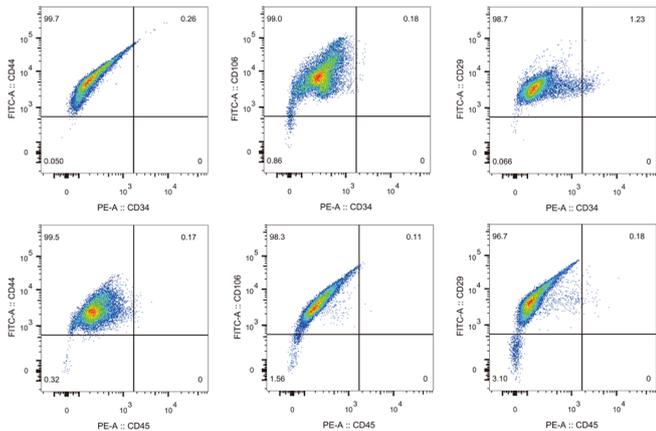
图注：图 A 为小鼠血清雌二醇水平；B、C 为小鼠骨组织 micro-CT 扫描的二维及三维重建图（上、下图代表 2 个不同扫描层面）；D 为骨组织形态计量学分析结果。BV/TV：骨体积分数，BS/BV：骨表面积体积比，Tb.N：骨小梁数目，Tb.Th：骨小梁厚度，Tb.Sp：骨小梁间隙。<sup>a</sup> $P < 0.01$ ，<sup>b</sup> $P < 0.001$ 。

图 2 | 绝经后骨质疏松小鼠模型的鉴定  
Figure 2 | Identification of a mouse model of postmenopausal osteoporosis



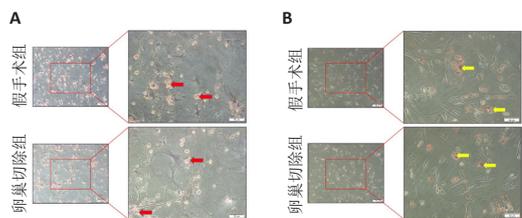
图注：左侧及右侧图片放大倍数分别为 100 及 200 倍。  
图 3 | 假手术组和卵巢切除组小鼠骨髓间充质干细胞培养光学显微镜图

Figure 3 | Optical microscopy of mouse bone marrow mesenchymal stem cells cultured from sham-operation and ovariectomy groups



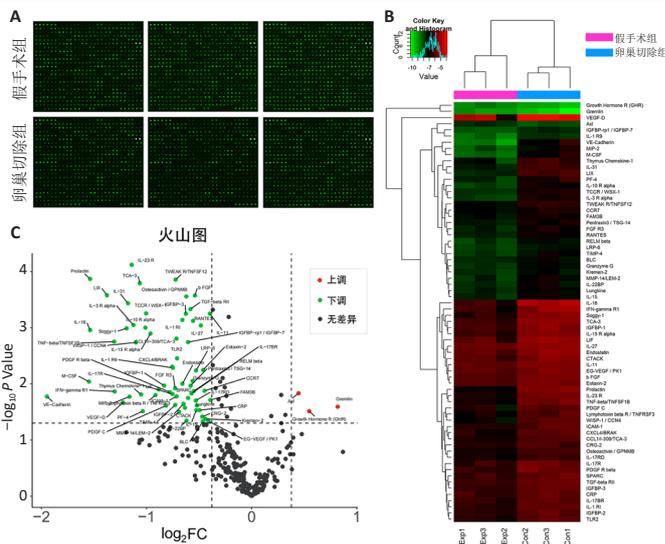
图注：CD44、CD106 和 CD29 抗原高表达，CD34 和 CD45 抗原低表达。

图 4 | 流式细胞术检测骨髓间充质干细胞表面抗原标志物的表达  
Figure 4 | Measurement of antigen markers on surface of bone marrow mesenchymal stem cells by flow cytometry



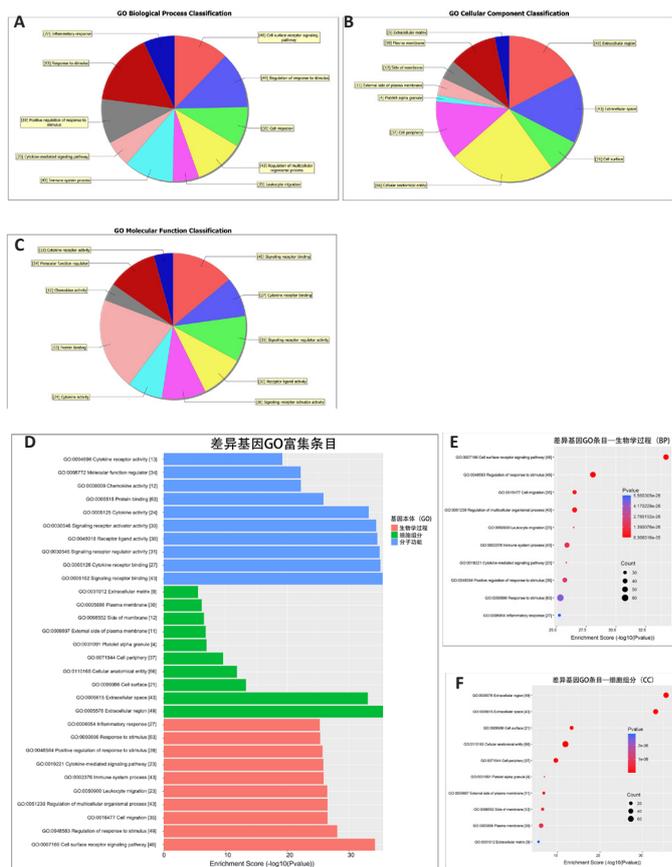
图注：图 A 为假手术组和卵巢切除组小鼠骨髓间充质干细胞成骨诱导 21 d 后茜素红染色；B 为假手术组和卵巢切除组小鼠骨髓间充质干细胞成脂诱导 14 d 后油红 O 染色。放大倍数分别为 100 倍、200 倍，红色箭头所指为矿化结节，黄色箭头所指为脂滴。

图 5 | 两组小鼠骨髓间充质干细胞成骨诱导及成脂诱导后染色图  
Figure 5 | Staining of mouse bone marrow mesenchymal stem cells after osteogenic induction and lipogenic induction in both groups

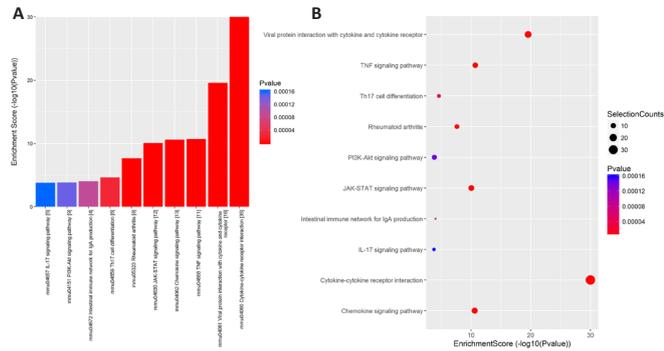


图注：图 A 为蛋白抗体微阵列芯片荧光扫描图；B 为差异表达蛋白的聚类热图，左侧 3 列为卵巢切除组样本，右侧 3 列为假手术组样本，由绿色到黑色再到红色表明蛋白表达量由低到高变化；C 为差异表达蛋白的火山图，绿色为下调基因，红色为上调基因。

图 6 | 抗体芯片检测结果  
Figure 6 | Antibody chip test results

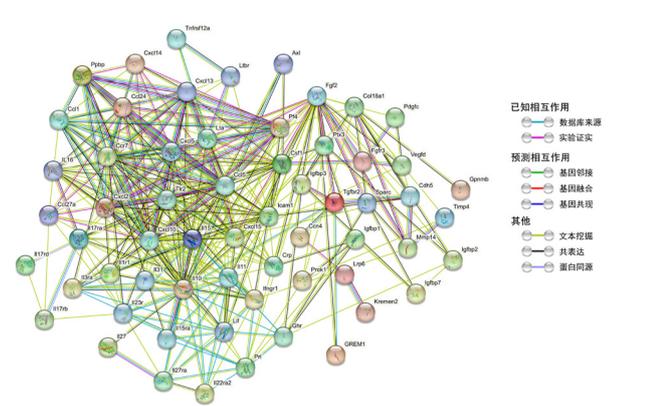


图注：气泡图中不同的颜色代表差异富集结果的重要性（由紫色到红色重要性逐渐增加），圆圈的大小代表富集基因的数量。  
图 7 | 差异表达 mRNAs 的 GO 功能富集分析饼图 (A-C)、柱形图 (D) 及气泡图 (E-G)  
Figure 7 | Pie (A-C), column (D), and bubble charts (E-G) for gene ontology enrichment analysis of differentially expressed mRNAs



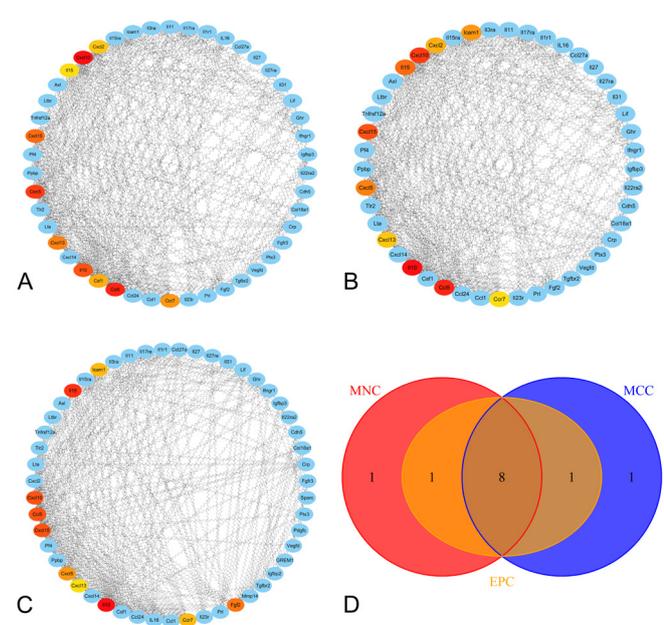
图注：不同的颜色代表富集结果的重要性（由紫色到红色重要性逐渐增加），圆圈大小代表富集基因的数量。

图 8 | KEGG 生物通路富集分析柱形图 (A) 及气泡图 (B)  
Figure 8 | Column diagram (A) and bubble diagram (B) for Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes biopathway enrichment analysis



图注：节点代表蛋白，连线代表蛋白间相关关系；若该蛋白三维结构已知，则在节点内部以螺旋状结构表示；若未知，则节点内部为空白。

图 9 | 差异蛋白的蛋白相互作用 (PPI) 网络图  
Figure 9 | Protein-protein interaction network for differentially expressed proteins



图注：图 A 为 Hub 基因 MCC 算法；B 为 Hub 基因 EPC 算法；C 为 Hub 基因 MNC 算法；D 为结合 3 种算法绘制所得韦恩图。图 A-C 中排名前 10 的 Hub 基因被标记为黄色，且黄色越深表明 Hub 基因的等级分数越高。

图 10 | Hub 基因筛选  
Figure 10 | Hub gene screening

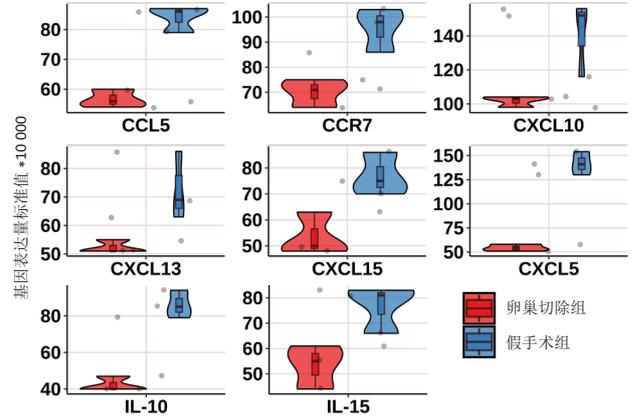
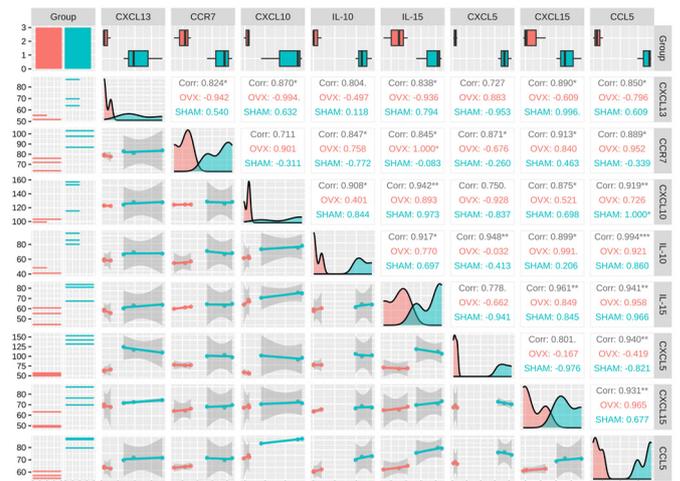


图 11 | Hub 基因差异表达小提琴图  
Figure 11 | Violin plot for differentially expressed Hub genes



图注：图中绿色代表假手术组，红色代表卵巢切除组；对角线为两组中各 Hub 基因表达量的分布密度图；左下角为两组中各 Hub 基因表达量的相关性散点分布图；右上角为任意两两 Hub 基因之间 Pearson's 相关性分析的相关性系数 r 及显著性 ( $P < 0.05$ ,  $^{**}P < 0.01$ ,  $^{***}P < 0.001$ )。

图 12 | Hub 基因相关性分析矩阵图  
Figure 12 | Correlation analysis matrix for the Hub genes

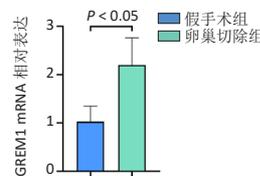


图 13 | 假手术组与卵巢切除组中 GREM1 的内源性表达量  
Figure 13 | Endogenous expression of GREM1 in the sham-operation and ovariectomy groups

CXCL10 是 Th1 趋化因子的一种，它与受体 CXCR3 结合，并通过激活和募集白细胞，如 T 细胞、嗜酸性粒细胞和单核细胞来调节免疫反应，CXCL10 在类风湿性关节炎滑膜组织中通过 NF- $\kappa$ B 配体受体激活剂诱导的骨质破坏参与致病过程 [27-28]。研究表明 BMSCs 能有效降低风湿性关节炎患者单核细胞亚群的 TNF- $\alpha$ 、CD33、CCR7 和 MIP-1 $\beta$  蛋白水平 [29]。FENG 等 [30] 研究发现，椎间盘移位导致关节面压力显著升高，通过激活 CCL5 趋化因子受体 -AKT2(CCL5-CCRS-AKT2) 轴导致软骨下骨丢失；抑制 CCL5 或 AKT2 可减少软骨下骨丢失，改善软骨下骨微结构；细胞学研究证实 CCL5 通过与其受体 CCR5 结合和激活 AKT2 通路来调节破骨细胞的形成。CHEN 等 [31] 通过运用单细胞 RNA 测序技术对牙周炎患者与健康人的单细胞进行鉴定，建立牙周组织骨免疫微环境的细胞图谱；与健康人相比，牙周炎患者 TNFRSF21 $^{+}$  成纤维细

胞富集, 并高表达 CXCL1、CXCL2、CXCL5、CXCL6、CXCL13 和 IL-24。CHEN 等<sup>[32]</sup> 研究发现通过将 M2 巨噬细胞来源外泌体中的 IL-10 mRNA 直接递送至细胞, 上调 BMSCs 和骨髓巨噬细胞的 IL-10 细胞因子表达, 从而激活细胞 IL-10/IL-10R 通路, 调节细胞分化和骨代谢。有研究认为血小板源性溶血磷脂酸 (latelet-derived lysophosphatidic acid, LD-LPA) 可能通过诱导骨细胞树突生长而影响骨折愈合<sup>[33]</sup>, LD-LPA 可能通过激活 LPA1、GI/O 蛋白和 PKC $\theta$  通路诱导性抑制 MLO-Y4 细胞产生 IL-6 和 CXCL15。LE MERCIER 等<sup>[34]</sup> 通过构建组成性 G 蛋白偶联受体 182(GPR182) 缺陷小鼠, 诱导内皮特异性 GPR182 丢失, 发现血浆中 CXCL10、CXCL12 和 CXCL13 水平显著升高, GPR182 缺陷小鼠骨髓造血干细胞明显减少, 血液和脾脏造血祖细胞集落形成单位明显增加; 作者认为 GPR182 是 CXCL10、CXCL12 和 CXCL13 的一个新的非典型趋化因子受体, 参与造血干细胞稳态的调节。KOH 等<sup>[35]</sup> 认为 IL-15 通过刺激破骨细胞分化和参与介导炎性骨丢失和骨代谢。该研究所筛选的关键免疫相关因子在骨疾病方面已有大量研究, 但在骨质疏松症尤其是绝经后雌激素下降和免疫因子之间的影响机制还有待更多的研究去探索。

综上所述, 该研究构建了 POP 小鼠 BMSCs 差异基因表达谱, 并分析了具有潜在靶向的信号通路及细胞生物学过程, 同时筛选了 Hub 基因并对其差异性表达进行分析。此外, 对所获得的相关 Hub 差异基因在骨疾病中的作用机制展开分析。多种免疫相关因子参与到 POP 的发展过程中, 针对骨免疫的进一步研究将有助于更加深入了解其背后的分子机制, 探讨免疫因子与骨质疏松症之间的关系, 为 POP 的治疗提供新的靶点。然而, 由于研究样本量较少, 可能仍有大量细胞因子未被列举, 后续研究应该以更完善的实验流程对其展开研究, 并针对所挑选基因通过实验验证及分析其对骨分化的作用机制。

**作者贡献:** 文章由杨杉杉、杨晓红共同设计, 杨杉杉完成写作, 欧阳仁俊和田佳负责实验操作及数据分析处理, 令狐敏和王振负责数据和文章的校对, 杨晓红进行审核。

**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:** 该文章撰写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 次文字和图表查重; 文章经小同行外审专家双盲审稿, 同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

#### 4 参考文献 References

[1] 中华医学会骨质疏松和骨矿盐疾病分会. 原发性骨质疏松症诊疗指南 (2022) [J]. 中国全科医学, 2023, 26(14):1671-1691.

[2] YU F, XIA W. The epidemiology of osteoporosis, associated fragility fractures, and management gap in China. Arch Osteoporos. 2019;14(1):32.

[3] BREUIL V, TICCHIONI M, TESTA J, et al. Immune changes in post-menopausal osteoporosis: the Immunos study. Osteoporos Int. 2010;21(5):805-814.

[4] FANG H, ZHANG H, WANG Z, et al. Systemic immune-inflammation index acts as a novel diagnostic biomarker for postmenopausal osteoporosis and could predict the risk of osteoporotic fracture. J Clin Lab Anal. 2020;34(1):e23016.

[5] WANG L, ZHAO Y, LIU Y, et al. IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  synergistically induce mesenchymal stem cell impairment and tumorigenesis via NF $\kappa$ B signaling. Stem Cells. 2013; 31(7):1383-1395.

[6] FISCHER V, HAFFNER-LUNTZER M. Interaction between bone and immune cells: Implications for postmenopausal osteoporosis. Semin Cell Dev Biol. 2022;123:14-21.

[7] ZHANG W, DANG K, HUAI Y, et al. Osteoimmunology: The Regulatory Roles of T Lymphocytes in Osteoporosis. Front Endocrinol (Lausanne). 2020;11:465.

[8] YU M, PAL S, PATERSON CW, et al. Ovariectomy induces bone loss via microbial-dependent trafficking of intestinal TNF+ T cells and Th17 cells. J Clin Invest. 2021;131(4):e143137.

[9] WANG Z, GERSTEIN M, SNYDER M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. Nat Rev Genet. 2009;10(1):57-63.

[10] 周子墨, 陈佳慧, 陈森相, 等. 基于生物信息学分析老年骨质疏松差异表达基因及 m6A 相关蛋白的研究 [J]. 中国医科大学学报, 2022, 51(11):975-979, 986.

[11] KIM PG, NIROULA A, SHKOLNIK V, et al. Dnmt3a-mutated clonal hematopoiesis promotes osteoporosis. J Exp Med. 2021;218(12):e20211872.

[12] QIAN GF, YUAN LS, CHEN M, et al. PPWD1 is associated with the occurrence of postmenopausal osteoporosis as determined by weighted gene co-expression network analysis. Mol Med Rep. 2019;20(4):3202-3214.

[13] CAMACHO PM, PETAK SM, BINKLEY N, et al. American association of clinical endocrinologists/american college of endocrinology clinical practice guidelines for the diagnosis and treatment of postmenopausal osteoporosis- 2020 update executive summary. Endocr Pract. 2020;26(5):564-570.

[14] XIAO PL, CUI AY, HSU CJ, et al. Global, regional prevalence, and risk factors of osteoporosis according to the World Health Organization diagnostic criteria: a systematic review and meta-analysis. Osteoporos Int. 2022;33(10):2137-2153.

[15] KHOSLA S, MONROE DG. Regulation of Bone Metabolism by Sex Steroids. Cold Spring Harb Perspect Med. 2018;8(1):a031211.

[16] LEE JW, HOSHINO A, INOUE K, et al. The HIV co-receptor CCR5 regulates osteoclast function. Nat Commun. 2017;8(1):2226.

[17] SAITO H, GASSER A, BOLAMPERTI S, et al. Tgif1-deficiency attenuates bone remodeling and blunts the anabolic response to parathyroid hormone. Nat Commun. 2019;10(1):1354.

[18] CHEN K, QIU P, YUAN Y, et al. Pseurotin A Inhibits Osteoclastogenesis and Prevents Ovariectomized-Induced Bone Loss by Suppressing Reactive Oxygen Species. Theranostics. 2019;9(6):1634-1650.

[19] LI J, AYOUB A, XIU Y, et al. TGF $\beta$ -induced degradation of TRAF3 in mesenchymal progenitor cells causes age-related osteoporosis. Nat Commun. 2019;10(1):2795.

[20] WALSH MC, TAKEGAHARA N, KIM H, et al. Updating osteoimmunology: regulation of bone cells by innate and adaptive immunity. Nat Rev Rheumatol. 2018;14(3):146-156.

[21] WALSH MC, KIM N, KADONO Y, et al. Osteoimmunology: interplay between the immune system and bone metabolism. Annu Rev Immunol. 2006;24:33-63.

[22] TAKAYANAGI H. Osteoimmunology: shared mechanisms and crosstalk between the immune and bone systems. Nat Rev Immunol. 2007;7(4):292-304.

[23] JONES DC, WEIN MN, OUKKA M, et al. Regulation of adult bone mass by the zinc finger adapter protein Schnurri-3. Science. 2006;312(5777):1223-1227.

[24] CENCI S, WEITZMANN MN, ROGGIA C, et al. Estrogen deficiency induces bone loss by enhancing T-cell production of TNF-alpha. J Clin Invest. 2000;106(10):1229-1237.

[25] TEITELBAUM SL. Postmenopausal osteoporosis, T cells, and immune dysfunction. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004;101(48):16711-16712.

[26] LEE SK, KADONO Y, OKADA F, et al. T lymphocyte-deficient mice lose trabecular bone mass with ovariectomy. J Bone Miner Res. 2006;21(11):1704-1712.

[27] LEE EY, LEE ZH, SONG YW. CXCL10 and autoimmune diseases. Autoimmun Rev. 2009;8(5):379-383.

[28] LEE EY, LEE ZH, SONG YW. The interaction between CXCL10 and cytokines in chronic inflammatory arthritis. Autoimmun Rev. 2013;12(5):554-557.

[29] LARANJEIRA P, PEDROSA M, DUARTE C, et al. Human Bone Marrow Mesenchymal Stromal/Stem Cells Regulate the Proinflammatory Response of Monocytes and Myeloid Dendritic Cells from Patients with Rheumatoid Arthritis. Pharmaceuticals. 2022;14(2):404.

[30] FENG SY, LEI J, LI YX, et al. Increased joint loading induces subchondral bone loss of the temporomandibular joint via the RANTES-CCR5-Akt2 axis. JCI Insight. 2022;7(21):e158874.

[31] CHEN Y, WANG H, YANG Q, et al. Single-cell RNA landscape of the osteoimmunology microenvironment in periodontitis. Theranostics. 2022;12(3): 1074-1096.

[32] CHEN X, WAN Z, YANG L, et al. Exosomes derived from reparative M2-like macrophages prevent bone loss in murine periodontitis models via IL-10 mRNA. J Nanobiotechnology. 2022;20(1):110.

[33] WU X, MA Y, CHEN H, et al. Lysophosphatidic acid induces interleukin-6 and CXCL15 secretion from MLO-Y4 cells through activation of the LPA1 receptor and PKC $\theta$  signaling pathway. Int Immunopharmacol. 2019;74:105664.

[34] LE MERCIER A, BONNAVION R, YU W, et al. GPR182 is an endothelium-specific atypical chemokine receptor that maintains hematopoietic stem cell homeostasis. Proc Natl Acad Sci U S A. 2021;118(17):e2021596118.

[35] KOH JM, OH B, HA MH, et al. Association of IL-15 polymorphisms with bone mineral density in postmenopausal Korean women. Calcif Tissue Int. 2009;85(5): 369-378.

(责任编辑: ZM, MZH, ZN, QY)