

· 论著 ·

[文章编号] 1007-0893(2024)10-0001-06

DOI: 10.16458/j.cnki.1007-0893.2024.10.001

基于生物信息学分析雌激素对软骨细胞分泌炎症因子表达谱的影响

李永胜^{1,3} 黄泽祈^{2,3} 赵喆³ 邓志钦³ 邓桢翰^{1,4*} 李文翠^{3*}

(1. 汕头大学医学院, 广东 汕头 515000; 2. 深圳大学医学部, 广东 深圳 518060; 3. 深圳市第二人民医院, 广东 深圳 518035; 4. 温州医科大学附属第一医院, 浙江 温州 325000)

[摘要] 目的: 探讨雌激素介导软骨细胞分泌炎症因子的机制。方法: 收集深圳市第二人民医院收治的股骨颈骨折患者, 从髋关节置换术中无菌取出的股骨头中, 分离培养关节软骨细胞。空白对照组仅加入软骨细胞培养液, 其他观察分组除软骨细胞培养液, 分别加入雌二醇 (E2)、雌激素受体 α (ER α)、雌激素受体 β (ER β) 和雌激素受体阻断剂氟维司群 (Ful), 均培养 48 h, 与空白对照组进行比较; 通过 GSH-INF-3 芯片分析软骨细胞分泌的炎症因子, 在 DAVID 网站 (<https://david.ncifcrf.gov/>) 进行信号通路富集基因本体 (GO) 和京都基因组与基因组百科全书 (KEGG) 分析, 阐明雌激素调控软骨细胞表达关键基因与分子标记。结果: 观察组中各组与空白对照组比较, 均鉴定出差异蛋白表达, 通过蛋白质谱分析筛选得到目的基因, 当雌激素介导软骨细胞分泌验证因子时, 上调的基因包括: 白细胞介素 (IL)-1 α 、IL-5、IL-11、细胞间黏附分子-1 (ICAM-1)、肿瘤坏死因子受体 I (TNF-RI)、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF)、IL-12P70、组织金属蛋白酶抑制物 (TIMP)-1 和巨噬细胞炎症蛋白 (MIP)-1 β ; 下调的基因包括 B 淋巴细胞趋化因子 (BLC)、单核细胞集落刺激因子 (MCSF)、单核细胞趋化蛋白-1 (MCP-1)、IL-17、IL-2、IL-4、TNF- α 和 IL-8; GO 分析示差异基因多富集于细胞因子介导的信号通路、内质网的内腔、信号受体激活剂活性和受体配体活性。KEGG 分析示以细胞因子活性、细胞因子-细胞因子受体相互作用和类风湿性关节炎通路参与雌激素激活软骨细胞炎症因子。结论: 雌激素主要通过细胞因子活性和细胞因子-细胞因子受体相互作用通路, 上调 IL-5、IL-11、TNF-RI、ICAM-1 和 IL-1 α 等软骨细胞分泌因子的关键基因, 其可能成为骨性关节炎 (OA) 的潜在治疗靶点。

[关键词] 骨性关节炎; 软骨细胞; 雌激素; 炎症因子; 生物信息学**[中图分类号]** R 684.3 **[文献标识码]** B

Analysis of the Effect of Estrogen on the Expression Profile of Inflammatory Factors Secreted by Chondrocytes Based on Bioinformatics

LI Yongsheng^{1,3}, HUANG Zeqi^{2,3}, ZHAO Zhe³, DENG Zhiqin³, DENG Zhenhan^{1,4*}, LI Wencui^{3*}

(1. Shantou University Medical College, Guangdong Shantou 515000; 2. Shenzhen University Medical school, Guangdong Shenzhen 518060; 3. Shenzhen Second People's Hospital, Guangdong Shenzhen 518035; 4. The First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Zhejiang Wenzhou 325000)

[Abstract] **Objective** To investigate the mechanism of estrogen mediated chondrocyte secretion of inflammatory cytokines. **Methods** Patients with femoral neck fracture admitted to Shenzhen Second People's Hospital were collected, and the femoral head was sterile removed during hip replacement, and the articular chondrocytes were isolated and cultured. Only chondrocyte culture

[收稿日期] 2024 - 03 - 10**[基金项目]** 国家自然科学基金面上项目 (82172465); 中国高校产学研创新基金 (2021JH037); 广东省临床重点学科骨科 (2000005); 广东省自然科学基金项目 (2021A1515010706, 2023A1515010102); 深圳市重点医学学科建设基金 (SZXK025); 深圳市科技计划国际合作项目 (GJHZ20210705142007023); 深圳市医疗卫生“三名工程”项目 (SZSM202311008)**[作者简介]** 李永胜, 男, 主治医师, 主要研究方向是四肢各关节相关疾病。**[*通信作者]** 邓桢翰 (E-mail: dengzhenhan@wmu.edu.cn; Tel: 18367800260);

李文翠 (E-mail: 13923750767@163.com; Tel: 13923750767)

medium was added to the blank control group. In addition to chondrocyte culture medium, estradiol (E2), estrogen receptor α (ER α), estrogen receptor β (ER β) and estrogen receptor blocker fluvestrant (Ful) were added to the other observation groups, and cultured for 48 h, compared with the blank control group. By analyzing GSH-IN-3 chip chondrocytes secretion of the inflammatory factor, enrichment of signaling pathways in DAVID website (<https://david.ncicrf.gov/>) gene ontology (GO) and the Kyoto encyclopedia genome and genomes (KEGG) analysis, to elucidate the key genes and molecular markers of estrogen regulation of chondrocyte expression. **Results** Compared with the blank control group, different protein expressions were identified in all groups in the observation group. The target genes were screened through protein profiling. When estrogen mediated chondrocyte secretion of validation factors, the up-regulated genes included: interleukin (*IL*) -1 α , *IL*-5, *IL*-11, intercellular adhesion molecule-1 (*ICAM*-1), tumor necrosis factor (TNF) -RI, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), IL-12P70, tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-1, and macrophage inflammatory protein (MIP)-1 β . Down-regulated genes included B lymphocyte chemokine (BLC), monocyte colony stimulating factor (MCSF), monocyte chemokine protein-1 (MCP-1), IL-17, IL-2, IL-4, TNF- α and IL-8. GO analysis showed that differential genes were mainly concentrated in cytokine-mediated signaling pathways, endoplasmic reticulum lumen, signaling receptor activator activity and receptor ligand activity. KEGG analysis showed that cytokine activity, cytokine-cytokine receptor interactions, and the rheumatoid arthritis pathway were involved in estrogen activation of chondrocyte inflammatory factors. **Conclusion** Estrogen mainly up-regulates IL-5, IL-11, TNF-RI, ICAM-1, and IL-1 α , which are key genes of chondrocyte secretion factors through cytokine activity and cytokine-cytokine receptor interactions, and may be potential therapeutic targets for osteoarthritis (OA).

[Keywords] Osteoarthritis; Chondrocyte; Estrogen; Inflammatory factors; Bioinformatics analysis

随着社会老龄化加剧, 和年龄呈正相关的骨性关节炎 (osteoarthritis, OA) 发病率显著上升。晚期 OA 患者通常进行关节置换手术, 自 2000 年至 2020 年, 我国膝关节 OA 的发病率增长了 50%, 是致残率第二高的疾病^[1]。我国每年晚期的 OA 患者进行人工关节置换术, 约 40 万人次, 总花费 30 亿以上, 给患者家庭和社会造成了沉重的负担, 显然 OA 已成为危害老年人严重疾病, 阐明 OA 的发病机制对于预防和延缓 OA 具有显著社会价值。

本研究在前人研究基础上优化筛选条件, 进一步了解到女性雌激素水平下降可引发软骨基质合成-分解代谢失衡; 并在体外通过细胞相关实验进行验证, 进一步了解雌激素对 OA 发生发展内在机制: 绝经后的 OA 患者由于雌激素水平下降, 易发生软骨基质合成-分解代谢失衡, 软骨基质分解增加, 关节软骨破坏, 从而导致疾病的发生^[2-4], 也有研究显示去除大鼠卵巢使雌激素分泌减少可引起软骨退化^[5], 说明雌激素是软骨基质合成分解代谢平衡的重要调节因子。雌二醇 (estradiol, E2) 通过靶向基因微小核糖核酸 (*microRNA*, *miRNA*) -140 调节基质金属蛋白酶-13 (matrix metalloproteinase-13, MMP-13), 在调控炎症因子白细胞介素 (interleukin, IL) -1 β 诱导的人软骨细胞中的细胞外基质降解中起重要作用^[6], 但是雌激素如何调节炎症因子的释放, 调控基质的合成分解仍不清楚。因此, 进一步明确雌激素如何促进软骨基质合成、抑制分解代谢, 调控 OA 中发挥积极效应的机制具有重要意义。

本研究以正常软骨细胞作为对照, 体外加入不同浓度的雌激素及雌激素受体拮抗剂和激动剂, 观察雌激素及其受体对软骨细胞炎症调控的影响。选择芯片 GSH-INF-3

数据集进行分析, 同时分析收集的差异表达基因分析 (differential expression gene analysis, DEG) 数据, 进行信号通路富集基因本体 (gene ontology, GO) 和京都基因组与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 分析, 观察雌激素调控软骨细胞炎症相关通路, 旨在探讨雌激素对软骨细胞炎症调控的潜在机制, 从炎症调控的角度, 寻找治疗 OA 的潜在靶点。

1 资料与方法

1.1 一般资料

实验所用标本均术中收集正常软骨, 其中正常软骨来源深圳市第二人民医院骨科股骨颈骨折患者, 行髋关节置换手术中无菌取出的股骨头, 排除关节软骨有关节炎表现, 股骨头立刻送往实验室超净工作台获取软骨; 本研究得到了深圳市第二人民医院伦理委员会的审核批准 (伦理号: 20220621002-FS01), 并且所有样本的获取都得到了每位患者的明确同意并签署了知情同意书, 确保研究过程合规、尊重个体隐私。

1.2 软骨细胞培养

对于送达超净工作台的标本, 使用磷酸盐缓冲盐水 (phosphate-buffered saline, PBS) 反复清洗 3 次, 无菌切取关节软骨, 切碎成体积约 1 mm³ 颗粒, PBS 冲洗 3 次, 离心 3 min, 去除 PBS, 加入 3 倍体积的 0.25% 胰蛋白酶, 在 37 °C 恒温震荡仪持续消化 15 ~ 20 min, 震荡完成后于 4 °C 冰箱静置 5 min, 弃上清, 加入 0.2% II 型胶原酶, 置于 37 °C 的恒温摇床中震荡消化 2 h。震荡后弃上清, 加入软骨细胞生长培养基终止消化, 通过 74 μ m 的滤网反复吹打过滤, 收集滤液以 1200 r \cdot min⁻¹ 离心 8 min,

弃上清，使用软骨细胞生长培养基重悬细胞，记录患者姓名、年龄、性别、日期等信息后，放置在 95 % 空气、5 % CO₂、100 % 湿度的 37 °C 恒温培养箱，上述操作均需无菌操作。培养软骨细胞需 3 ~ 5 d 进行一次软骨细胞培养液更换，软骨细胞汇合度达 70 % ~ 80 % 时可用于实验。软骨细胞在实验前，将经培养的 P1 代关节置换患者的软骨细胞进行甲苯胺蓝染色鉴定。如插图 1 图 1 所示，正常软骨细胞胞浆能够被甲苯胺蓝染成紫红色，结果呈阳性。结果表明，培养的软骨细胞内无其他类型的细胞，细胞生存状态符合实验要求。

1.3 主要方法

将上述收集的软骨细胞分组，空白对照组仅加入软骨细胞培养液，其他观察组除软骨细胞培养液，还分别加入 E2、雌激素受体 α (estrogen receptor alpha, ERα)、雌激素受体 β (estrogen receptor beta, ERβ) 和特异性雌激素受体阻断剂氟维司群 (fulvestrant, Ful)，均培养 48 h。培养后直接收集细胞培养上清，液氮速冻，置于 -80 °C 保存。

随后进行高通量多因子检测 (Cat. QAH-INF-3-2, RayBiotech, USA)。GSH-INF-3 芯片包含 B 淋巴细胞

趋化因子 (B lymphocyte chemoattractant, BLC)、单核细胞集落刺激因子 (macrophage colony-stimulating factor, MCSF)、粒细胞集落刺激因子 (granulocyte colony-stimulating factor, G-CSF)、IL-1ra、IL-2、肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF) -α、TNF-β 等 40 个炎症相关因子。

具体分组如下：

Group 1 (空白对照组)：正常软骨细胞在软骨细胞培养液中培养 48 h；

Group 2：正常软骨细胞在软骨培养液中加入 100 nmol · L⁻¹ E2 受体培养 48 h；

Group 3：正常软骨细胞在软骨培养液中加入 100 nmol · L⁻¹ ERα 受体激动剂培养 48 h；

Group 4：正常软骨细胞在软骨培养液中加入 100 nmol · L⁻¹ ERβ 受体激动剂培养 48 h；

Group 5：正常软骨细胞在软骨培养液中加入雌激素受体阻断剂 Ful 培养 48 h。

1.4 主要仪器和药品

使用的主要仪器设备和软件包括厂家以及型号详见表 1，药物分类见表 2。

表 1 主要仪器设备和软件

名称	厂家	型号
双人单面净化工作台	苏州安泰空气技术有限公司	SW-CJ-2F(D)
冷冻高速离心机	Eppendorf AG	5424r
CO ₂ 恒温培养箱	赛默飞科技 (中国) 有限公司	311
电热恒温震荡水槽	上海一恒科技有限公司	DKZ-2
芯片洗板机	赛默飞科技 (中国) 有限公司	Wellwash Versa 2x12
激光扫描仪	Innopsys	InnoScan 300 Microarray Scanner

表 2 主要药品和试剂

名称	厂家	货号
17β-E2	美国西格玛奥公司	E8875
ERα 受体激动剂	Cayman Chemical 公司	263717-53-9
ERβ 受体激动剂	Cayman Chemical 公司	1428-67-7
特异性雌激素受体阻断剂 (Ful)	美国西格玛奥公司	ICI182780

注：E2 一雌二醇；ERα 一雌激素受体 α；ERβ 一雌激素受体 β；Ful 一氟维司群。

1.5 分析内容

GSH-INF-3 芯片用于细胞培养上清，进行微阵列采集样本，对微阵列扫描得到的原始数据进行处理，消除微阵列背景，对芯片间变化进行归一化，然后对处理后的原始数据进行归一化统计分析，以筛选差异基因表达，并进行 GO/KEGG 通路富集分析，以识别差异蛋白。

1.6 表达差异蛋白筛选

将上一步获得的炎症因子表达原始数据进行

Normalization 归一化处理，作为标准化后差异蛋白，随后利用 limma 包进行 moderated 和 t 检验 R 分析，进行 P 校正和 logFC 分析，调整最小差异阈值为 1.2 倍，选择每个亚组平均 (荧光) 信号值 > 150。

随后使用 R 软件中的 ggfortify 数据包来制作散点图。具体来说，并使用 ggplot2 函数来完成做图任务。在图中每个分组的每个样本数值取对数后的平均值，即平均表达量 AveExp，在图表中用横、纵坐标表示。其中红色表示上调的差异蛋白，蓝色表示下调的差异蛋白，灰色表示差异蛋白不明显。

1.7 差异基因 GO 富集分析

通过 DEG 三个不同功能，代表了生物学的不同方面。首先是分子功能 (molecular function, MF)，涉及到分子层面的功能。其次是生物过程 (biological process, BP)，涉及到生物体内发生的各种生物过程。最后是细胞成分 (cellular component, CC)；涉及到细胞内各

种组成部分，可以通过 GO 富集查找差异基因所对应的相关的功能，Fisher 精确检验的方法来进行校验分析。同时使用来自 R/Bioconductor 生物学统计软件的数据包 clusterProfiler。选择标准为：只有当某个 term/GO 上的蛋白数目差异 ≥ 2 且 P < 0.05，按照 Count 的值从大到小进行排序，然后选择前 10 个结果进行展示。

1.8 差异基因 KEGG 通路分析

KEGG 信号通路富集原理同 GO 分析，利用 DAVID 数据库对候选基因进行 KEGG 通路富集分析。结果表明 KEGG 通路富集分析调整后 P 值前 20 种不同表达通路，并研究通路之间差异。

1.9 原始数据的归一化处理

在 GSH-INF-3 芯片采集数据后，用 R/Bioconductor 生物学统计软件对芯片背景去除，芯片间标准化，对差异蛋白质进行筛查和排序，获得归一化数据表，见表 3。

表 3 各组原始数据标准化情况 (bp)

标准化	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4	Group 5
POS	79346	79238	82946	82453	81864
BLC	256	0	0	15	0
G-CSF	2102	1475	2176	2147	1133
GM-CSF	437	698	344	283	310
ICAM-1	11200	12443	20819	16883	11945
IFN-γ	601	849	486	378	437
IL-1a	0	98	109	0	0
IL-1ra	0	0	0	326	0
IL-2	373	249	355	182	356
IL-4	132	0	0	119	0
IL-5	624	896	789	834	601
IL-6	207203	249852	169828	167105	135808
IL-7	665	569	645	506	373
TNF-RI	538	797	964	690	534
IL-10	607	430	586	518	390
IL-11	859	778	975	858	544
IL-12P70	11	1203	0	0	0
IL-13	747	731	801	608	581
IL-15	345	335	360	213	214
IL-16	94	104	107	93	194
IL-17	206	119	93	162	252
MCP-1	31079	31758	22152	21598	19238
MCSF	322	10	106	208	69
MIP-1α	14964	18750	16590	15883	17723
MIP-1β	1958	2625	2161	2111	2036
RANTES	40538	51609	43531	41027	35579
TIMP-1	78086	93372	80973	84911	65713
TIMP-2	107562	145561	112422	110137	88390
TNF-α	1097	802	1009	802	733
TNF-β	1041	1018	1010	640	833
IL-8	10225	12116	7104	7746	6211

注：IL — 白细胞介素；BLC — B 淋巴细胞趋化因子；G-CSF — 粒细胞集落刺激因子；GM-CSF — 粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子；ICAM-1 — 细胞间黏附分子-1；IFN-γ — 干扰素；TNF — 肿瘤坏死因子；MCP-1 — 单核细胞趋化蛋白-1；MCSF — 单核细胞集落刺激因子；MIP — 巨噬细胞炎性蛋白；TIMP — 组织金属蛋白酶抑制物。

2 结果

2.1 Group 2 与 Group 1 基因对应差异蛋白比较

依据归一化表，对 Group 2 和 Group 1 分析，对差异蛋白质进行筛查和排序，筛选出有显著差异的炎症因子，经过校正后比较，P < 0.05 被认为具有统计学意义。结果如插页 1 图 2 显示，显著上调的炎症因子有 5 个，分别是 IL-1α、IL-5、TNF-RI、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (granulocyte-macrophage colony-stimulating Factor, GM-CSF) 和 IL-12P70，显著下调炎症因子有 10 个，分别是 BLC、IL-2、IL-4、IL-7、IL-10、IL-15、IL-17、MCSF、G-CSF 和 TNF-α。

利用 DAVID 数据库进行 GO 富集分析显示：在 BP 方面，主要富集在细胞因子介导的信号通路、对单核细胞的增殖调节、对白细胞的增殖调节、STAT 蛋白酪氨酸磷酸化的正调控和白细胞趋化性的阳性调节；在 CC 组成方面，没有通路富集；在 MF 方面，主要富集在细胞因子活性、冷冻因子受体结合、受体配体活性、信号受体激活剂活性和生长因子受体结合等。KEGG 通路分析信号途径，发现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、细胞因子受体的相互作用等通路上。

2.2 Group 3 与 Group 1 基因对应差异蛋白比较

同样依据归一化表，对 Group 3 与 Group 1 分析比较，显著上调炎症因子有 5 个，分别是 IL-1α、IL-5、IL-11、细胞间黏附分子-1 (intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1) 和肿瘤坏死因子受体 I (tumor necrosis factor receptor I, TNF-RI)，显著下调炎症因子有 10 个，分别是 IL-12P70、IL-4、IL-6、IL-8、IL-17、BLC、MCSF、单核细胞趋化蛋白-1 (monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1)，GM-CSF、干扰素 (interferon-γ, IFN-γ)。

利用 DAVID 数据库进行 GO 富集分析显示：在 BP 方面，主要富集在细胞因子介导的信号通路、白细胞迁移及调节和白细胞趋化性的调节等；在 CC 方面，主要富集在内质网内腔、膜筏、膜微结构域、质膜外侧和晚期内体管腔等。在 MF 方面，主要富集在受体配体、细胞因子活性、信号受体激活剂活性等。KEGG 分析主要富集在细胞因子-细胞因子受体间的相互作用、类风湿性关节炎、IL-17 信号通路等通路上，见插页 1 图 3。

2.3 Group 4 与 Group 1 基因对应差异蛋白比较

同样依据归一化表，对 Group 4 和与 Group 1 分析，显著上调基因有 5 个，分别是 IL-5、ICAM-1、TNF RI、组织金属蛋白酶抑制物 (tissue inhibitor of metalloproteinases, TIMP) 和巨噬细胞炎性蛋白 (macrophage inflammatory protein, MIP) -1β，显著下调基因有 10 个，分别是 IL-2、IL-5、IL-12P70、BLC、TNF-α、TNF-β、INF-γ、

MCSF、GM-CSF 和 MCP-1。

利用 DAVID 数据库进行 GO 富集分析显示：在 BP 方面，主要富集在细胞因子介导的信号通路、肽基酪氨酸磷酸化的调控、Janus 激酶（Janus kinase, JAK）- 信号转导及转录激活因子（signal transducer and activator of transcription, STAT）的受体信号通路、STAT 的受体信号通路和对外部刺激反应的正向调节等上；在 CC 方面，主要富集在质膜外侧、内质网内腔、膜筏、膜微区和晚期内体管腔等；在 MF 方面，主要富集在细胞因子活性、细胞因子受体结合、受体配体活性、信号受体激活剂活性和生长因子受体结合等。KEGG 主要富集在细胞因子-细胞因子受体间的相互作用、类风湿性关节炎、病毒蛋白与细胞因子和细胞因子受体的相互作用、JAK-STAT 信号通路和炎症性肠病等通路上，见插页 2 图 4。

2.4 Group 5 与 Group 1 基因对应差异蛋白比较

同样依据归一化表，对 Group 5 和 Group 1 分析比较，显著上调基因有 3 个，分别是 IL-16、IL-17、MIP-1 α ；显著下调的炎症因子有 10 个，分别是 BLC、IL-4、IL-7、IL-8、IL-10、IL-11、IL-15、MCSF、G-CSF 和 MCP-1。

利用 DAVID 数据库进行 GO 富集分析显示：在 BP 方面，主要富集在白细胞趋化性的调节、白细胞迁移的调控、白细胞迁移的正调控、趋化性调节和趋化性的正向调节等上。在 CC 方面，没有基因富集。在 MF 方面，主要富集在细胞因子活性、细胞因子受体结合、受体配体活性、信号受体激活剂活性和趋化因子活性等。KEGG 主要富集在细胞因子-细胞因子受体间的相互作用、病毒蛋白与细胞因子和细胞因子受体的相互作用、类风湿性关节炎、疟疾和恰加斯病等通路上。

3 讨论

OA 是一种受年龄增长、软骨退变等多因素影响的退行性疾病，临床上主要表现为与活动相关的疼痛，是人类健康的“三大杀手”之一。由于 OA 发病机制复杂，病因很多，年龄、职业、肥胖、代谢因素、免疫因素等都是其危险因素。而 E2 水平下降在 OA 的发展过程中发挥促进作用，一方面 E2 水平的下降引起软骨下骨的转化率的增高和硬度的增加，导致了软骨的损伤；另一方面 E2 破坏了成骨细胞与破骨细胞之间的平衡，加重关节软骨损伤，涉及先天和后天性免疫通路的激活^[2-4]，直接或间接造成 OA 的发展^[7]。CAPELLINO 等^[6]研究表明 E2 通过抑制滑膜细胞增殖，延缓滑膜病变，从而防止 OA 的发生。周望展等^[8]研究发现 E2 能够影响软骨下的蛋白和 mRNA 的合成，而促进关节内软骨细胞代谢发生改变，抑制 OA 的发展。

而细胞因子作为病情进展关键判断依据，同样和 OA

的发生发展有着密切的关系^[9]。细胞因子的作用，发挥在软骨细胞和免疫细胞引起的炎症发生。OA 患者软骨细胞会分泌促炎因子，包括多种 IL，如 IL-1、IL-6、IL-8、血管内皮生长因子（vascular endothelial growth factor, VEGF）、TNF- α 等^[10]。WOODELL-MAY 等^[11]的体外实验研究结果证明了 IL-1、IL-6 和 TNF- α 在 OA 患者的软骨细胞分泌的细胞因子中强表达，并且与 OA 的炎症严重程度呈正相关。KIU 等^[12]证明了炎症细胞因子参与软骨的生理代谢调节，同时也高表达于 OA 患者的软骨下骨和滑膜。由此可见，OA 患者 E2 水平明显低于正常人群，软骨细胞表达的细胞因子高于正常人群，E2 和细胞因子的水平可作为判断 OA 患者病情进展的相关依据^[13]。

在以往的生物信息学分析研究中，很多仅限于两个队列研究或两个遗传事件^[7]。本研究从基因表达综合数据库（Gene Expression Omnibus, GEO）中使用了芯片 GSH-INF-3 数据集进行分析，通过生物信息学手段获得了正常软骨细胞样本在不同受体激动剂或抑制剂之间的 DEG，通过使用 DAVID 网站对候选基因进行 GO/KEGG 通路富集分析，以识别差异蛋白，筛选出导入目的基因前 40 个差异表达基因，分析出雌激素介导软骨细胞分泌炎症因子，上调的基因蛋白主要包括：IL-1 α 、IL-5、IL-11、ICAM-1、TNF-RI、GM-CSF、IL-12P70、TIMP-1 和 MIP-1 β ；下调的基因蛋白包括 BLC、MCSF、MCP-1、IL-17、IL-2、IL-4、TNF- α 和 IL-8，选择了在 MF、BP 及 CC 排名前 5 位的明显富集基因，并从疾病库中筛选出与 KEGG 信号途径相关的 *Kappa* 指数较高的信号通路，这些通路包括细胞因子活性、细胞因子受体、病毒蛋白与细胞因子和细胞因子受体的相互作用、类风湿性关节炎、细胞因子-细胞因子受体间的相互作用、炎症性肠病和 JAK-STAT 信号通路，其中 BCA-1、CCL2、IL-12A、IFN- γ 、IL-6、IL-1、IL-17A、IL-5 等被认为是两者的共有关键基因蛋白。细胞因子与受体相互作用的调控是细胞信号转导的重要调节机制，它们之间的相互作用的异常调节与多种疾病的发生发展密切相关，对于细胞的正常功能和生理过程起着重要调节作用^[11]。VANGSNESS 等^[13]证明患有晚期关节炎的患者很少或没有关节液中的 IL-5 浓度存在显著差异。ZHAN 等^[14]研究发现 IL-5 是降低膝关节 OA 患者血液白细胞线粒体 DNA 拷贝数的一个可能因素，可能是 OA 的有效生物标志物。周望展等^[8]研究证明 ICAM-1 在 OA 患者中表达明显升高。王志凌等^[15]研究证明 ICAM-1 在 OA 患者中表达明显升高。周东海等^[16]发现 IL-1 促使卵磷脂膜分解，产生花生四烯酸，进而导致前列腺素 E2（prostaglandin E2, PGE2）的生成与释放，而 PGE2 和胶原醇的生成则诱发滑膜炎症和软骨基质的崩溃。另一方面，陈鹏等^[10]

发现 IL-1 在滑膜和软骨中还能诱导大量金属蛋白酶-胶原和基质蛋白的合成, 蛋白激酶直接作用于软骨基质, 引起软骨吸收; IL-1 还可影响变性蛋白酶的合成和分泌, 引起间质降解和骨质破坏。KIU 等^[12]发现 JAK-STAT 信号通路是一种进化上保守的信号通路, 可受到多种细胞因子、干扰素、生长因子、集落刺激因子、激素和其他相关分子的刺激。这种信号通路可以完成从细胞外因子到细胞核的信号转导, 参与许多重要的细胞活动, 如细胞增殖、分化、免疫调节和凋亡^[9]。王志凌等^[15]研究证明 TNF 信号通路在 OA 中的重要作用, 即来自 OA 软骨的人关节软骨细胞表达显著更高数量的 p55 TNF- α 受体, 这可能使 OA 软骨特别容易受到 TNF- α 降解刺激。周海东等研究证明 IL-17 是一种影响各种细胞类型活性的细胞因子, 导致类风湿性关节炎, 引发软骨、骨炎症和骨破坏。研究证明 IL-17 通过与 TNF 的协同作用, 明显提高其代谢速度, 直接抑制软骨细胞合成基质, 产生降解软骨基质的酶, 具有双重分解作用^[9-10]。周海东等^[16]研究证明 IL-17 是一种影响各种细胞类型活性的细胞因子, 导致类风湿性关节炎, 引发软骨、骨炎症和骨破坏。研究证明 IL-17 通过与 TNF 的协同作用, 明显提高其代谢速度, 直接抑制软骨细胞合成基质, 产生降解软骨基质的酶, 具有双重分解作用^[17]。

综上所述, 本研究通过生物信息学手段发现, 雌激素在骨关节软骨中的作用是通过调整细胞因子来影响, 其可以调节多种细胞因子的表达, 从而影响软骨的稳态和炎症过程, 而 GO 分析和 KEGG 通路富集分析则更好的解释了雌激素调节软骨细胞的相关机制, 为科学研究提供了方向, 有利于后期临床试验的展开。

[参考文献]

- [1] DALMAO-FERNÁNDEZ A, LUND J, HERMIDA-GÓMEZ T, et al. Impaired Metabolic Flexibility in the Osteoarthritis Process: A Study on Transmitochondrial Cybrids [J]. *Cells*, 2020, 9 (4): 809.
- [2] GRIFFIN T M, SCANZELLO C R. Innate inflammation and synovial macrophages in osteoarthritis pathophysiology [J]. *Clin Exp Rheumatol*, 2019, 37 (Suppl 120): 57-63.
- [3] JIANG Y. Osteoarthritis year in review 2021: biology [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2022, 30 (2): 207-215.
- [4] MILLER R J, MALFAIT A M, MILLER R E. The innate immune response as a mediator of osteoarthritis pain [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2020, 28 (5): 562-571.
- [5] 马小梅, 符培亮, 朱维健. 膝关节液中白细胞介素 1 β 、白细胞介素 6、白细胞介素 8 及肿瘤坏死因子 α 表达与组织病理学的相关性研究 [J]. *第二军医大学学报*, 2020, 41 (9): 1046-1051.
- [6] CAPELLINO S, STRAUB R H, CUTOLO M. Aromatase and regulation of the estrogen-to-androgen ratio in synovial tissue inflammation: common pathway in both sexes [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2014, 1317: 24-31.
- [7] 付宇捷, 吴斗, 赵恩哲, 等. 骨质疏松性骨折后全身骨量丢失的循证学依据及可能机制 [J]. *中国骨质疏松杂志*, 2024, 30 (5): 749-754, 774.
- [8] 周望展, 何卫, 赵峰. 6 项骨代谢标志物与老年骨质疏松性骨折的相关性研究 [J]. *中国卫生检验杂志*, 2023, 33 (16): 2012-2014, 2030.
- [9] 王涛, 王永胜, 刘志斌. 白细胞介素、转化生长因子在骨质疏松性股骨骨折患者中的诊断意义 [J]. *中国实验诊断学*, 2014, 18 (8): 1328-1330.
- [10] 陈鹏, 赵超, 胡珍, 等. 基于生物信息学鉴定膝关节骨性关节炎滑膜炎性反应的关键基因和通路 [J]. *吉林医学*, 2022, 43 (8): 2024-2031.
- [11] WOODSELL-MAY J E, SOMMERFELD S D. Role of Inflammation and the Immune System in the Progression of Osteoarthritis [J]. *J Orthop Res*, 2020, 38 (2): 253-257.
- [12] KIU H, NICHOLSON S E. Biology and significance of the JAK/STAT signalling pathways [J]. *Growth Factors*, 2012, 30 (2): 88-106.
- [13] VANGSNES C T, BURKE W S, NARVY S J, et al. Human knee synovial fluid cytokines correlated with grade of knee osteoarthritis—a pilot study [J]. *Bull NYU Hosp Jt Dis*, 2011, 69 (2): 122-127.
- [14] ZHAN D, TANAVALLEE A, TANTAVISUT S, et al. Relationships between blood leukocyte mitochondrial DNA copy number and inflammatory cytokines in knee osteoarthritis [J]. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2020, 21 (1): 42-52.
- [15] 王志凌, 郭源源, 张浩, 等. 骨免疫微环境中炎症因子诱导骨丢失的机制及免疫治疗研究进展 [J]. *中国骨与关节杂志*, 2023, 12 (12): 943-948.
- [16] 周海东, 周俊秀, 罗昌泰, 等. 晚期骨关节炎软骨退行性变的生物信息学分析 [J]. *右江医学*, 2023, 51 (11): 999-1005.
- [17] 曾锦威, 黄浩, 何元平. 降钙素诱导 CD36、IL-17 的表达对创伤性骨关节炎的影响 [J]. *中国卫生标准管理*, 2024, 15 (4): 144-149.