

基于生物信息学筛选骨关节炎免疫浸润相关基因

陈文杰¹, 肖 钧², 熊鑫海¹, 王朝俊³, 吴 琪², 何超鹏⁴, 陈 铖^{2*}

(1. 湖南师范大学附属第二医院 解放军联勤保障部队第九二一医院, 中国湖南 长沙 410003; 2. 解放军联勤保障部队第九二一医院, 中国湖南 长沙 410003; 3. 山西省汾阳医院, 中国山西 汾阳 032200; 4. 中南大学湘雅二医院, 中国湖南 长沙 410011)

摘要: 为筛选骨关节炎(osteoarthritis, OA)免疫浸润相关基因, 从基因表达数据库(Gene Expression Omnibus, GEO)中获取多个芯片数据, 分为训练集以及验证集, 筛选出差异表达基因(differentially expressed gene, DEG); 采用基因集富集分析(Gene Set Enrichment Analysis, GSEA)软件对训练集所有基因进行基因本体论(Gene Ontology, GO)与京都基因和基因组数据库(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)分析, 同时对 DEG 进行 GO 及 KEGG 分析, 并构建 DEG 蛋白质相互作用网络, 筛选关键基因; 利用验证集对关键基因进行差异验证, 并判断关键基因的诊断价值; 通过单样本基因集富集分析(single sample gene set enrichment analysis, ss-GSEA)算法获得 28 种免疫细胞在 OA 的含量及比例; 利用 Spearman 相关性分析计算关键基因表达与免疫细胞浸润的相关性。结果显示, OA 与正常软骨组织之间有 27 个 DEG; OA 样本的基因表达改变主要涉及体液免疫反应与组氨酸代谢信号通路等过程; DEG 与金黄色葡萄球菌感染相关信号通路和 NOD 样受体信号通路相关; 从 DEG 中筛选得到 4 个关键基因, 即 *CAMP*、*S100A8*、*DEFA3* 和 *COL5A2*, 它们在 OA 组织中异常表达并具有较高的诊断价值。进一步的免疫细胞浸润分析结果显示, 在 OA 软骨组织中活化 B 细胞等免疫细胞变化显著, 且 4 个关键基因与免疫浸润有显著的相关性。研究结果表明, 活化 B 细胞等免疫相关细胞在 OA 的发生发展中有着重要的作用; *CAMP*、*S100A8*、*DEFA3* 和 *COL5A2* 是免疫浸润相关的关键基因, 与 OA 发生发展密切相关。

关键词: 生物信息学; 骨关节炎(OA); 基因集富集分析(GSEA); 免疫浸润; 关键基因

中图分类号: Q81, R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1007-7847(2023)05-0435-12

Screening of Genes Related to Immune Infiltration in Osteoarthritis Based on Bioinformatics

CHEN Wenjie¹, XIAO Jun², XIONG Xinhai¹, WANG Zhaojun³, WU Qi²,
HE Chaopeng⁴, CHEN Cheng^{2*}

(1. The Second Affiliated Hospital of Hunan Normal University/the 921 Hospital of the People's Liberation Army (PLA) Joint Logistics Support Force, Changsha 410003, Hunan, China; 2. The 921 Hospital of the PLA Joint Logistics Support Force, Changsha 410003, Hunan, China; 3. Fenyang Hospital, Fenyang 032200, Shanxi, China; 4. The Second Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410011, Hunan, China)

Abstract: To screen immune infiltration related genes in osteoarthritis (OA), multiple microarray data were obtained from Gene Expression Omnibus (GEO) database, and divided into a training set and a validation set to screen out the differentially expressed genes (DEGs). Then all genes in the training set were analyzed using Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) software for Gene Ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) analyses. Subsequently, GO and KEGG analyses of DEGs were performed, and a protein-protein interaction (PPI) network of the DEGs was constructed to screen hub genes. The validation set

收稿日期: 2023-01-12; 修回日期: 2023-03-22; 网络首发日期: 2023-10-19

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(82260444); 湖南省研究生科研创新项目(CX20220527); 吕梁市科技局重点研发社会发展项目(2020SHFZ39); 2020年度军事训练伤防治专项(20XLS23)

作者简介: 陈文杰(1997—), 男, 广东茂名人, 硕士研究生; * 通信作者: 陈铖(1977—), 男, 湖南邵阳人, 博士, 主任医师, 主要从事骨与关节疾病相关研究, E-mail: jc163yy@163.com。

was used for differential validation of hub genes and determination of their diagnostic value. The content and proportion of 28 immune cells in the OA samples were obtained using the single sample gene set enrichment analysis (ssGSEA) algorithm, and the correlation between key gene expression and immune cell infiltration was calculated by Spearman's correlation analysis. There were 27 DEGs found between the OA and normal cartilage tissues. The GSEA results showed that gene expression changes in the OA samples were mainly involved in the processes such as humoral immune responses and histidine metabolic signaling pathways. GO and KEGG analyses of DEGs showed that the DEGs were associated with signaling pathways related to *Staphylococcus aureus* infection and NOD-like receptor signaling pathways. Four hub genes *CAMP*, *S100A8*, *DEFA3*, and *COL5A2* were screened out from the DEGs, and their abnormal expressions in the OA tissues and high diagnostic value were confirmed. Further analysis of immune cell infiltration showed that obvious changes occurred in activated B cells and other immune cells in the OA cartilage tissues, and the four hub genes were significantly correlated with immune infiltration. The results indicated that activated B cells and other immune cells play an important role in the occurrence and development of OA, and *CAMP*, *S100A8*, *DEFA3*, and *COL5A2* are hub genes associated with immune infiltration, which are closely related to the occurrence and development of OA.

Key words: bioinformatics; osteoarthritis (OA); Gene Set Enrichment Analysis (GSEA); immune infiltration; hub gene

(*Life Science Research*, 2023, 27(5): 435–446)

骨关节炎(osteoarthritis, OA)是最常见的运动系统疾患之一,主要表现为进行性关节破坏,可导致关节疼痛、畸形和功能障碍,严重者造成残疾,并增加心血管事件的发生率及全因死亡率^[1]。欧洲骨质疏松和骨关节炎临床与经济学会(European Society for Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis and Osteoarthritis, ESCEO)指出,由OA造成的劳动力丧失及社会经济负担占国家GDP的比例高达1.0%到2.5%^[2]。随着全球人口寿命的增加以及老龄化社会的到来,OA的发病率与患病率呈逐年上升趋势,由其带来的社会经济负担也逐年加重^[3]。目前,OA的治疗主要为物理治疗、药物治疗和手术治疗。除人工关节置换手术外,其他非手术治疗手段仅能减缓OA的发展,并不能彻底治愈OA,其治疗效果不尽人意。因此,阐明OA的发病及进展机制,寻找关键靶点进行干预,实现OA的有效安全防治,仍然是迫切的现实需要,具有重大的社会意义。

OA的发病及进展机制十分复杂,涉及炎症、凋亡、自噬等众多方面^[4]。现有研究发现,机体免疫细胞在OA的发生发展过程中有着重要的作用^[5]。巨噬细胞、肥大细胞以及T淋巴细胞等都不同程度地影响着OA的炎症反应^[6]。肥胖以及衰老等因素能使关节内巨噬细胞活化,继而增加促进炎症反应的M1巨噬细胞,是驱动炎症反应的主要原

因^[7]。因此,从免疫的角度研究OA的发生发展已经成为学者研究的热点。

本文首先对OA软骨组织的芯片数据进行基因集富集分析(Gene Set Enrichment Analysis, GSEA),通过R软件包筛选OA软骨组织与正常软骨组织之间的差异表达基因(differentially expressed gene, DEG);然后,对DEG进行富集分析并寻找影响OA发病的关键基因,通过关键基因的特异度绘制受试者操作特征(receiver operating characteristic, ROC)曲线,分析评价关键基因的诊断效能;最后,通过单样本基因集富集分析(single sample gene set enrichment analysis, ssGSEA)算法评估28种免疫细胞在OA软骨的相对含量,分析关键基因与免疫浸润的相关性,筛选免疫相关的关键基因。本研究旨在为OA发生发展的分子机制研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 芯片数据来源

以“osteoarthritis”为关键词,基于GEO数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>, 2022-10-11)检索基因表达谱,选择“*Homo sapiens*”人类样本,获得编号为GSE57218、GSE98918与GSE117999的数据集。选取GSE57218数据集作为验证集,将GSE98918数据集与GSE117999数据集合并为训

练集。验证集数据集共包含 40 个软骨组织样本,其中,健康对照组 7 个,OA 组 33 个,平台为 GPL6947, Illumina HumanHT-12 V3.0 expression beadchip。训练集数据集共包含 48 个软骨组织样本,即 24 个健康对照组以及 24 个 OA 组,平台为 GPL20844, Agilent-072363 SurePrint G3 Human GE v3 8x60K Microarray 039494 [Feature Number Version]。

1.2 芯片数据预处理和 DEG 的筛选

对训练集芯片数据进行合并处理后,通过 ggplot2 软件包对质量控制后的芯片数据进行可视化分析。采用 R 语言 limma conductor 软件包对芯片数据进行差异表达分析,以 $|\log_2(FC)| > 1$ (FC: fold change)、 $P < 0.05$ 作为筛选标准^[8]。基于 ggplot2 软件包绘制差异表达数据火山图,同时使用 ComplexHeatmap 软件包绘制基因矩阵热图。

1.3 GSEA 分析

GSEA 分析是对数据集所有基因进行分析,可以敏感地找到显著富集的基因集及其变化趋势。本文采用 GSEA 软件对训练集数据集进行基因本体论(Gene Ontology, GO)与京都基因和基因组数据库(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)分析^[9],分别列出显著富集前 5 的结果,并对富集最显著的结果进行可视化,以错误发现率(false discovery rate, FDR) < 0.25 且 $P < 0.05$ 为筛选标准。

1.4 DEG 的功能富集分析及关键基因的筛选

运用 R 语言 GOpilot 软件包对训练集 DEG 进行结合 log 值的 GO 与 KEGG 分析。将 DEG 输入 STRING 数据库(<https://string-db.org/>, 2022-11-13)进行蛋白质-蛋白质相互作用(protein-protein interaction, PPI)分析,选取得分大于 0.4 的基因通过 Cytoscape 软件进行可视化分析^[10]。应用 Cytoscape 中的 CytoHubba 插件的最大集团中心度(maximal clique centrality, MCC)算法找出排名前 5 的基因。

运用 R 语言 glmnet 软件包和 LASSO 回归模型从训练集 MCC 算法得出的基因中进一步筛选出关键基因。

1.5 关键基因的差异表达分析

通过训练集和验证集数据对关键基因进行差异表达分析,其中 R 语言的 limma 软件包用于数据分析,ggpubr 软件包用于可视化分析。

1.6 关键基因的 ROC 分析

通过训练集和验证集数据对关键基因进行 ROC 分析,其中 R 语言的 pROC 软件包用于数据

分析,ggplot2 软件包用于可视化分析,相关基因的治疗与诊断作用根据血药浓度-时间曲线下面积(area under concentration-time curve, AUC)进行评价^[11]。

1.7 免疫浸润分析

基于单样本基因集富集分析(single sample gene set enrichment analysis, ssGSEA)算法计算 28 种免疫细胞的丰度。通过 TISIDB 网站(<http://cis.hku.hk/TISIDB/download.php>, 2022-11-08)获得 28 种免疫相关基因集,使用 ggplot2 软件包创建包含 28 种免疫细胞类型的热图^[12]。两组之间免疫细胞的丰度差异通过 Wilcoxon 秩和检验进行分析,以 $P < 0.05$ 为筛选标准,使用 ggplot2 软件包进行可视化分析。

1.8 关键基因与免疫浸润的相关性分析

通过 Spearman 相关性分析计算关键基因与 28 种免疫细胞丰度之间的相关性,并通过 ggplot2 软件包进行可视化分析^[13]。

2 结果

2.1 DEG 的筛选

将训练集的 48 个软骨组织样本分为对照组和 OA 组进行差异基因的筛选,共获得 27 个 DEG,其中上调基因 12 个,下调基因 15 个,火山图(图 1A)与热图(图 1B)如图 1 所示。

2.2 基因富集分析

对训练集基因进行 GSEA 分析,GSEA-KEGG 结果显示,OA 组基因主要富集在组氨酸代谢信号通路(histidine metabolism signaling pathway)、细胞色素 P450 相关的药物代谢信号通路(drug metabolism-cytochrome P450 signaling pathway)、由细胞色素 P450 介导的外源性物质代谢信号通路(metabolism of xenobiotics by cytochrome P450 signaling pathway)、嗅觉转导信号通路(olfactory transduction signaling pathway)、味觉转导信号通路(taste transduction signaling pathway)(表 1)。其中,组氨酸代谢信号通路富集最显著,其标准化富集得分(normalized enrichment score, NES)为 -1.75 ($P < 0.005$) (图 2A)。GSEA-GO 分析显示,OA 组基因显著富集在体液介导的免疫反应(humoral immune response)、细胞对促性腺激素刺激的反应(cellular response to gonadotropin stimulus)、抗菌肽介导的免疫应答(antimicrobial humoral immune response mediated by antimicrobial peptide)、抑制性突触(inhibitory synap-

se)以及抗菌相关的体液免疫反应(antimicrobial humoral immune response) (表 2), 其中, 体液介导的

免疫反应富集最显著, 其 NES 为-1.93 ($P<0.001$) (图 2B)。

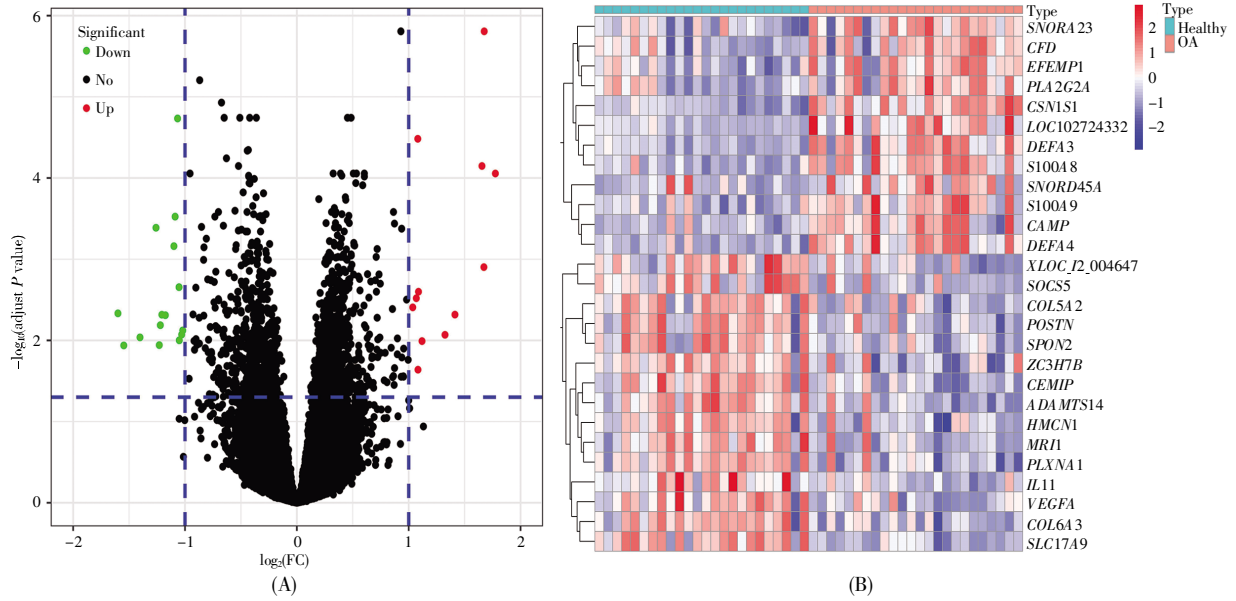


图 1 训练集差异基因的火山图(A)与热图(B)

Fig.1 Volcano map (A) and heat map (B) of DEGs in the training dataset

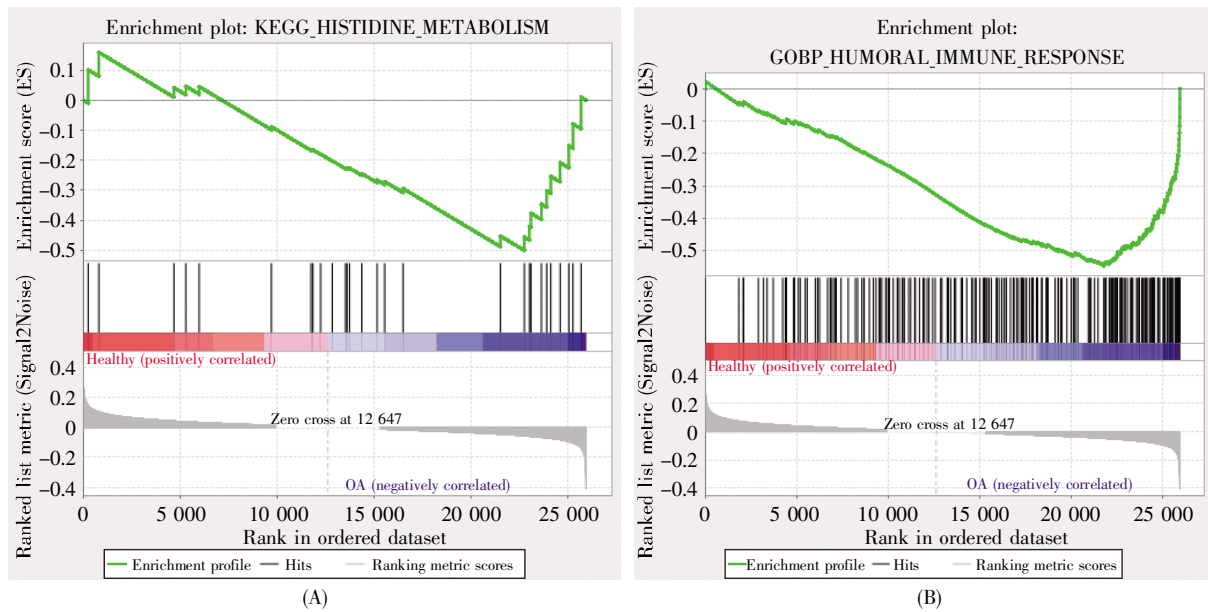


图 2 GSEA-KEGG (A)与 GSEA-GO (B)分析中的最显著富集条目

Fig.2 The most significantly enriched items in GSEA-KEGG (A) and GSEA-GO (B) analyses

表 1 GSEA-KEGG 分析排名前 5 的结果
Table 1 The top 5 signaling pathways in GSEA-KEGG analysis

Name	NES	P-value	FDR q-value
Histidine metabolism	-1.75	0.004	0.177
Drug metabolism-cytochrome P450	-1.67	0.006	0.224
Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450	-1.66	0.010	0.160
Olfactory transduction	-1.61	0.028	0.196
Taste transduction	-1.61	0.022	0.159

表 2 GSEA-*GO* 分析排名前 5 的结果
Table 2 The top 5 terms in GSEA-*GO* analysis

Name	NES	<i>P</i> -value	FDR <i>q</i> -value
Humoral immune response	-1.93	<0.001	0.227
Cellular response to gonadotropin stimulus	-1.92	0.002	0.117
Antimicrobial humoral immune response mediated by antimicrobial peptide	-1.90	<0.001	0.118
Inhibitory synapse	-1.89	0.004	0.102
Antimicrobial humoral immune response	-1.85	<0.001	0.151

2.3 DEG 的功能富集分析及关键基因的筛选

对 DEG 进行 *GO* 功能分析和 KEGG 通路分析。*GO* 分析结果显示:生物过程(biological process, BP)主要集中在细菌免疫反应、真菌免疫反应以及体液免疫反应等方面;细胞组分(cellular component, CC)主要集中在分泌颗粒囊泡以及细胞

质囊泡等部位;分子功能(molecular function, MF)主要集中在胞外基质结构成分、生长因子受体结合、RAGE 受体结合以及生长因子活性等(图 3)。KEGG 信号通路富集分析显示,金黄色葡萄球菌感染信号通路和 NOD 样受体信号通路等显著富集(图 4)。

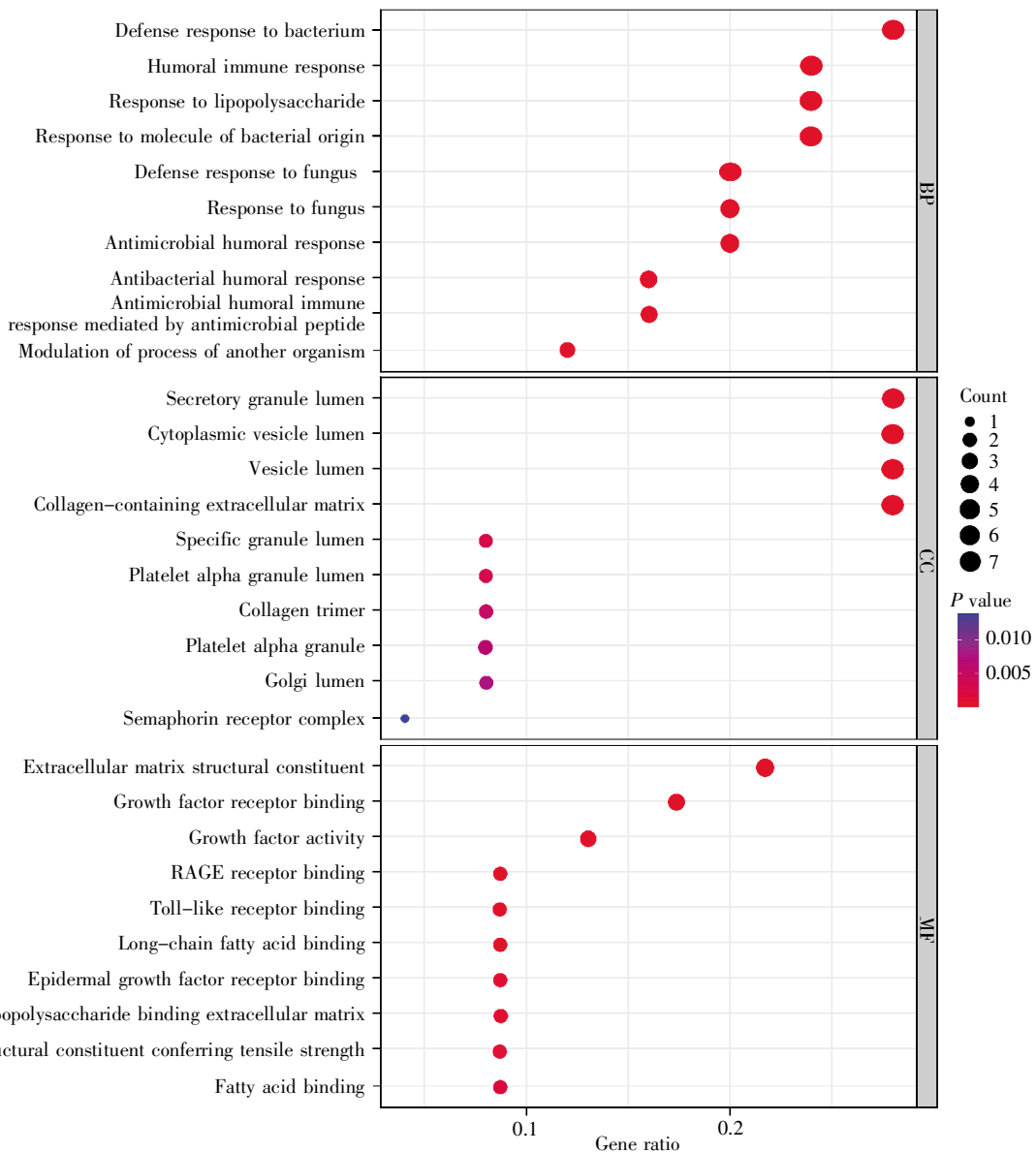


图 3 *GO* 分析排名前 10 结果的气泡图

Fig.3 The bubble plots of the top 10 terms of *GO* analysis

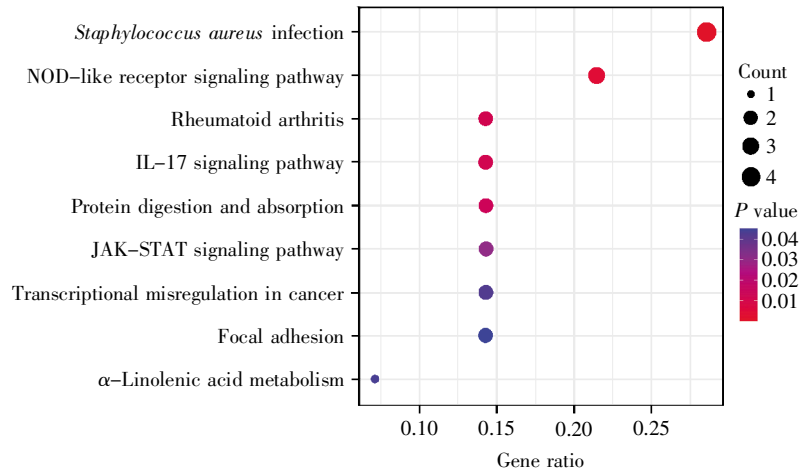


图 4 KEGG 分析气泡图

Fig.4 The bubble plots of KEGG analysis

DEG 的 PPI 分析结果如图 5A 所示, 通过 CytoHubba 的 MCC 算法从中筛选出排名前 5 的基因, 即 *CAMP*、*POSTN*、*S100A8*、*DEFA3* 以及 *COL5A2* (图 5B)。

进一步运用 LASSO 回归模型从上述所得的基因中筛选得出 4 个关键基因: *CAMP*、*S100A8*、*DEFA3* 以及 *COL5A2*。

2.4 关键基因的差异表达分析

在训练集和验证集中分别对 4 个关键基因进行差异表达分析, 结果显示, 正常软骨与 OA 软骨

中 *CAMP*、*S100A8*、*DEFA3* 以及 *COL5A2* 基因的表达均具有显著差异($P < 0.05$) (图 6)。

2.5 关键基因的 ROC 分析

在训练集和验证集中分别对 4 个关键基因进行 ROC 分析, 结果显示, *CAMP*、*S100A8*、*DEFA3* 以及 *COL5A2* 的 AUC 值均大于 0.7, 提示 4 个关键基因的诊断价值良好(图 7)。

2.6 免疫浸润分析

基于 28 种免疫相关基因集进行免疫浸润分析。热图显示了每个样本中 28 种免疫细胞的类型

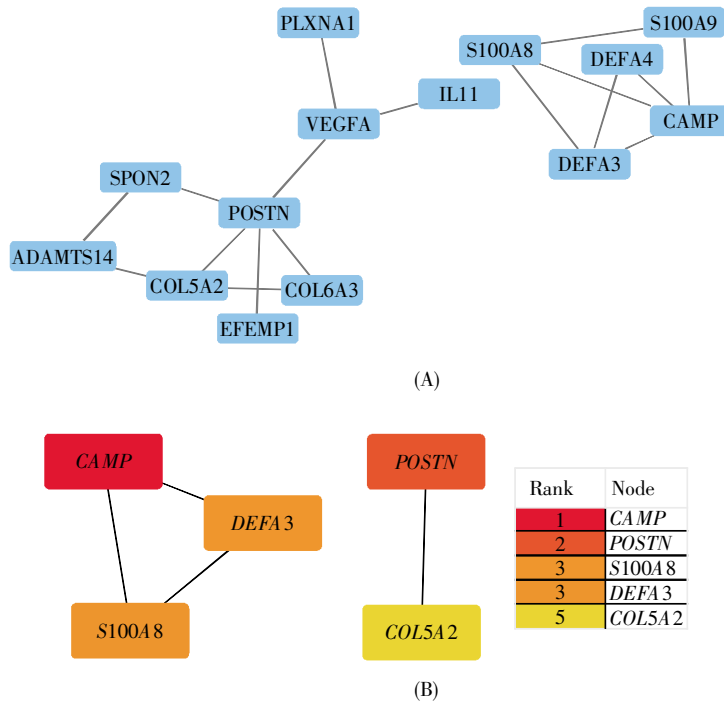


图 5 DEG 的 PPI 图(A)与得分前五的基因(B)

Fig.5 PPI network of DEGs (A) and the top five ranked genes (B)

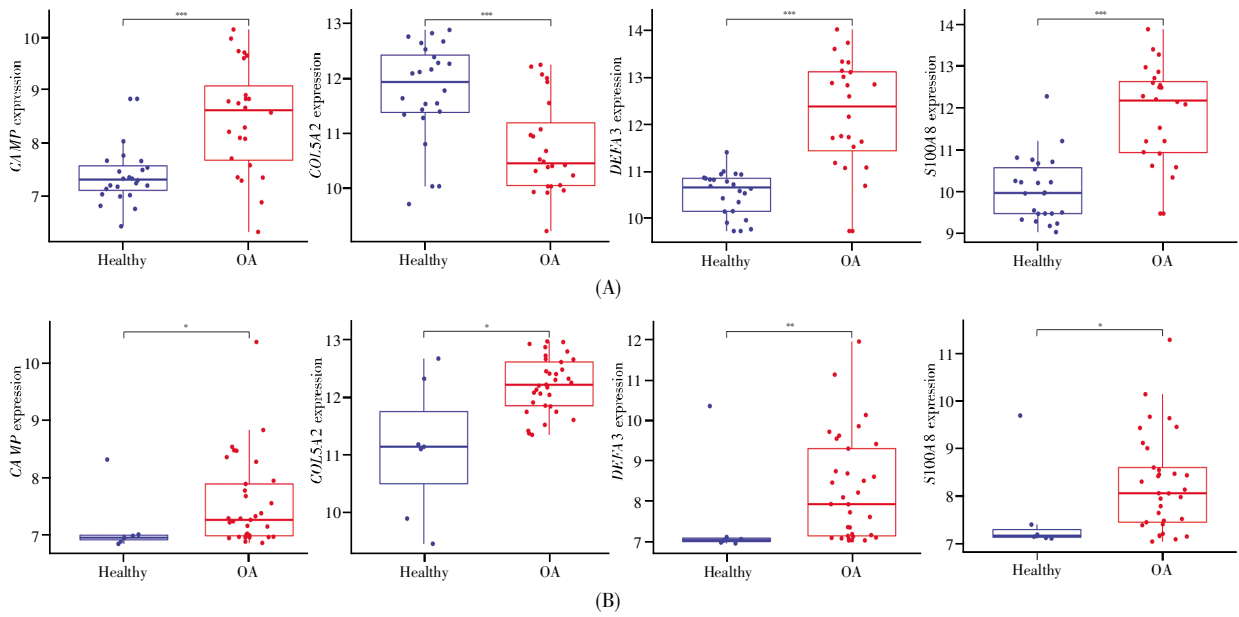


图 6 4 个关键基因在训练集(A)和验证集(B)的差异表达分析

Fig.6 Differential expression analysis of four hub genes in the training dataset (A) and validation dataset (B)

*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

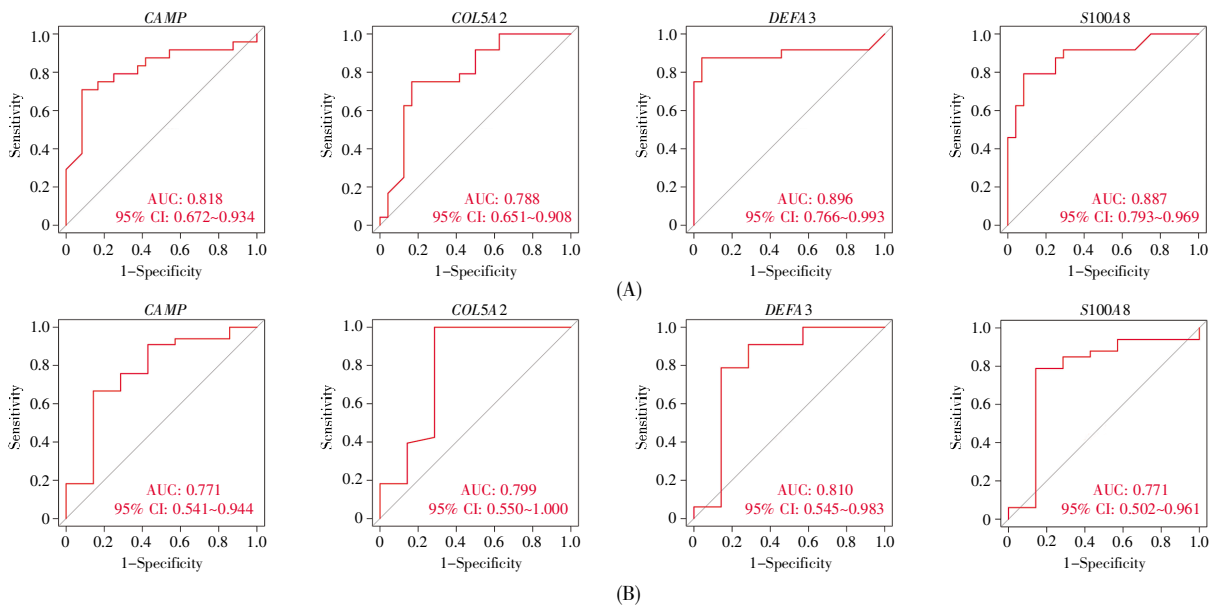


图 7 4 个关键基因在训练集(A)和验证集(B)的 ROC 分析

Fig.7 ROC analysis of four hub genes in the training dataset (A) and validation dataset (B)

及其对应丰度(图 8)。豆荚图显示了 OA 组与对照组软骨组织样本中各种免疫细胞的比例差异(图 9)。从图中可知,在 OA 软骨组织中,活化 B 细胞(activated B cell, $P < 0.01$)、活化 CD8 阳性 T 细胞(activated CD8⁺ T cell, $P < 0.05$)、 $\gamma\delta$ T 细胞(gamma delta T cell, $P < 0.05$)、未成熟 B 细胞(immature B cell, $P < 0.01$)、髓源抑制性细胞(myeloid-derived suppressor cell, MDSC, $P < 0.001$)、巨噬细胞(macrophage, $P < 0.05$)、效应记忆性 CD4 阳性 T 细胞(effector me-

mory CD4⁺ T cell, $P < 0.05$)、中央记忆性 CD4 阳性 T 细胞(central memory CD4⁺ T cell, $P < 0.05$)的比例显著增加,单核细胞(monocyte, $P < 0.05$)的比例显著减少(图 9)。

2.7 关键基因与免疫细胞浸润的相关性分析

为了进一步确认 4 个关键基因分别与各种免疫细胞之间的联系,对各个关键基因与 28 种免疫细胞进行了 Spearman 相关性分析。相关性热图提示,关键基因 *CAMP*、*S100A8*、*DEFA3* 以及 *CO-*

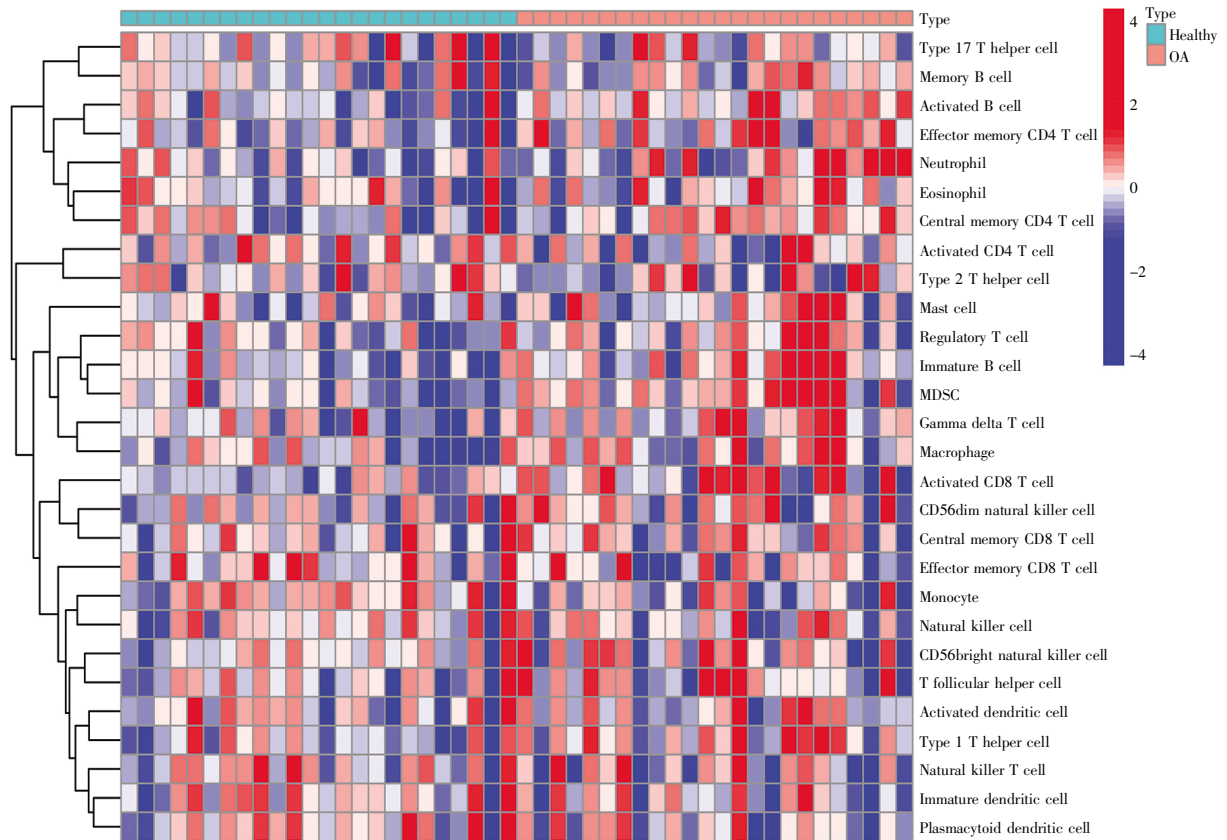


图8 免疫浸润热图
Fig.8 Heat map of immune infiltration

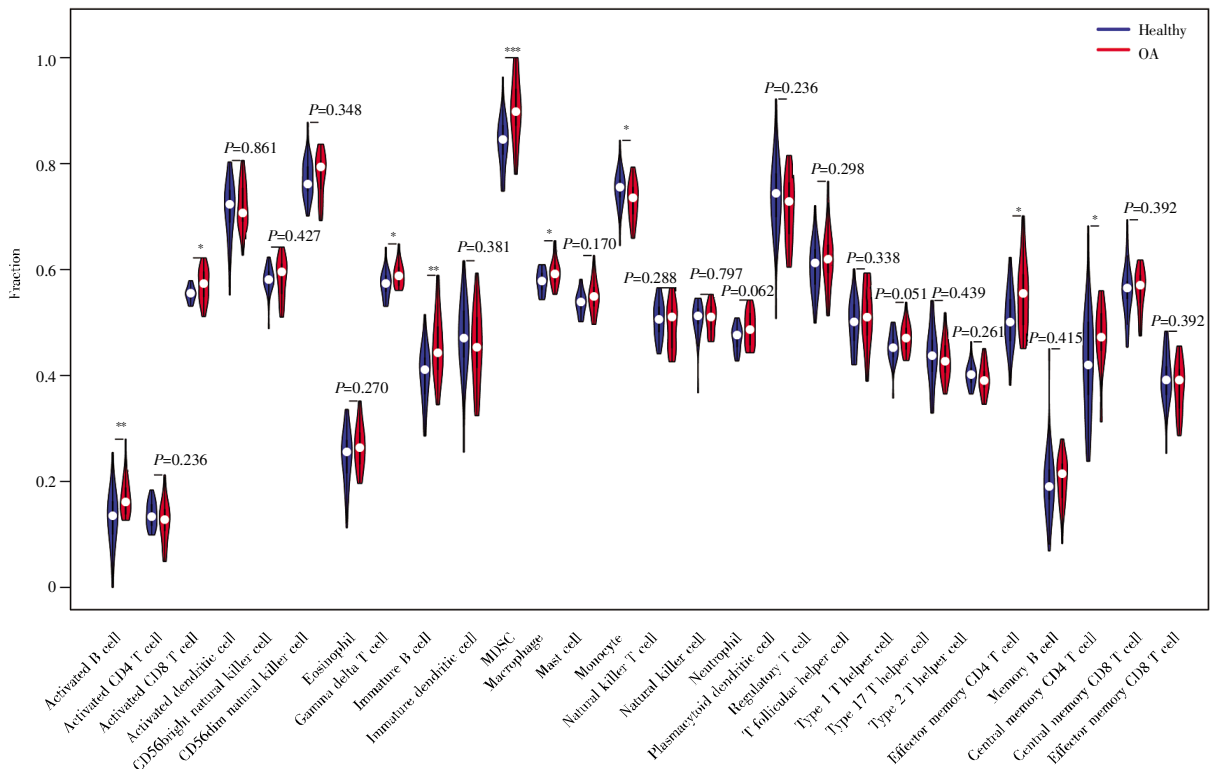


图9 OA组与对照组软骨的免疫浸润差异分析
Fig.9 Analysis of the difference of immune infiltration in cartilage between the OA and control (normal) groups
*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

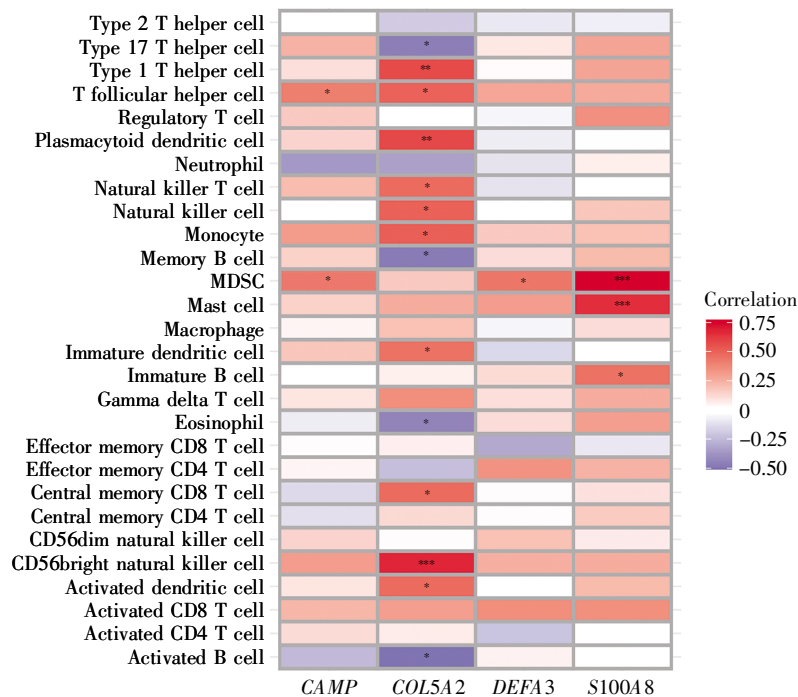


图 10 关键基因与免疫浸润相关性热图

Fig.10 Heat map of correlation between hub genes and immune infiltration

*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

COL5A2 分别与多种免疫细胞的浸润有较高的相关性(图 10)。

3 讨论

OA 的发病与机体免疫系统环境的异常密切相关。寻找影响 OA 患者免疫系统的关键基因并探讨其功能, 不仅对在分子水平上揭示 OA 的发病机制具有重要的意义, 也可为 OA 的早期诊断和新治疗策略的制定提供依据。

本研究利用正常和 OA 的软骨组织进行 DEG 分析, 筛选出 27 个 DEG, 包括上调基因 12 个和下调基因 15 个(图 1A)。全基因组的 GSEA 的 GO 分析结果显示, OA 软骨组织基因主要富集在体液介导的免疫反应(表 2)。体液免疫作为免疫反应中的一种类型, 在维持机体稳态、调控细胞及器官的发育以及炎症反应等方面都有着重要的作用。当关节因衰老或者创伤等原因暴露出以 II 型胶原为主的成分后, B 淋巴细胞被激发并产生自身抗体, 启动 OA 的体液免疫^[14]。自身抗体形成的免疫复合物可以在关节软骨内扩散沉积, 使软骨易于被降解和破坏, 继而进一步刺激补体系统清除复合物^[15]。这或许是引起组织损伤复杂致病回路的一部分。GSEA-KEGG 富集结果显示, OA 软骨组织基因主要富集在组氨酸代谢信号通路(表 1)。组

胺是组氨酸在组氨酸脱羧酶催化下脱羧生成的产物。合成和释放组胺的主要细胞是免疫系统的肥大细胞与嗜碱性粒细胞^[16]。研究表明, 组胺可以刺激人关节软骨细胞增加基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)-13、MMP-3 和前列腺素 E2 (prostaglandin E2, PGE2) 的产生^[17-18], 加剧 OA 的进程。DEG 的 KEGG 分析显示, DEG 主要富集在金黄色葡萄球菌感染相关信号通路和 NOD 样受体信号通路(图 4)。DEG 的 GO 分析显示, 其生物过程主要集中在细菌免疫反应、真菌免疫反应以及体液免疫反应等方面(图 3)。这些结果进一步证明, 免疫功能异常与 OA 的发病密切相关。

本文联合 CytoHubba 软件的 MCC 算法和 LASSO 回归模型, 预测了与 OA 发生发展具有紧密关联的 4 个关键基因: CAMP、S100A8、DEFA3 以及 COL5A2, 并通过验证集对其进行了差异表达验证(图 6)。紧接着, 我们对训练集和验证集中的 4 个关键基因进行了 ROC 分析, 结果表明这 4 个关键基因均有良好的诊断效果(图 7), 进一步验证了关键基因的准确性。人抗菌肽(cathelicidin antimicrobial peptide, CAMP)可以在各种上皮细胞及免疫细胞(如树突状细胞、单核细胞、巨噬细胞、中性粒细胞、NK 细胞、 $\gamma\delta$ T 细胞、B 细胞等)中表达, 并参与机体免疫反应^[19-20]。已有研究表明, CAMP

在 OA 软骨细胞中高表达, 且 *CAMP* 基因启动子甲基化可以诱导软骨细胞凋亡, 进而影响 OA 的发生发展^[21]。另一项研究表明, 在金黄色葡萄球菌的刺激下, 软骨细胞中 *CAMP* 的表达显著提高^[22]。这也进一步提示, 金黄色葡萄球菌感染相关信号通路或许与 OA 的发生发展有较高的相关性。此外, *CAMP* 能通过调控 *PI3K/Akt1* 等信号通路参与调控细胞的生理病理过程^[23]。其中, *PI3K/Akt1* 又可以调控软骨细胞的自噬水平^[24], 干预 OA 的发展。虽然已明确 *CAMP* 不仅可以通过调控免疫细胞参与免疫反应, 还可以调控 OA 发生发展, 但是关于 *CAMP* 在 OA 病变组织与免疫细胞之间的调控作用仍缺乏足够的研究。*S100A8* 基因转录表达的 *S100A8* 蛋白是 *S100* 蛋白家族的重要成员, 又被称作迁移抑制因子相关蛋白 8 (migration inhibitory factor-related protein 8)。巨噬细胞、内皮细胞在受到促炎物质或者促炎因子的刺激后, 可以调控 *S100A8* 的表达, 从而参与免疫反应过程^[25]。*S100A8* 还可以通过调节巨噬细胞极化参与疾病的发生发展^[26]。研究证明, *S100A8* 不仅能够上调和激活软骨细胞中的 *MMP*, 降解软骨细胞周围基质, 还可以活化 OA 病变关节中的巨噬细胞, 使软骨基质重塑和骨赘增大^[25]。此外, *S100A8* 还可以通过激活丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, *MAPK*) 以及 *PI3K/Akt* 信号通路, 调控细胞的自噬^[27]。而 *MAPK* 信号通路是调控 OA 软骨细胞的炎症反应以及细胞外基质降解的重要通路^[28]。更有研究指出, *S100A8* 可以刺激巨噬细胞激活 *Wnt* 信号通路, 从而参与调控 OA 的发生发展^[29]。因此, *S100A8* 也是调控 OA 发生发展的一个重要靶点。针对 *S100A8* 在 OA 病变组织与免疫细胞之间的作用展开研究, 能促进人们对 OA 发生发展机制的了解, 为干预 OA 发展提供更多策略。防御素 $\alpha 3$ (defensin alpha 3, *DEFA3*) 也被称作人中性粒细胞肽 3 (human neutrophil peptide 3, *HNP3*), 属于防御素的一类。*HNP3* 表达可以增加肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor alpha, *TNF- α*) 和白细胞介素 (interleukin, *IL*)-1 的产生, 同时减少单核细胞抗炎因子 *IL*-10 的产生, 继而参与调控免疫反应^[30]。另有研究指出, *HNP3* 还可以刺激巨噬细胞释放 *TNF- α* 和 γ 干扰素 (interferon- γ , *IFN- γ*), 增强巨噬细胞的吞噬作用^[31]。在 OA 中, 去甲肾上腺素可以剂量依赖性减少 OA 患者中 *HNP3* 的含量; 减少低浓度去甲肾上腺素用量会增加 *HNP3*

和 *TNF* 的含量, 影响 OA 组织炎症反应的严重程度^[32]。虽然 *TNF- α* 和 *IL*-1 都可以诱导正常软骨病变, 但是当前仍缺乏足够的研究证据证实 *HNP3* 对 OA 的调控作用, 尤其是 *HNP3* 通过调控免疫反应参与 OA 发生发展的相关研究仍然空缺。*V* 型胶原 A2 (collagen type V alpha 2 chain, *COL5A2*) 属于胶原蛋白的一种, 不仅是细胞外基质的主要成分, 还是参与免疫调节和血管生成的重要分子^[33]。有研究表明, 敲除 *COL5A2* 基因可以抑制转化生长因子 β (transforming growth factor beta, *TGF- β*) 和 *Wnt/ β -catenin* 信号通路^[34]。而 *TGF- β* 和 *Wnt/ β -catenin* 信号通路都是调控软骨细胞发生炎症反应、凋亡、自噬以及细胞外基质降解等表型的重要信号通路, 对调控 OA 的进展十分重要^[35]。另一项研究指出, *COL5A2* 在类风湿性关节炎组织中表达增加, 并参与调控类风湿性关节炎的进展^[36]。相关研究报道, *V* 型胶原蛋白与 *XI* 型胶原蛋白可以组成调节性纤维状胶原蛋白的一个亚类, 并与多种疾病的发生发展有关^[37]。而且, 早有研究表明, *V* 型胶原蛋白与 *XI* 型胶原蛋白参与调控大鼠关节炎中的细胞免疫反应和体液免疫反应^[38]。此外, *circ COL11A1* (ID: *hsa_circ_0110251*) 能减轻 *IL*-1 β 诱导所致的软骨细胞凋亡以及细胞外基质降解, 改善 OA 症状^[39]。总之, 越来越多的研究提示, *COL5A2* 可能在参与 OA 免疫反应中具有重要作用, 但现在仍缺少相关实验证明 *COL5A2* 与 OA 软骨细胞之间的直接联系。

为深入探索免疫浸润在 OA 发生发展中的作用, 本研究利用 *ssGSEA* 算法对 *GEO* 数据集进行了免疫浸润分析。结果显示, 与正常的软骨组织相比, OA 软骨组织中活化 B 细胞等免疫细胞显著增加 (图 9)。活化 B 细胞属于 B 细胞的一种, 是成熟 B 细胞受到抗原等因素刺激后形成的, 也是浆细胞和记忆 B 细胞的前体细胞。在 OA 中, 软骨基质分解产物刺激 B 细胞, 从而使 B 细胞产生自身抗体并激活体液免疫, 导致整个关节稳态进一步失衡^[40]。自身抗体产生所带来的影响可能在于免疫复合物在关节软骨中的扩散和沉积, 继而使软骨更易于退化受损; 而软骨退化受损又会刺激补体系统清除免疫复合物, 最终使这一过程成为引起组织损伤的复杂因素之一^[41-42]。近来不少研究也认为, 对于 OA 的治疗不应只着眼于软骨的“磨损”, 还应着眼于对其发生和发展有重大影响的免疫细胞^[42]。因此, 从调控免疫细胞浸润的角度改

善局部炎症微环境和组织再生微环境在 OA 的治疗中有巨大的潜力。此外,进一步的相关性分析表明,本研究所筛选出的 4 个关键基因的异常表达与免疫细胞的浸润有一定相关性(图 10),这对于深入研究 OA 的发生发展具有一定的参考意义。

综上所述,本文利用生物信息学方法对 OA 的免疫浸润机制进行了分析,并预测了免疫相关关键基因,为 OA 的机制研究提供了参考。本研究局限之处在于所应用的数据集依赖于公共 GEO 数据库中的 OA 软骨组织数据集,且受制于其纳入的样本数量,分析结果可能存在一定偏差,因此相关结论需要进一步实验验证。

参考文献(References):

- [1] KATZ J N, ARANT K R, LOESER R F. Diagnosis and treatment of hip and knee osteoarthritis: a review[J]. *The Journal of the American Medical Association*, 2021, 325(6): 568–578.
- [2] HILIGSMANN M, COOPER C, ARDEN N, *et al.* Health economics in the field of osteoarthritis: an expert's consensus paper from the European Society for Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis and Osteoarthritis (ESCEO)[J]. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, 2013, 43(3): 303–313.
- [3] SAFIRI S, KOLAH A A, SMITH E, *et al.* Global, regional and national burden of osteoarthritis 1990–2017: a systematic analysis of the Global Burden of Disease Study 2017[J]. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 2020, 79(6): 819–828.
- [4] GLYN-JONES S, PALMER A J R, AGRICOLA R, *et al.* Osteoarthritis[J]. *The Lancet*, 2015, 386(9991): 376–387.
- [5] NEDUNCHEZHIAN U, VARUGHESE I, SUN A R, *et al.* Obesity, inflammation, and immune system in osteoarthritis[J]. *Frontiers in Immunology*, 2022, 13: 907750.
- [6] ROBINSON W H, LEPUS C M, WANG Q, *et al.* Low-grade inflammation as a key mediator of the pathogenesis of osteoarthritis[J]. *Nature Reviews Rheumatology*, 2016, 12(10): 580–592.
- [7] KALAITZOGLU E, GRIFFIN T M, HUMPHREY M B. Innate immune responses and osteoarthritis[J]. *Current Rheumatology Reports*, 2017, 19(8): 45.
- [8] TAN L, XU Q, SHI R Z, *et al.* Bioinformatics analysis reveals the landscape of immune cell infiltration and immune-related pathways participating in the progression of carotid atherosclerotic plaques[J]. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 2021, 49(1): 96–107.
- [9] MALTA T M, SOKOLOV A, GENTLES A J, *et al.* Machine learning identifies stemness features associated with oncogenic dedifferentiation[J]. *Cell*, 2018, 173(2): 338–354.e15.
- [10] CHEN L, KE X Y. MMP7 as a potential biomarker of colon cancer and its prognostic value by bioinformatics analysis[J]. *Medicine*, 2021, 100(9): e24953.
- [11] ZHAO X W, ZHANG L L, WANG J, *et al.* Identification of key biomarkers and immune infiltration in systemic lupus erythematosus by integrated bioinformatics analysis[J]. *Journal of Translational Medicine*, 2021, 19: 35.
- [12] YE L L, ZHANG T M, KANG Z C, *et al.* Tumor-infiltrating immune cells act as a marker for prognosis in colorectal cancer[J]. *Frontiers in Immunology*, 2019, 10: 2368.
- [13] WU H H, YAN X, CHEN Z, *et al.* GNRH1 and LTB4R might be novel immune-related prognostic biomarkers in clear cell renal cell carcinoma (ccRCC)[J]. *Cancer Cell International*, 2021, 21: 354.
- [14] YUAN G H, MASUKO-HONGO K, KATO T, *et al.* Immunologic intervention in the pathogenesis of osteoarthritis[J]. *Arthritis and Rheumatism*, 2003, 48(3): 602–611.
- [15] 谭震, 厉小梅. 骨关节炎与免疫[J]. *中国实用内科杂志(TAN Zhen, LI Xiaomei. Osteoarthritis and immunity[J]. Chinese Journal of Practical Internal Medicine)*, 2019, 39(8): 674–676, 680.
- [16] CHASSIN H, GEERING B, SCHUKUR L, *et al.* Sensing and responding to allergic response cytokines through a genetically encoded circuit[J]. *Nature Communications*, 2017, 8: 1101.
- [17] TETLOW L C, WOOLLEY D E. Histamine stimulates matrix metalloproteinase-3 and -13 production by human articular chondrocytes *in vitro*[J]. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 2002, 61(8): 737–740.
- [18] TAYLOR D J, YOFFE J R, BROWN D M, *et al.* Histamine stimulates prostaglandin E production by rheumatoid synovial cells and human articular chondrocytes in culture[J]. *Arthritis and Rheumatism*, 1986, 29(2): 160–165.
- [19] VANDAMME D, LANDUYT B, LUYTEN W, *et al.* A comprehensive summary of LL-37, the factotum human cathelicidin peptide[J]. *Cellular Immunology*, 2012, 280(1): 22–35.
- [20] XHINDOLI D, PACOR S, BENINCASA M, *et al.* The human cathelicidin LL-37: a pore-forming antibacterial peptide and host-cell modulator[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2016, 1858(3): 546–566.
- [21] WANG G L, LI Y L, YANG G, *et al.* Cathelicidin antimicrobial peptide (CAMP) gene promoter methylation induces chondrocyte apoptosis[J]. *Human Genomics*, 2021, 15: 24.
- [22] LI S J, ZHANG Y, SUN Y D, *et al.* Exposure to fermentation supernatant of *Staphylococcus aureus* accelerated dedifferentiation of chondrocytes and production of antimicrobial peptides[J]. *Journal of Orthopaedic Research*, 2018, 36(1): 443–451.
- [23] WANG X F, CHEN L L, ZHAO X Y, *et al.* A cathelicidin-related antimicrobial peptide suppresses cardiac hypertrophy induced by pressure overload by regulating IGF1R/PI3K/Akt and TLR9/AMPK α [J]. *Cell Death & Disease*, 2020, 11: 96.
- [24] TANG Y H, MO Y F, XIN D W, *et al.* β -Ecdysterone alleviates osteoarthritis by activating autophagy in chondrocytes through regulating PI3K/Akt/mTOR signal pathway[J]. *American Journal of Translational Research*, 2020, 12(11): 7174–7186.
- [25] 周松, 蔡敏, 李兴艳, 等. 警报素 S100A8/A9 对骨关节炎相关细胞影响的研究进展[J]. *实用骨科杂志(ZHOU Song, CAI Min, LI Xingyan, et al. Research progress on the effects of alarmin S100A8/A9 on osteoarthritis-related cells[J]. Journal of Practical Orthopaedics)*, 2021, 27(2): 143–147.
- [26] GANTA V C, CHOI M, FARBER C R, *et al.* Antiangiogenic VEGF165b regulates macrophage polarization via S100A8/S100A9 in peripheral artery disease[J]. *Circulation*, 2019, 139(2): 226–242.
- [27] YI W J, ZHU R L, HOU X Y, *et al.* Integrated analysis reveals S100A8/A9 regulates autophagy and apoptosis through the M-Apk and PI3K-Akt signaling pathway in the early stage of myocardial infarction[J]. *Cells*, 2022, 11(12): 1911.
- [28] YANG Q S, CHEN C, WU S J, *et al.* Advanced glycation end products downregulates peroxisome proliferator-activated receptor γ expression in cultured rabbit chondrocyte through MAPK pathway[J]. *European Journal of Pharmacology*, 2010, 649(1/2/3): 108–114.

- [29] VAN DEN BOSCH M H, BLOM A B, SCHELBERGEN R F P, *et al.* Induction of canonical Wnt signaling by the alarmins S100A8/A9 in murine knee joints: implications for osteoarthritis[J]. *Arthritis & Rheumatology*, 2016, 68(1): 152–163.
- [30] FROY O, STHOEGER Z M. Defensins in systemic lupus erythematosus[J]. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2009, 1173: 365–369.
- [31] SOEHNLEIN O, KAI-LARSEN Y, FRITHIOF R, *et al.* Neutrophil primary granule proteins HBP and HNP1–3 boost bacterial phagocytosis by human and murine macrophages[J]. *Journal of Clinical Investigation*, 2008, 118(10): 3491–3502.
- [32] RIEPL B, GRÄSSEL S, WIEST R, *et al.* Tumor necrosis factor and norepinephrine lower the levels of human neutrophil peptides 1–3 secretion by mixed synovial tissue cultures in osteoarthritis and rheumatoid arthritis[J]. *Arthritis Research & Therapy*, 2010, 12(3): R110.
- [33] DING Y L, SUN S F, ZHAO G L. COL5A2 as a potential clinical biomarker for gastric cancer and renal metastasis[J]. *Medicine*, 2021, 100(7): e24561.
- [34] HAN Y L, LUO D, HABAXI K, *et al.* COL5A2 inhibits the TGF- β and Wnt/ β -catenin signaling pathways to inhibit the invasion and metastasis of osteosarcoma[J]. *Frontiers in Oncology*, 2022, 12: 813809.
- [35] YAO Q, WU X H, TAO C, *et al.* Osteoarthritis: pathogenic signaling pathways and therapeutic targets[J]. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2023, 8: 56.
- [36] ZHU J S, TU S H, QU Q W. lncRNA BZRAP1-AS1 alleviates rheumatoid arthritis by regulating miR-1286/COL5A2 axis[J]. *Immunity, Inflammation and Disease*, 2022, 10(2): 163–174.
- [37] SMITH S M, BIRK D E. Focus on molecules: collagens V and XI[J]. *Experimental Eye Research*, 2012, 98(1): 105–106.
- [38] CREMER M A, YE X J, TERATO K, *et al.* Type XI collagen-induced arthritis in the Lewis rat. Characterization of cellular and humoral immune responses to native types XI, V, and II collagen and constituent alpha-chains[J]. *Journal of Immunology*, 1994, 153(2): 824–832.
- [39] ZHANG Y W, ZHENG H H, LI B T. circ_0110251 overexpression alleviates IL-1 β -induced chondrocyte apoptosis and extracellular matrix degradation by regulating miR-3189-3p/SPRY1 axis in osteoarthritis[J]. *Autoimmunity*, 2022, 55(3): 168–178.
- [40] ZHU W S, ZHANG X, JIANG Y T, *et al.* Alterations in peripheral T cell and B cell subsets in patients with osteoarthritis[J]. *Clinical Rheumatology*, 2020, 39(2): 523–532.
- [41] MÖDINGER Y, RAPP A E, VIKMAN A, *et al.* Reduced terminal complement complex formation in mice manifests in low bone mass and impaired fracture healing[J]. *American Journal of Pathology*, 2019, 189(1): 147–161.
- [42] ZHAO X G, ZHAO Y H, SUN X, *et al.* Immunomodulation of MSCs and MSC-derived extracellular vesicles in osteoarthritis[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2020, 8: 575057.

勘 误 声 明

新冠病毒 Omicron 变异毒株的研究进展与展望

蔡雨豪^{1,2}, 张婷婷^{1,3*}, 程扬健^{1,3*}

(1. 福州大学 先进制造学院, 中国福建 泉州 362251; 2. 福州大学 海洋学院, 中国福建 泉州 362251; 3. 晋江市福大科教园区发展中心, 中国福建 泉州 362251)

原始文章发表于《生命科学研究》杂志 2023, 27(3): 210–216。

DOI:10.16605/j.cnki.1007-7847.2022.06.0157

该文的第一作者蔡雨豪应为福建厦门人, 第三作者程扬健应为福建松溪人, 特此勘误!

《生命科学研究》编辑部

2023 年 10 月 31 日