

骨质疏松铁死亡相关基因的生物信息学分析及实验验证

夏玉双¹, 王博², 潘鹏飞¹, 任祥顺², 高李侠², 熊键², 马艳²

- 湖北中医药大学第一临床学院, 湖北武汉 430061
- 湖北中医药大学附属武汉市第一医院(武汉市中西医结合医院)康复医学中心, 湖北武汉 430022

[摘要] **目的:** 借助生物信息学技术探究骨质疏松中铁死亡的基因靶点并利用体外实验验证骨质疏松中铁死亡关键基因, 探讨铁死亡在骨质疏松中的作用机制。**方法:** 在基因芯片公共数据库中筛选骨质疏松相关基因数据集GSE35958并进行数据矫正分析; 在FerrDb数据库中筛选铁死亡相关基因, 并与数据集GSE35958差异表达基因取交集得到骨质疏松中铁死亡相关差异表达基因, 然后进行差异表达基因的基因本体(GO)与京都基因和基因组数据库(KEGG)富集分析; 分析差异表达基因的Spearman相关系数, 并绘制蛋白质-蛋白质相互作用网络, 然后利用Cytoscape软件CytoHubba插件中Degree、MNC、EPC、MCC和DMNC五种方法筛选出骨质疏松铁死亡关键基因; 采用受试者操作特征(ROC)曲线评估关键基因对骨质疏松的诊断价值; 将非骨质疏松患者来源的骨髓间充质干细胞作为对照组, 骨质疏松患者来源的骨髓间充质干细胞作为骨质疏松组, 采用定量逆转录聚合酶链反应法对两组铁死亡关键基因的信使RNA表达进行验证。**结果:** 共筛选出32个骨质疏松铁死亡相关差异表达基因, 包括26个上调基因和6个下调基因。GO富集分析表明, 32个基因主要参与细胞间黏附、脂质代谢过程、细胞因子反应等过程; KEGG富集分析表明这些基因主要参与黏着斑、丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)、PI3K-Akt、Wnt等信号通路。Spearman相关性分析显示差异表达基因之间存在一定相关性。进一步分析获得MAPK3、CDKN1A、MAP1LC3A、TNF、RELA和TGF- β 1等六个骨质疏松铁死亡关键基因。ROC曲线显示, 这六个关键基因在骨质疏松中具有良好的诊断性能, 有望成为骨质疏松潜在生物标志物。体外实验证实六个骨质疏松铁死亡关键基因在对照组与骨质疏松组间差异有统计学意义(均 $P < 0.05$)。**结论:** 确定了六个骨质疏松铁死亡关键基因可以作为骨质疏松的生物标志物, 为骨质疏松的早期诊断和治疗提供了新思路。



收稿日期(Received): 2024-03-19 接受日期(Accepted): 2024-05-05 网络预发表日期(Online): 2024-11-21

基金项目(Funding): 武汉市卫健委青年项目(WX21Q9, WZ22Q37)

第一作者(First author): 夏玉双, 硕士研究生, 主要从事骨质疏松疾病康复治疗研究; E-mail: 2559114291@qq.com; <https://orcid.org/0009-0002-2423-6547>

通信作者(Corresponding author): 马艳, 主任医师, 教授, 硕士生导师, 主要从事骨质疏松疾病康复治疗研究; E-mail: 1203135093@qq.com; <https://orcid.org/0009-0005-5915-5749>

[关键词] 骨质疏松;铁死亡;生物信息学;体外试验;生物标志物

[中图分类号] R318.04 [文献标志码] A

Ferroptosis-related genes in osteoporosis: a bioinformatics analysis and *in vitro* study

XIA Yushuang¹, WANG Bo², PAN Pengfei¹, REN Xiangshun², GAO Lixi², XIONG Jian², MA Yan² (1. The First Clinical College of Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430061, China; 2. Rehabilitation Medicine Center, Wuhan First Municipal Hospital Affiliated to Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430022, China)

Corresponding author: MA Yan, E-mail: 1203135093@qq.com, <https://orcid.org/0009-0005-5915-5749>

[Abstract] **Objective:** To explore ferroptosis-related genes in osteoporosis through bioinformatic analysis and *in vitro* study. **Methods:** Osteoporosis-related genes were identified from dataset GSE35958 in the Gene Expression Omnibus database; and the ferroptosis-related genes were identified from the FerrDb database. These were intersected with the differentially expressed genes in GSE35958 to obtain ferroptosis-related genes in osteoporosis. Gene Ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) enrichment analysis were performed for the differentially expressed genes. And Spearman correlation and protein-protein interaction network analysis were performed. Then, the hub genes of ferroptosis in osteoporosis were screened by Degree, MNC, EPC, MCC and DMNC in Cytoscape software CytoHubba plugin; and analyzed with receiver operating characteristic (ROC) curves. The bone marrow mesenchymal stem cells from osteoporosis patients (osteoporosis group) and non-osteoporosis patients (control group) were subjected to quantitative reverse transcription polymerase chain reaction to detect the messenger RNA expression of ferroptosis hub genes in both groups. **Results:** A total of 32 differentially expressed genes related to ferroptosis in osteoporosis were identified, including 26 up-regulated genes and 6 down-regulated genes. GO enrichment analysis showed that the identified genes were mainly involved in intercellular adhesion, lipid metabolism and cytokine response. KEGG enrichment analysis showed that the genes were mainly involved in signaling pathways of adhesive plaques, MAPK, PI3K-Akt, and Wnt. Spearman correlation analysis showed correlation among differentially expressed genes. Six hub genes for ferroptosis in osteoporosis were obtained, namely *MAPK3*, *CDKN1A*, *MAP1LC3A*, *TNF*, *RELA*, and *TGF-β1*. ROC curve analysis showed that these hub genes had good diagnostic performance in osteoporosis and may become potential biomarkers of osteoporosis. *In vitro* experiments confirmed significant differences in these hub genes between the control group and the osteoporosis group (all $P < 0.05$). **Conclusion:** This study has identified six ferroptosis-related hub genes in osteoporosis, which may be used as novel biomarkers for the early diagnosis and treatment of osteoporosis.

[Key words] Osteoporosis; Ferroptosis; Bioinformatics; *In vitro* test; Biomarker

[J Zhejiang Univ (Med Sci), 2024, 53(6): 680-690.]

[缩略语] 基因芯片公共数据库(Gene Expression Omnibus, GEO);倍数变化(fold change, FC);用于注释、可视化及集成发现数据库(the Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery, DAVID);基因本体(Gene Ontology, GO);京都基因和基因组数据库(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG);蛋白质-蛋白质相互作用(protein-protein interaction, PPI);受试者操作特征曲线(receiver operating characteristic curve, ROC 曲线);曲线下面积(area under the curve, AUC);定量逆转录聚合酶链反应(quantitative reverse transcription polymerase chain reaction, qRT-PCR);互补DNA(complementary DNA, cDNA);甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH);丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK);磷脂酰肌醇3-激酶(phosphoinositide 3-kinase, PI3K);肌球蛋白重链(myosin heavy chain, MYH);二氢硫辛酰胺 S-琥珀酰转移酶(dihydrolipoamide S-succinyltransferase, DLST);异质核糖核蛋白 L(heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L, HNRNPL);酪氨酸 3-单加氧酶/色氨酸 5-单加氧酶活化蛋白(tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein beta, YWHAB);短/支链酰基辅酶 A 脱氢酶(acyl-CoA dehydrogenase short/branched chain, ACADSB);酰基辅酶 A 合成酶家族(acyl-CoA synthetase family, ACSF);热休克转录因子(heat shock transcription factor, HSF);早幼粒细胞白血病基因(promyelocytic leukemia, PML);肿瘤蛋白(tumor protein, TP);肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF);葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(glucose-6-phosphate dehydrogenase, G6PD);原癌基因, NF- κ B 亚基(RELA proto-oncogene, NF- κ B subunit, RELA);转化生长因子(transforming growth factor, TGF);细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂 1A(cyclin dependent kinase inhibitor 1A, CDKN1A);微管相关蛋白 1 轻链 3(microtubule associated protein 1 light chain 3 alpha, MAP1LC3A);免疫球蛋白超家族(immunoglobulin superfamily, IGSF);分化抗原(cluster of differentiation, CD);突触后致密蛋白(postsynaptic density protein, PSD);核因子 κ B 配体受体激活剂(receptor activator of nuclear factor- κ B ligand, RANKL)

骨质疏松是常见的代谢性骨病,好发于中老年人群,尤其是绝经期女性。由于骨量丢失和骨组织微结构破坏,骨脆性增加,导致患者发生骨折的可能性增加,不仅严重影响患者的生活质量,还会增加患者死亡的风险^[1]。随着人口老龄化的不断加剧,骨质疏松逐渐成为一个日益严重的公共卫生问题,不仅给患者的日常生活带来不便,导致其生活质量下降,还会增加其经济压力。目前骨质疏松的具体发病机制尚未完全阐明,治疗方法也有限。

铁死亡于 2012 年被描述为铁依赖性非凋亡细胞死亡形式,是一种新型细胞死亡,其关键因素是铁代谢异常导致的铁过载和脂质过氧化^[2]。研究表明,铁过载会减弱成骨细胞的活性并降低其分化,同时会加强破骨细胞的增殖和分化,从而导致体内骨重塑异常,引起骨质疏松^[3]。Cheng

等^[4]研究发现,体内铁含量超载会降低骨密度,主要是促进 I 型胶原蛋白的降解,并引发严重炎症反应,最终导致骨质疏松。对 167 名绝经后妇女的临床资料进行研究的结果表明,脂质过氧化标志物氢过氧化物的血清水平与全身骨密度相关,其水平升高,则骨密度降低^[5]。上述研究表明,铁死亡与骨质疏松关系密切,但铁死亡在骨质疏松中的具体作用机制仍未阐明。本研究拟通过美国国家生物信息技术中心 GEO 数据库,挖掘骨质疏松铁死亡相关生物标志物,并通过体外试验进行验证,从而为骨质疏松的诊治提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 数据收集和整理

在 GEO 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)中检索人类基因芯片样本,检索词设置为

“Osteoporosis”,筛选得到GSE35958数据集。该数据集基于GPL570平台,是由Benisch等^[6]于2012年2月21日提交至国家生物技术信息中心基因表达综合中心数据库中骨髓来源的数据集,包括5例老年骨质疏松间充质干细胞捐献者(均为女性,年龄分别为79、94、87、82、89岁)和4名年龄匹配的非骨质疏松间充质干细胞捐献者(三女一男,年龄分别为79、80、89、79岁)。通过FerrDb数据库(<http://zhounan.org/ferrdb/>)检索获取铁死亡相关基因。收集2022年1月1日至2023年12月31日在武汉市第一医院康复医学科行全髋关节置换术患者的骨髓标本,根据其骨质疏松检查结果分为对照组和骨质疏松组。

1.2 筛选骨质疏松差异表达基因

对GSE35958进行数据校正和数据归一化;利用主成分分析法观察整体分布,并识别是否具有离散样本的存在;利用 t 检验分析并基于假设检验对 P 值进行校正,筛选出校正后 $P < 0.05$ 且 $|\logFC| > 1$ 的基因作为差异表达基因,并构建火山图,通过R软件pheatmap包构建热图从而进行可视化处理。

1.3 筛选骨质疏松铁死亡差异表达基因

利用Hiplot在线工具(<https://hiplot.com.cn/>)将骨质疏松差异表达基因与铁死亡相关基因进行交集并绘制韦恩图,交集基因即为骨质疏松铁死亡相关基因。

1.4 骨质疏松铁死亡差异表达基因功能富集分析

利用DAVID数据库(<http://david.ncifcrf.gov>)对骨质疏松中铁死亡差异表达基因进行GO和KEGG富集分析。

1.5 不同骨质疏松铁死亡差异表达基因的相关性分析

利用Hiplot在线工具(<https://hiplot.com.cn/>)对铁死亡差异表达基因的表达水平进行Spearman相关性分析,以探索骨质疏松中这

些基因之间的内在关系。

1.6 骨质疏松铁死亡差异表达基因蛋白网络构建及模块分析

在STRING数据库(<https://string-db.org/>)中构建铁死亡差异表达基因的PPI网络,设定筛选阈值为不小于0.4,去掉孤立的节点并对网络进行优化,获得铁死亡差异表达基因PPI数据,并使用Cytoscape软件(<https://cytoscape.org/>)对PPI数据进行可视化处理。

1.7 骨质疏松铁死亡关键基因筛选及其诊断价值判断

利用Cytoscape软件CytoHubba插件中Degree、MNC、EPC、MCC和DMNC等五种方法筛选出前十个节点基因并作交集,得到铁死亡关键基因。通过Sangerbox平台(<http://vip.sangerbox.com/home.html>)内置的工具绘制ROC曲线,分析关键基因的特异性表达情况,并挖掘骨质疏松诊断的生物标志物。AUC是评价关键基因的诊断性能的特异性指标。AUC取值范围为0.5~1.0,取值越接近1,诊断性能越好。

1.8 qRT-PCR法检测骨质疏松患者铁死亡相关基因表达

采用既往分离培养骨髓间充质干细胞的方法^[7],将对照组和骨质疏松组骨髓间充质干细胞培养至第三代细胞用于后续实验。将两组骨髓间充质干细胞用磷酸盐缓冲液冲洗两遍,加入1 mL TRIzol试剂提取总RNA,取1 μ L测定其浓度,逆转录生成cDNA后进行定量聚合酶链反应。引物序列见表1。反应体系为20 μ L,包含SYBR Green qPCR Mix 10 μ L、上下游引物(10 μ mol)各

表1 qRT-PCR引物序列

Table 1 Primer sequences of qRT-PCR

基 因	引物序列(5'→3')	产物大小 (bp)
MAPK3	上游:GGACCTGATGGAGACTGACCTG,下游:TGGCGGAGTGGATGTACTTGAG	116
MAP1LC3A	上游:GCCTTCTCCTCTGCTGGTGAAC,下游:AAGCCGTCCTCGTCTTTCTCC	92
TNF	上游:CTCATCTACTCCCAGGTCCTCTTC,下游:CGATGCCGGCTGATGCTGTG	82
TGF- β 1	上游:GCAACAATTCTGGCGATACCTC,下游:CCTCCACGGCTCAACCACTG	112
CDKN1A	上游:CCTGCCGCGCCTCTTC,下游:CTCCAGTGGTGTCTCGGTGAC	131
RELA	上游:CCTGTCCTTTCTCATCCATCTTTG,下游:GCTGCCAGAGTTTCGGTTCAC	87
GAPDH	上游:CCTGCACCACCAACTGCTTA,下游:GGTCAGGTCCACCACTGACA	287

qRT-PCR:定量逆转录聚合酶链反应;MAPK:丝裂原活化蛋白激酶;MAP1LC3A:微管相关蛋白1轻链3;TNF:肿瘤坏死因子;TGF- β 1:转化生长因子 β 1;CDKN1A:细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂1A;RELA:原癌基因,NF- κ B亚基;GAPDH:甘油醛-3-磷酸脱氢酶。

1 μL cDNA 模板 2 μL 和去 RNA 酶水 6 μL 。反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火延伸 30 s, 40 个循环。每个样本重复三次。采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算目的基因经内参 GAPDH 标准化后的相对表达量。

1.9 统计学方法

采用 SPSS 22.0 软件进行统计分析。计量资料符合正态分布, 采用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两两比较采用 LSD- t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 骨质疏松差异表达基因筛选结果

运用主成分分析法降维分析 GSE35958 数据集, 结果表明该数据的可重复性是可靠的(图 1)。对 GSE35958 数据集中的 9 例骨髓间充质干细胞样本表达数据进行差异分析, 筛出差异表达基因共 1177 个, 包括 997 个上调基因和 180 个下调基因, 见图 2。

2.2 骨质疏松铁死亡差异表达基因筛选结果

通过 FerrDb 数据库获得铁死亡相关基因 469 个, 与骨质疏松差异表达基因取交集共获得 32 个骨质疏松铁死亡基因, 其中 26 个上调基因和 6 个下调基因, 见图 3 和附表 1。

2.3 骨质疏松铁死亡相关差异表达基因 GO 和 KEGG 富集分析结果

对 32 个骨质疏松铁死亡相关差异表达基因

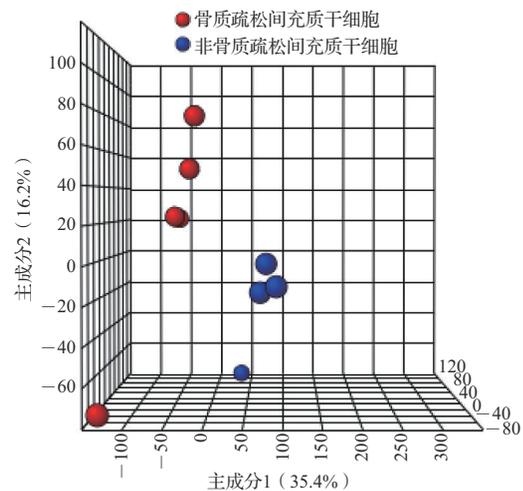
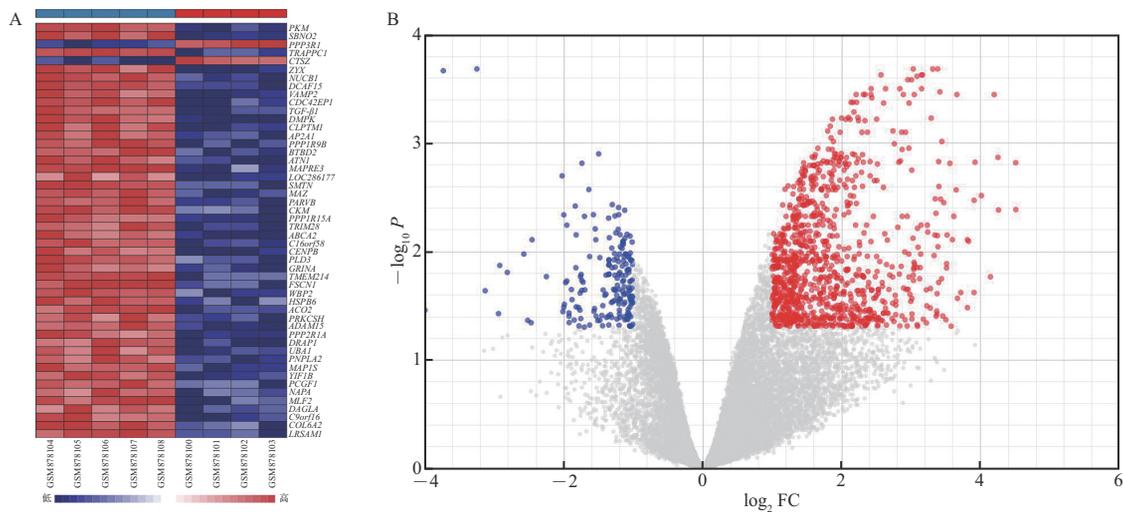


图 1 GSE35958 数据集的主成分分析结果
Figure 1 Results of principal component analysis in the GSE35958 dataset

进行 GO 和 KEGG 富集分析显示, 生物过程主要涉及细胞间黏附、脂质代谢过程、细胞因子反应等; 细胞成分显示其主要存在于细胞-细胞黏附连接、黏着斑中; 分子功能主要在蛋白质结合中发挥作用。KEGG 富集分析表明, 骨质疏松中铁死亡基因主要在黏着斑和 MAPK、PI3K-Akt、Wnt 等信号通路发挥作用。见图 4。

2.4 骨质疏松铁死亡相关差异表达基因之间的相关性

对 32 个骨质疏松铁死亡相关差异表达基因进行 Spearman 相关性分析结果显示, MYH10 与 DLST、HNRNPL 正相关, YWHAB 与 ACADSB、ACSF2



A: 热图, 红色表示上调, 蓝色表示下调; B: 火山图, 每个点代表一个基因, 红色表示上调, 蓝色表示下调, 灰色表示无明显差异。

图 2 GSE35958 数据集中差异表达基因的热图和火山图

Figure 2 Heat map and volcano diagram of differentially expressed genes in the GSE35958 dataset

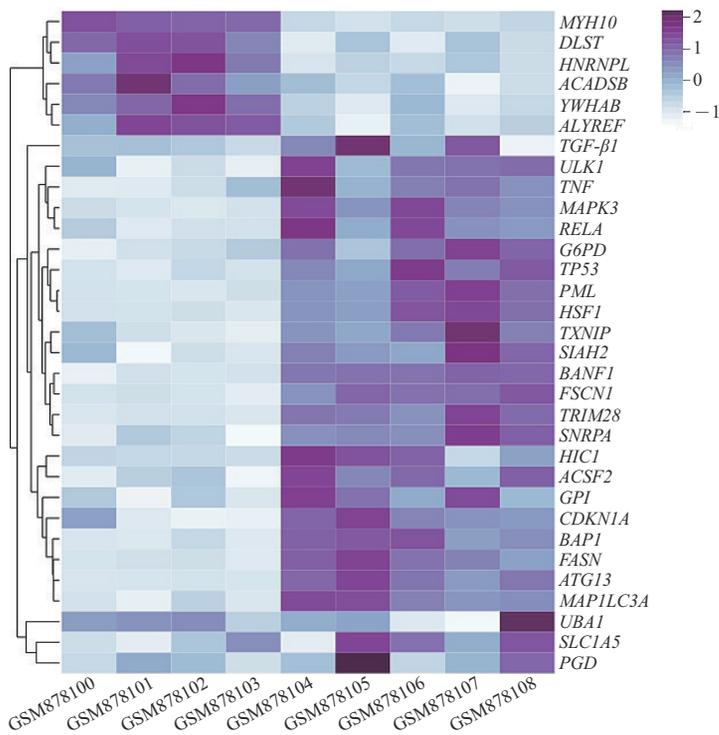


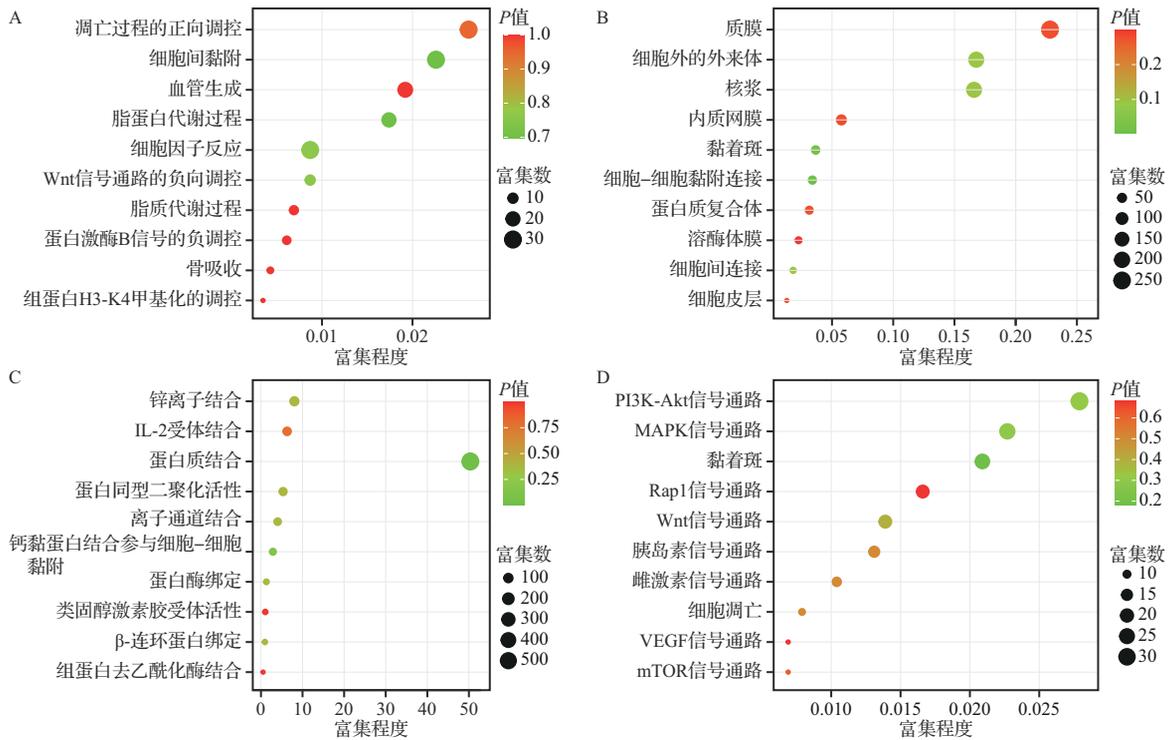
图3 骨质疏松铁死亡相关基因的层次聚类热图
 Figure 3 Hierarchical clustering heat map of genes related to ferroptosis in osteoporosis

以及 *MYH10* 正相关,提示上述基因之间的表达呈现相互促进的作用;而 *HSF1* 与 *DLST*, *PML* 与 *DLST*、*HNRNPL* 及 *MYH10* 负相关,表明这些基因呈现相互抑制的作用。见附图 1。

PPI 分析结果显示, PPI 网络一共由 27 个节点和 120 条边组成, 其中 TP53、TNF、MAPK3、G6PD、RELA、TGF-β1、CDKN1A、MAP1LC3A 具有较高节点度(图 5), 提示其相应基因可能是骨质疏松铁死亡的关键靶点基因。

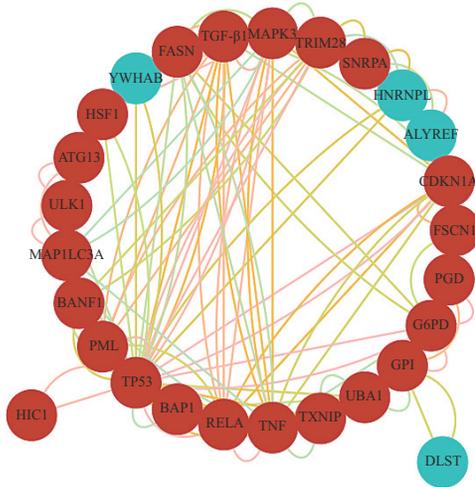
2.5 骨质疏松铁死亡关键基因筛选结果

通过 CytoHubba 五种算法计算 PPI 网络中前十个基因作为枢纽基因, 并进行交叉映射, 最终确定 *MAPK3*、*CDKN1A*、*MAP1LC3A*、*TNF*、*RELA* 和 *TGF-β1* 为骨质疏松铁死



A: 前十项生物学过程条目的气泡图; B: 前十项细胞组分条目的气泡图; C: 前十项分子功能条目的气泡图; D: KEGG 富集结果分析气泡图. GO: 基因本体; KEGG: 京都基因和基因组数据库; PI3K: 磷脂酰肌醇 3-激酶; Akt: 蛋白激酶 B; MAPK: 丝裂原活化蛋白激酶; Rap: Ras 相关蛋白; VEGF: 血管内皮生长因子; mTOR: 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白。

图4 32个骨质疏松铁死亡相关差异表达基因的GO分析和KEGG通路功能富集分析结果
 Figure 4 GO analysis and KEGG pathway functional enrichment analysis of 32 differentially expressed genes related to ferroptosis in osteoporosis



每个节点代表一种蛋白质,每条边代表一种蛋白质-蛋白质相互作用.红色表示上调,绿色表示下调.

图5 骨质疏松铁死亡相关差异表达基因蛋白质-蛋白质相互作用网络

Figure 5 Protein-protein interaction network of ferroptosis-related differential genes in osteoporosis

亡关键基因。

2.6 骨质疏松铁死亡关键基因的诊断价值

ROC 曲线显示, *RELA*、*MAPK3*、*MAP1LC3A*、*TNF*、*CDKN1A* 和 *TGF-β1* 诊断骨质疏松的 AUC 分

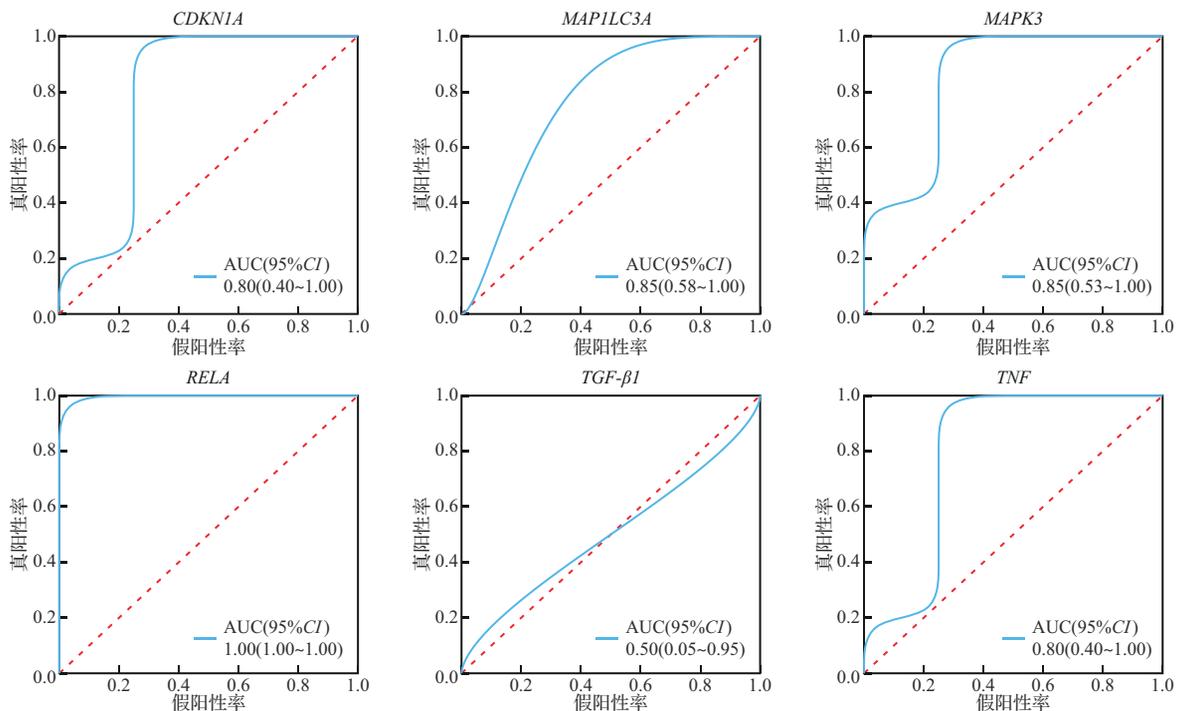
别为 1.00、0.85、0.85、0.80、0.80 和 0.50(图 6),提示这六个关键基因在骨质疏松中具有良好的诊断性能,有望成为骨质疏松的潜在生物标志物。

2.7 骨质疏松铁死亡基因表达离体细胞验证结果

qRT-PCR 法结果表明,与对照组比较,骨质疏松组 *TNF*、*MAPK3*、*RELA*、*MAP1LC3A*、*TGF-β1*、*CDKN1A* mRNA 表达增加(均 $P < 0.05$,附图 2),与生物信息学分析结果一致。

3 讨论

骨质疏松是一种与全身代谢密切相关的疾病,由多种原因引起骨代谢、骨重塑异常,导致骨密度降低,严重时可并发骨折。近年来,铁死亡对骨质疏松调控作用的相关研究逐渐增多。骨质疏松患者往往会有铁代谢紊乱、脂质过氧化等,并进一步出现铁死亡^[8]。有研究发现铁死亡可以调控骨重塑,导致骨吸收增多,进而使骨质流失发展为骨质疏松^[9],但其具体机制和相关信号通路及靶分子尚未明确。探究铁死亡对于成骨细胞和破骨细胞的调节作用,挖掘其生物标志物,可能可以为骨质疏松的防治提供新的思路。



AUC: 曲线下面积; CI: 置信区间; CDKN1A: 细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂 1A; MAP1LC3A: 微管相关蛋白 1 轻链 3; MAPK: 丝裂原活化蛋白激酶; RELA: 原癌基因, NF-κB 亚基; TGF: 转化生长因子; TNF: 肿瘤坏死因子。

图6 骨质疏松铁死亡相关关键基因诊断骨质疏松的受试者操作特征曲线

Figure 6 ROC curves of six overlapping ferroptosis related hub genes in osteoporosis samples

本文在 GEO 数据库中获得骨质疏松表达基因 GSE35958 数据集,并对其 9 名捐献者间充质干细胞基因表达数据进行差异分析,从 FerrDb 数据库筛选铁死亡相关基因。然后将骨质疏松差异表达基因和铁死亡相关基因相交集后得到 32 个骨质疏松铁死亡基因。对筛选出来的 32 个骨质疏松铁死亡基因进行 GO 功能注释发现,其在生物过程中主要参与了细胞间黏附、脂质代谢过程、细胞因子反应等。研究显示,破骨细胞的成熟需要来自细胞表面受体的相关信号传导,其中细胞黏附分子家族的 IgSF11 和 CD44 对破骨细胞分化起着重要的调节作用:IgSF11 通过与 PSD-95 结合在破骨细胞分化中起着重要作用,IgSF11 缺乏会导致破骨细胞分化受损;当细胞间相互作用条件不佳时,表达 CD44 的破骨细胞可以通过与 PSD-95 结合来弥补 IgSF11 的缺乏^[10-11]。脂质代谢过程中胆固醇代谢在各种类型的骨质疏松中发挥了重要作用:血清胆固醇水平升高,相关氧化应激和全身炎症增加,使骨吸收增加和骨形成减少,从而破坏骨代谢的内在平衡,导致骨质流失^[12-13]。如他汀类药物不仅可以用于降脂,还可用于促进骨生成和抑制溶骨转移,从而起到骨骼保护的作用^[14]。在炎症反应过程中,细胞因子被激活的同时分泌增加,破坏了成骨细胞,促进破骨细胞的分化,因此被认为是炎症相关骨质疏松的介质^[15]。有研究表明,IL-6 多态性与骨密度显著相关,在骨质流失中发挥重要作用^[16-17]。本研究中,GO 细胞成分分析显示骨质疏松铁死亡基因主要存在于细胞-细胞黏附体连接、黏着斑中,这些基因所在细胞成分对基于铁死亡挖掘骨质疏松发病机制及干预治疗可能有帮助,而在分子功能上主要在蛋白结合中发挥作用。研究发现,低血清维生素 D 结合蛋白水平与低骨密度相关,可用于骨质疏松早期检测^[18]。RNA 结合蛋白人抗原 R 可以促进低密度脂蛋白受体相关蛋白 6 的表达,激活下游 Wnt 通路,促进成骨分化,从而缓解骨质疏松的进展^[19]。因此,探讨铁死亡在骨代谢尤其是成骨细胞和破骨细胞中的调节作用或许对于骨质疏松机制的研究具有重要意义。

KEGG 富集分析表明,骨质疏松铁死亡基因在黏着斑中发挥作用,同时也参与了 MAPK、PI3K-Akt、Wnt 等信号通路。研究发现,黏着斑蛋白 Kindlin-2 缺失促进破骨细胞形成,减少成骨细

胞,从而控制骨重塑并调节骨稳态,或可为骨质疏松提供潜在靶点^[20]。研究还发现,黏着斑信号通路是泼尼松龙所致骨质疏松的关键信号通路^[21]。研究发现,Wnt 信号通路与骨代谢密切相关,可促进成骨细胞的增殖分化;Wnt 信号传导还可以调节破骨细胞的分化,Wnt 信号传导增强可抑制破骨细胞分化,反之则诱导破骨细胞分化并促进骨吸收^[22]。因此,Wnt 信号通路或许可以成为骨质疏松新的治疗途径。MAPK 信号通路是巨噬细胞集落刺激因子和 RANKL 在调控破骨细胞增殖分化和骨吸收的必要途径^[23],前者通过 MAPK 信号通路活化调节破骨细胞前体增殖,后者则调节破骨细胞的分化^[24-25]。此外,研究还发现 MAPK 信号通路可以通过炎症反应诱导铁死亡^[26]。益骨汤可以通过 PI3K-Akt 信号通路调控骨髓基质干细胞分化为成骨细胞,从而预防和治疗骨质疏松^[27],但其与其他信号通路之间的相互作用尚未明确。以上结果表明,骨质疏松铁死亡基因能够通过调节成骨细胞和破骨细胞的增殖分化从而影响骨代谢、骨重塑,但其具体机制有待进一步研究。

基于 Spearman 相关性分析和 PPI 网络,本文资料显示骨质疏松铁死亡基因之间关系密切。通过 CytoHubba 插件最终确定了六个骨质疏松中与铁死亡有关的关键基因,包括 *MAPK3*、*CDKN1A*、*MAP1LC3A*、*TNF*、*RELA* 和 *TGF- β 1*。ROC 曲线结果显示,这六个铁死亡相关关键基因的 AUC 均大于 0.50,在骨质疏松标本中具有较高的诊断价值,其中 *RELA* 的诊断价值最高(AUC=1.00)。因此,上述六个关键基因有望成为骨质疏松潜在生物标志物。qRT-PCR 法结果也显示了六个关键基因在对照组与实验组中具有显著差异。*MAPK3* 也称为 ERK1,是 MAPK 信号通路中的关键靶点之一,能够正向调节破骨细胞分化和骨吸收,表明了 *MAPK3* 靶向治疗骨质疏松的潜力^[28]。*CDKN1A* 调控的基因主要参与破骨细胞分化的上游调节因子,通过调节破骨细胞分化参与骨质疏松的发病机制,并提出将 *CDKN1A* 作为骨质疏松发病的早期预警信号,可以针对该指标设计治疗方法,从而提高对骨质疏松分子发病机制的理解,以便早期诊断甚至缓解^[29]。*MAP1LC3A* 是 *MAP1LC3* 的两种形式之一,可以通过诱导自噬影响骨稳态,调节成骨细胞和破骨细胞等^[30],并且

自噬功能障碍或可导致骨质疏松的发生和加剧^[31-32]。TNF是一种炎症细胞因子,会导致多种炎症相关疾病,其通过对成骨细胞和破骨细胞的影响参与骨重塑的重要过程,直接激活破骨细胞前体或通过诱导成骨细胞产生NF- κ B配体的受体-激活剂来增加骨质流失^[33],因此通过抗TNF治疗或许可以改善骨质疏松患者的骨密度,延缓其进展。NF- κ B是TNF信号通路的靶点之一,可以通过介导炎症调节骨重塑^[34],而RELA是NF- κ B p65亚基,能够调节炎症反应,对于破骨细胞至关重要,能够阻断RANKL诱导的凋亡JNK-Bid信号通路,从而促进破骨细胞的分化^[35],这说明RELA信号通路是治疗骨质疏松表型的关键靶点。TGF- β 广泛存在于骨组织中,在骨骼重塑中起着重要作用,参与成骨细胞和破骨细胞的调节,促进骨形成^[36],抑制骨吸收^[37];参与软骨发育的过程,促进软骨细胞分化并维持关节软骨的完整性^[38-39]。TGF- β 1是TGF- β 的亚型,主要存在于骨骼中,由成骨细胞产生,是骨质疏松研究的热门基因。一方面,TGF- β 1促进前成骨细胞的增殖分化并诱导成骨细胞的成熟^[40];另一方面,TGF- β 1因其浓度的不同而对破骨细胞产生截然不同的影响,低浓度TGF- β 1可促进破骨细胞成熟,而高浓度则抑制破骨细胞的成熟^[41-42]。TGF- β 1可以通过诱导间充质祖细胞中TRAF3的降解减少成骨细胞分化及增加破骨细胞形成^[43]。此外,有学者发现TGF- β 1信号通路可能是天癸散治疗绝经后骨质疏松的靶点^[44]。相关研究表明,TGF- β 1可以通过独立于RANKL、TRAF6和NF- κ B的机制增强TNF- α 诱导的破骨细胞形成^[45],然而其他分子之间是否相互联系从而影响骨重塑目前未见报道,因此进一步研究其分子关系是有必要的,或可为骨质疏松提供新的治疗思路和方法。

综上,本研究利用生物信息学手段探究骨质疏松铁死亡有关作用机制,发现铁死亡可以通过调节成骨细胞和破骨细胞等的增殖分化而影响骨稳态和骨密度,也可能与MAPK、PI3K-Akt、Wnt信号通路等有关。本研究通过生物信息学和qRT-PCR法证实MAPK3、CDKN1A、MAP1LC3A、TNF、RELA、TGF- β 1可作为骨质疏松铁死亡的生物标志物,为骨质疏松的治疗提供了新的思路和方向。同时,这些差异标志物可能独立存在,也可能互相联系而影响骨重塑。由于GEO数据库中

有关骨质疏松的样本数有限,本研究的结果可能与实际情况存在一定的偏差,需要进一步临床验证。

本文附表、附图见电子版。



致谢 研究得到武汉市卫健委青年项目(WX21Q9, WZ22Q37)支持

Acknowledgements This work was supported by the Youth Project of Wuhan Municipal Health Commission (WX21Q9, WZ22Q37)

医学伦理 研究符合1964年《赫尔辛基宣言》及之后的修正版或类似的伦理标准,通过武汉市第一医院医学伦理委员会审查(武卫一院伦审[2022]43号),所有患者均签署知情同意书

Ethical Approval All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of Wuhan First Hospital (Wuwei First Hospital Ethical Approval [2022] 43) and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards. All included patients signed an informed consent form

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

Conflict of Interests The authors declare that there is no conflict of interests

©The author(s) 2024. This is an open access article under the CC BY-NC-ND 4.0 license (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)

参考文献(References)

- [1] WU D, CLINE-SMITH A, SHASHKOVA E, et al. T-cell mediated inflammation in postmenopausal osteoporosis [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 687551.
- [2] LI J, CAO F, YIN H L, et al. Ferroptosis: past, present and future[J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(2): 88.
- [3] YAN C, ZHANG J, AN F, et al. Research progress of ferroptosis regulatory network and bone remodeling in osteoporosis[J]. *Front Public Health*, 2022, 10: 910675.
- [4] CHENG Q, ZHANG X, JIANG J, et al. Postmenopausal iron overload exacerbated bone loss by promoting the degradation of type I collagen[J]. *Biomed Res Int*, 2017, 2017: 1345193.
- [5] CERVELLATI C, BONACCORSI G, CREMONINI E, et al. Oxidative stress and bone resorption interplay as a possible trigger for postmenopausal osteoporosis[J].

- Biomed Res Int**, 2014, 2014: 569563.
- [6] BENISCH P, SCHILLING T, KLEIN-HITPASS L, et al. The transcriptional profile of mesenchymal stem cell populations in primary osteoporosis is distinct and shows overexpression of osteogenic inhibitors[J/OL]. **PLoS One**, 2012, 7(9): e45142.
- [7] WANG B, GONG S, HAN L, et al. Knockdown of HDAC9 inhibits osteogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells partially by suppressing the MAPK signaling pathway[J]. **Clin Interv Aging**, 2022, 17: 777-787.
- [8] LIU P, WANG W, LI Z, et al. Ferroptosis: a new regulatory mechanism in osteoporosis[J]. **Oxid Med Cell Longev**, 2022, 2022: 2634431.
- [9] NI S, YUAN Y, QIAN Z, et al. Hypoxia inhibits RANKL-induced ferritinophagy and protects osteoclasts from ferroptosis[J]. **Free Radic Biol Med**, 2021, 169: 271-282.
- [10] KIM H, TAKEGAHARA N, WALSH M C, et al. CD44 can compensate for IgSF11 deficiency by associating with the scaffold protein PSD-95 during osteoclast differentiation[J]. **Int J Mol Sci**, 2020, 21(7): 2646.
- [11] KIM H, TAKEGAHARA N, WALSH M C, et al. IgSF11 regulates osteoclast differentiation through association with the scaffold protein PSD-95[J]. **Bone Res**, 2020, 8: 5.
- [12] YOU L, SHENG Z Y, TANG C L, et al. High cholesterol diet increases osteoporosis risk via inhibiting bone formation in rats[J]. **Acta Pharmacol Sin**, 2011, 32(12): 1498-1504.
- [13] ANAGNOSTIS P, FLORENTIN M, LIVADAS S, et al. Bone health in patients with dyslipidemias: an underestimated aspect[J]. **Int J Mol Sci**, 2022, 23(3): 1639.
- [14] WANG B, WANG H, LI Y, et al. Lipid metabolism within the bone micro-environment is closely associated with bone metabolism in physiological and pathophysiological stages[J]. **Lipids Health Dis**, 2022, 21(1): 5.
- [15] YU B, WANG C Y. Osteoporosis and periodontal diseases—an update on their association and mechanistic links[J]. **Periodontol 2000**, 2022, 89(1): 99-113.
- [16] WANG Z, YANG Y, HE M, et al. Association between interleukin-6 gene polymorphisms and bone mineral density: a meta-analysis[J]. **Genet Test Mol Biomarkers**, 2013, 17(12): 898-909.
- [17] NI Y, LI H, ZHANG Y, et al. Association of IL-6 G-174C polymorphism with bone mineral density[J]. **J Bone Miner Metab**, 2014, 32(2): 167-173.
- [18] MARTÍNEZ-AGUILAR M M, APARICIO-BAUTISTA D I, RAMÍREZ-SALAZAR E G, et al. Serum proteomic analysis reveals vitamin D-binding protein (VDBP) as a potential biomarker for low bone mineral density in Mexican postmenopausal women[J]. **Nutrients**, 2019, 11(12): 2853.
- [19] LIU Z, LI B, HU H, et al. Potential of RNA-binding protein human antigen R as a driver of osteogenic differentiation in osteoporosis[J]. **J Orthop Surg Res**, 2022, 17(1): 234.
- [20] CAO H, YAN Q, WANG D, et al. Focal adhesion protein Kindlin-2 regulates bone homeostasis in mice [J]. **Bone Res**, 2020, 8: 2.
- [21] HUO L, WANG L, YANG Z, et al. Prednisolone induces osteoporosis-like phenotypes via focal adhesion signaling pathway in zebrafish larvae[J]. **Biol Open**, 2018, 7(7): bio029405.
- [22] LIU J, XIAO Q, XIAO J, et al. Wnt/ β -catenin signalling: function, biological mechanisms, and therapeutic opportunities[J]. **Signal Transduct Target Ther**, 2022, 7(1): 3.
- [23] BOYLE W J, SIMONET W S, LACEY D L. Osteoclast differentiation and activation[J]. **Nature**, 2003, 423(6937): 337-342.
- [24] ROSS F P. M-CSF, c-Fms, and signaling in osteoclasts and their precursors[J]. **Ann N Y Acad Sci**, 2006, 1068: 110-116.
- [25] WADA T, NAKASHIMA T, HIROSHI N, et al. RANKL-RANK signaling in osteoclastogenesis and bone disease [J]. **Trends Mol Med**, 2006, 12(1): 17-25.
- [26] ZHU K, ZHU X, SUN S, et al. Inhibition of TLR4 prevents hippocampal hypoxic-ischemic injury by regulating ferroptosis in neonatal rats[J]. **Exp Neurol**, 2021, 345: 113828.
- [27] LI N, GONG Y. The mechanism of the Yigutang-mediated PI3K/AKT/GSK-3 β signal pathway to regulate osteogenic differentiation of bone marrow stromal stem cells to treat osteoporosis[J]. **Evid Based Complement Alternat Med**, 2021, 2021: 6699781.
- [28] HE Y, STASER K, RHODES S D, et al. Erk1 positively regulates osteoclast differentiation and bone resorptive activity[J/OL]. **PLoS One**, 2011, 6(9): e24780.
- [29] GUO W, JIN P, LI R, et al. Dynamic network biomarker identifies CDKN1A-mediated bone mineralization in the triggering phase of osteoporosis[J]. **Exp Mol Med**, 2023, 55(1): 81-94.
- [30] GAO M, DU Z, DONG Q, et al. DAPI regulates osteoblast autophagy via the ATG16L1-LC3 axis in Graves' disease-induced osteoporosis[J]. **J Orthop Surg Res**, 2023, 18(1): 711.
- [31] YIN X, ZHOU C, LI J, et al. Autophagy in bone homeostasis and the onset of osteoporosis[J]. **Bone Res**, 2019, 7: 28.
- [32] LI X, XU J, DAI B, et al. Targeting autophagy in osteoporosis: from pathophysiology to potential therapy[J]. **Ageing Res Rev**, 2020, 62: 101098.
- [33] CAETANO-LOPES J, CANHÃO H, FONSECA J E. Osteoimmunology—the hidden immune regulation of bone[J]. **Autoimmun Rev**, 2009, 8(3): 250-255.
- [34] JOSEPHSON A M, LECLERC K, REMARK L H, et al. Systemic NF- κ B-mediated inflammation promotes an aging phenotype in skeletal stem/progenitor cells[J]. **Ageing (Albany NY)**, 2021, 13(10): 13421-13429.

- [35] VAIRA S, ALHAWAGRI M, ANWISYE I, et al. RelA/p65 promotes osteoclast differentiation by blocking a RANKL-induced apoptotic JNK pathway in mice[J]. **J Clin Invest**, 2008, 118(6): 2088-2097.
- [36] JIANG N, XU W, ZHANG Z, et al. Role of TGF- β 1 in fluoride-treated osteoblasts at different stages[J]. **Biol Trace Elem Res**, 2022, 200(2): 740-748.
- [37] LEE B, OH Y, JO S, et al. A dual role of TGF- β in human osteoclast differentiation mediated by Smad1 versus Smad3 signaling[J]. **Immunol Lett**, 2019, 206: 33-40.
- [38] YE W, YANG Z, CAO F, et al. Articular cartilage reconstruction with TGF- β 1-simulating self-assembling peptide hydrogel-based composite scaffold[J]. **Acta Biomater**, 2022, 146: 94-106.
- [39] GAO Y, CHEN N, FU Z, et al. Progress of Wnt signaling pathway in osteoporosis[J]. **Biomolecules**, 2023, 13(3): 483.
- [40] KASSEM M, KVEIBORG M, ERIKSEN E F. Production and action of transforming growth factor-beta in human osteoblast cultures: dependence on cell differentiation and modulation by calcitriol[J]. **Eur J Clin Invest**, 2000, 30(5): 429-437.
- [41] TU M Y, HAN K Y, LAN Y W, et al. Association of TGF- β 1 and IL-10 gene polymorphisms with osteoporosis in a study of Taiwanese osteoporotic patients[J]. **Genes (Basel)**, 2021, 12(6): 930.
- [42] DIEUDONNÉ S C, FOO P, VAN ZOELLEN E J, et al. Inhibiting and stimulating effects of TGF-beta 1 on osteoclastic bone resorption in fetal mouse bone organ cultures[J]. **J Bone Miner Res**, 1991, 6(5): 479-487.
- [43] LI J, AYOUB A, XIU Y, et al. TGF β -induced degradation of TRAF3 in mesenchymal progenitor cells causes age-related osteoporosis[J]. **Nat Commun**, 2019, 10(1): 2795.
- [44] LIN X S, WANG H Y, ZHANG Z, et al. Effects of acupoint application therapy with TianGui powder on osteoporosis in ovariectomized rats through TGF- β 1 and Smad2/3 signaling pathway[J]. **Orthop Surg**, 2019, 11(1): 143-150.
- [45] YAO Z, GETTING S J, LOCKE I C. Regulation of TNF-induced osteoclast differentiation[J]. **Cells**, 2021, 11(1): 132.

[本文编辑 余方 刘丽娜]

· 学术动态 ·

张龙教授团队发现细胞内乳酸感知蛋白及其机制

2024年9月25日,浙江大学生命科学研究院张龙教授团队在《自然》(*Nature*)发表了最新研究成果论文“AARS1 and AARS2 Sense L-lactate to regulate cGAS as globally lysine lactyltransferases”(DOI:10.1038/s41586-024-07992-y),揭示了丙氨酰-tRNA合酶(AARS)1和AARS2感知L-乳酸并通过乳酸化修饰调控关键免疫蛋白环鸟苷酸-腺苷酸合酶(cGAS)的分子机制,为乳酸堆积与疾病之间的联系提供了全新视角,提示了开发针对乳酸相关疾病治疗策略的新思路。

研究人员通过全基因组CRISPR筛选发现,敲低AARS1或AARS2后,细胞内乳酸化修饰显著下降,验证了这两种酶是乳酸感知和修饰的重要执行者。进一步的结构研究表明,AARS1和AARS2通过结合L-乳酸能够催化不依赖辅酶A的乳酸化反应,这是自酰化修饰发现50多年来首次发现的全新催化模式。

在高乳酸条件下,AARS2直接与免疫“监视器”蛋白cGAS相互作用,导致其氨基端关键赖氨酸(Lys131位点)发生乳酸化修饰。这一修饰显著降低了cGAS与DNA结合的能力,使其无法产生环鸟苷酸-腺苷酸(cGAMP),从而抑制了下游免疫反应。通过与未修饰的cGAS对比,研究人员发现乳酸化的cGAS不仅活性受损,还倾向于形成小且呈凝胶状的液滴,而非具有较高流动性的免疫活性液滴。进一步的小鼠模型研究证实,cGAS的乳酸化显著抑制了免疫监视功能,从而加剧了多种乳酸相关疾病的病情。这一发现揭示了乳酸堆积通过“隐形”免疫监视器的分子机制,为癌症及免疫系统疾病的治疗提供了潜在靶点。

该研究利用遗传密码扩展技术制备了特定位点乳酸化的蛋白质,成功解析了乳酸化修饰对蛋白质功能的影响。这一技术为研究翻译后修饰的功能提供了全新工具,同时为开发特异性靶向AARS1/2的抑制剂以缓解高乳酸血症奠定了基础。

李赫羽博士研究生为论文第一作者。研究获得国家杰出青年科学基金、国家重点研发计划等资助。