

袁发浒,胡松,黄丽霞,等. 基于基因芯片的 TNF- α 诱导骨关节炎细胞模型生物信息学分析 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29 (7): 53-60.

Yuan FH, Hu S, Huang LX, et al. Bioinformatics analysis of TNF- α -induced osteoarthritis cell model through microarray analysis of gene expression profiles [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(7): 53-60.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2019.07.009

基于基因芯片的 TNF- α 诱导骨关节炎细胞模型 生物信息学分析

袁发浒,胡 松*,黄丽霞,黄念芳,宋文剑,孙宾莲*

(江汉大学,武汉 430056)

【摘要】 目的 骨关节炎(osteoarthritis,OA)是最常见的退行性慢性关节疾病,然而其具体的基因机制至今尚不完全清楚,通过基因芯片检测 OA 细胞模型的基因表达谱变化,为深入研究 OA 发病机制提供更多生物学依据。**方法** 胰酶结合胶原酶分离获得小鼠原代软骨细胞,以 50 ng/mL 的肿瘤坏死因子 α (TNF- α)孵育原代软骨细胞 24 h 制备 OA 细胞模型。收获细胞提取总 RNA 用于基因芯片检测,以表达差异倍数(fold change,FC)>2 且 $P<0.01$ 为条件筛选差异表达基因(differentially expressed genes,DEGs),利用生物信息学软件对差异表达结果进行基因功能分类体系(gene ontology,GO)、KEGG 通路注释分析。**结果** 原代软骨细胞经 TNF- α 处理后,共筛选获得 8096 个表达上调 DEG 和 6413 个表达下调 DEG,其中有诸如基质金属蛋白酶、炎性因子、基因凋亡及成骨相关基因等已知的 OA 相关的差异表达基因。此外,还有 *Olfml1* 等 olfactomedin 超家族成员、*Nf1* 等未见报道的与 OA 相关的基因,尤其发现大量细胞色素超家族成员基因的异常表达,提示线粒体相关功能基因及信号途径可能与 OA 进程有重要关联。**结论** 项目从转录组水平整体分析了 TNF- α 诱导的 OA 软骨细胞模型基因表达谱变化,为进一步深入探究 OA 发病机制提供了新思路。

【关键词】 骨关节炎;转录组;软骨细胞;基因芯片;肿瘤坏死因子 α ;小鼠

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2019) 07-0053-08

Bioinformatics analysis of TNF- α -induced osteoarthritis cell model through microarray analysis of gene expression profiles

YUAN Fahu, HU Song*, HUANG Lixia, HUANG Nianfang, SONG Wenjian, SUN Binlian*
(Jiangnan University, Wuhan 430056, China)

【Abstract】 Objective Osteoarthritis (OA) is the most common type of degenerative chronic joint disease, but the exact genetic mechanisms are still unclear. The aim of this study was to analyze the gene expression profile in an OA cell model detected using a gene chip, and to provide a biological basis for the pathogenesis of OA. **Methods** Primary mouse chondrocytes were isolated using trypsin combined with collagenase, and the cells were incubated with 50 ng/mL TNF- α for 24 h. Total RNA was extracted from the harvested cells for gene chip detection to identify differentially expressed genes (DEGs). A fold change (FC) greater than two and $P<0.01$ were the conditions required for each DEG. Biological information software was used to conduct gene ontology (GO) and KEGG pathway annotation analysis of DEGs. **Results**

[基金项目] 湖北省卫生和计划生育委员会基金资助(WJ2017X016);江汉大学高层次人才科研启动项目(06000026)。

[作者简介] 袁发浒(1988—),男,博士研究生,研究方向:感染与免疫。E-mail: yuanfh@jhun.edu.cn

[通信作者] 胡松(1976—),博士,讲师,研究方向:感染与免疫。E-mail: husongjhun@qq.com

孙宾莲(1971—),博士,副教授,研究方向:医学免疫学。E-mail: binlian17@jhun.edu.cn * 共同通信作者

After TNF- α treatment, a total of 8096 up-regulated DEGs and 6413 down-regulated DEGs were identified, including genes that are known to be associated with OA, such as matrix metalloproteinase, inflammatory factors, and apoptosis-related and osteoblast-related genes. In addition, *Olfm1* and other olfactomedin superfamily members, *Nf1* and other previously unreported genes related to OA, were also found. In particular, abnormal expression of a large number of genes related to cytochrome C superfamily members was found, suggesting that mitochondria-related functional genes and signaling pathways may be significantly associated with OA. **Conclusions** The changes in the gene expression profile in a TNF- α induced OA chondrocyte model at the level of the transcriptome are detected in this study, providing new insights into the pathogenesis of OA.

[Keywords] osteoarthritis; transcriptome; chondrocytes; gene chips; tumor necrosis factor- α (TNF- α); mouse

骨关节炎 (osteoarthritis, OA) 是一种常发于老年人的慢性退行性疾病, 日益快速地成为世界人群主要致残因素^[1-2]。据最新数据分析显示, 目前在全球范围内, 六十岁以上的人群中有 18% 的女性及 9.6% 的男性患有症状性的 OA, 其中四分之一的人更是无法进行正常的日常活动^[3]。到 2050 年, 预计将有 1.3 亿人患有 OA, 这将构成巨大的全球性社会负担, 随着我国老龄化进程的加快, OA 患者更是日益增加^[4]。

OA 的病理学因素是多方面的, 具体发病机制尚不清晰, 主要包含软骨下骨的重塑、滑膜炎症和关节软骨的丧失^[5]。软骨细胞是软骨组织的唯一细胞类型, 对维持和重塑软骨结构、保证软骨细胞外基质功能等方面起着至关重要的作用。近年来, 由于软骨细胞凋亡在软骨退化中的作用, 软骨细胞凋亡相关信号通路在 OA 方面的研究日益受到关注, 抑制软骨细胞死亡目前已成为治疗软骨退化的一个潜在治疗靶点。此外炎症细胞因子也被认为是 OA 发生发展中的重要因素, 特别是白介素 1 β (IL-1 β) 和肿瘤坏死因子 α (TNF- α), 他们驱动分解代谢途径, 并使 OA 进展持续下去^[6-8]。

高通量基因表达分析目前已成为研究复杂疾病机制的重要方法, 此外, 高通量基因表达谱分析也有助于发现疾病新的生物标志物, 监测疾病进程及评价药物疗效。目前, 已有应用基因芯片技术分析 OA 患者相关基因表达的研究, 这些研究成果有助于我们理解 OA 进展过程中所涉及的病理机制。然而, 由于病人的个体差异, 如患者的年龄、关节的分层等, 这些因素往往导致研究结果产生一些偏倚。本研究通过培养原代小鼠软骨细胞, 以 TNF- α 刺激建立 OA 细胞模型, 应用小鼠全基因组表达谱芯片分析, 从而识别差异基因表达谱和信号通路, 为全面深入探寻 OA 致病机制, 发现新的 OA 诊断标志物提供更多帮助。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级 KM 小鼠, 体重 20 ~ 22 g, 6 周龄, 性别不限, 来源于华中科技大学实验动物中心 [SCXK (鄂) 2016-0009]。实验于华中科技大学实验动物中心进行 [SYXK (鄂) 2016-0057], 本研究涉及的实验动物的使用及管理经华中科技大学实验动物伦理审查委员会核准, 审批号: 201803170028, 研究按实验动物使用的 3R 原则给予实验动物人道的关怀。

1.2 主要试剂与仪器

重组 TNF- α (西格玛奥德里奇 (上海) 贸易有限公司, 货号: T7539); DMEM 培养基 (赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司, 货号: 11965084); 胎牛血清 (赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司, 货号: 12483020); 胰蛋白酶 (Sigma); II 型胶原酶 (Gibco); TRIzol 试剂 (Invitrogen); PrimeScriptTM RT Reagent 试剂盒 (TaKaRa); SYBR Green qPCR Master Mix 试剂盒 (TaKaRa); 小鼠基因表达微阵列芯片 (Agilent, 型号: G4846 A)。二氧化碳培养箱 (力康生物医疗科技控股集团, 型号: HF100); 体视显微镜 (德国莱卡, 型号: M205); 生物超净台 (北京东联哈尔仪器制造有限公司, 型号: BCN-1360); Stepone Plus 荧光定量 PCR 仪 (ABI)。

1.3 实验方法

1.3.1 小鼠原代软骨细胞分离、培养及处理

小鼠原代软骨细胞于 KM 小鼠膝关节分离培养获得。选取 6 只同窝 SPF 级 KM 小鼠, 参照金旻等^[9]报道的方法分离培养小鼠软骨细胞, 无菌环境下分别剥离新生小鼠双侧膝关节软骨, 剪碎后以 2.5 g/L 胰蛋白酶与 0.1% II 型胶原酶联合消化后离心收集。原代软骨细胞以 1×10^7 cell/cm² 密度接种于 DMEM 培养基 (含 10% 胎牛血清) 置于二氧化碳培养箱中培养, 培养条件为 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂。原代

软骨细胞稳定培养 3 d 后,将其分设为两组,一组为正常对照组(C 组),另一组为 TNF- α 诱导的 OA 模型组(T 组),每组三瓶细胞(分别来源于一只小鼠),OA 模型组以 50 ng/mL 的 TNF- α 孵育 24 h,对照组以等积极 PBS 做相同处理。

1.3.2 RNA 提取

两组细胞经 24 h 处理后,离心除去培养基,经 PBS 漂洗沉淀后立即加入总 RNA 抽提试剂 TRIzol,依照产品说明书操作提取总 RNA,提取所得的 RNA 用超微量分光光度计测定其浓度后,分装于-80℃ 冰箱备用。

1.3.3 微阵列芯片杂交与数据分析

微阵列芯片杂交实验委托于康成生物科技有限公司完成,实验流程参考 Li 等^[10]所述。所用芯片为 Cy3 标记的小鼠全基因组表达谱芯片(Agilent Mouse 4x44 K Gene Expression Microarrays v2)。原始荧光数据利用 Agilent 公司的 Gene Spring 11.0 软件进行均一化处理。以参照组为对照,以表达变化倍数大于 2,P 值小于 0.001 为条件筛选 OA 组差异表达基因(differentially expressed genes, DEGs)。获得的 DEGs 提交至 DAVID 平台(DAVID Functional Annotation Bioinformatics Microarray Analysis, <https://david.ncifcrf.gov/home.jsp>)进行基因功能聚类及通路分析。

1.3.4 荧光定量 PCR 验证

为评估芯片表达谱数据可靠性,从差异表达基因列表中挑选 20 个基因(上调、下调基因各十个)进行荧光定量 PCR 实验验证。软骨细胞总 RNA 用 PrimeScript™ RT Reagent 试剂盒进行提取,采用随机六核苷酸引物合成第一链 cDNA,采用 SYBR Green qPCR Master Mix 试剂盒配置反应体系,于荧光定量 PCR 仪扩增检测基因表达情况。将 *Gapdh* 设置为内参基因,基因相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法进行分析。

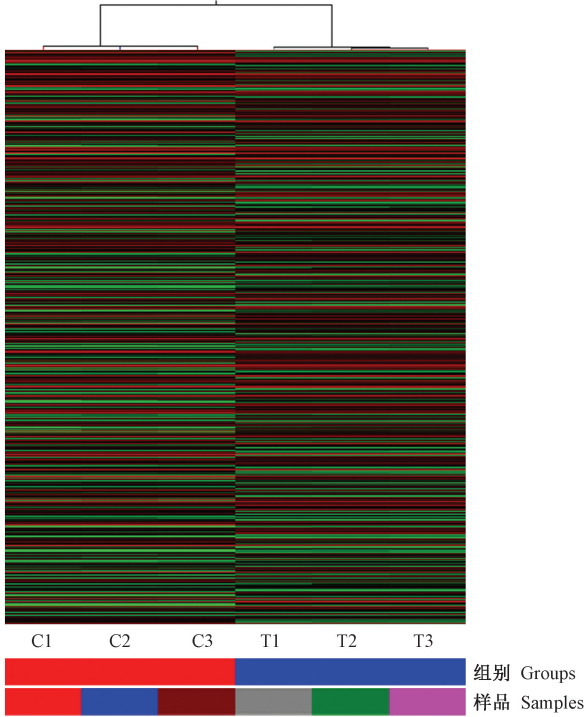
1.4 统计学方法

荧光定量 PCR 以 *Gapdh* 为内参基因,验证的基因相对表达量以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法进行计算比较,相关数据用平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 Graphpad Prism 6.0 统计软件对数据进行分析,两两比较采用 *t*-test,检验水平 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 样本表达量聚类分析

对样本之间进行系统聚类,利用最广泛、最简便的层次聚类法(Hierarchical Clustering),检查不同样品之间同一基因表达的相关性,如果大部分基因的表达量相似,相关系数高,说明数据的均一化程度高。在此,两组样本间(各三个样品)的差异表达基因进行了层次聚类,可见 C 组的三个样品和 T 组的三个样品分别聚类在一起,而两个组别也可区分开来(图 1),说明两组样本的基因表达有一定的差异性。



注:C 组:正常对照组;T 组:TNF- α 诱导的 OA 模型组。下同。

图 1 层次聚类分析热图

Note. Group C, Normal group. Group T, TNF- α -induced OA model group. The same below.

Figure 1 Heat map and supervised hierarchical clustering

2.2 差异表达基因分析

火山图(Volcano Plots)是可视化表达两种不同模式条件的实用工具,它能统一体现组间变化倍数值和 P 值,可直观了解变化幅度和统计显著性之间的关系(考虑了变化幅度和变异性)。同时,基于这些值的基因子集也被分离表现出来。将 C、T 两组的基因表达量做火山图分析,如图 2 所示,纵向的左右两根绿线示意表达差异倍数 2.0,横向的绿线示意 $P<0.05$ 。图中的红点表示 DEG($FC>2.0, P<0.05$),其中有 8096 个表达上调 DEG 和 6413 个表达下调 DEG。

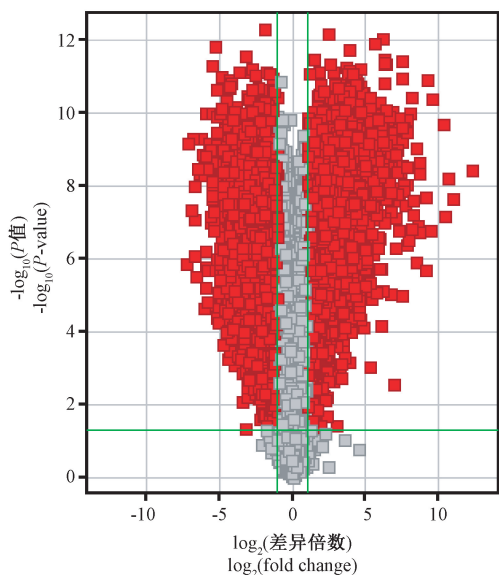


图 2 T 组与 C 组差异表达基因火山图
Figure 2 Volcano plots of differentially expressed genes between the groups C and T

为了获知这些 DEGs 的功能及所在的调控通路,分别将这些上调和下调的 DEGs 提交至 DAVID 在线平台进行功能聚类分析, DAVID 的功能聚类数据库整合了 Gene ontology, Interpro, KEGG 等基因功能数据库,获得的基因注释与功能通路细致、可信度高。相较于正常对照组, TNF- α 诱导处理的 OA 模型组的 DEGs 注释在细胞核、转录调节、细胞分化、ATP 结合、细胞周期、CXC 趋化因子等方面,图 3 详细列出了主要的前 35 个 GO 条目,图 4 列出了包含神经营养因子信号通路、赖氨酸降解、T 细胞受体信号通路、ErbB 信号通路、mTOR 信号通路等前 25 条主要通路。其中下调表达差异最大前 10 个基因分别是 *P2ry1*、*Fjx1*、*Wnk1*、*Tln1*、*Lasp1*、*Pdia4*、*Prm2*、*Olf214*、*Tnfrsf14*、*Spata2*(表 1),而上调表达差异最大前 10 个基因分别是 *Dnahc14*、*Slc4a7*、*Cxcl3*、*Rasgrp1*、*Spata31d1c*、*Zfp866*、*Il1b*、*Nf1*、*Slc7a11*、*Cxcl2*(表 2)。

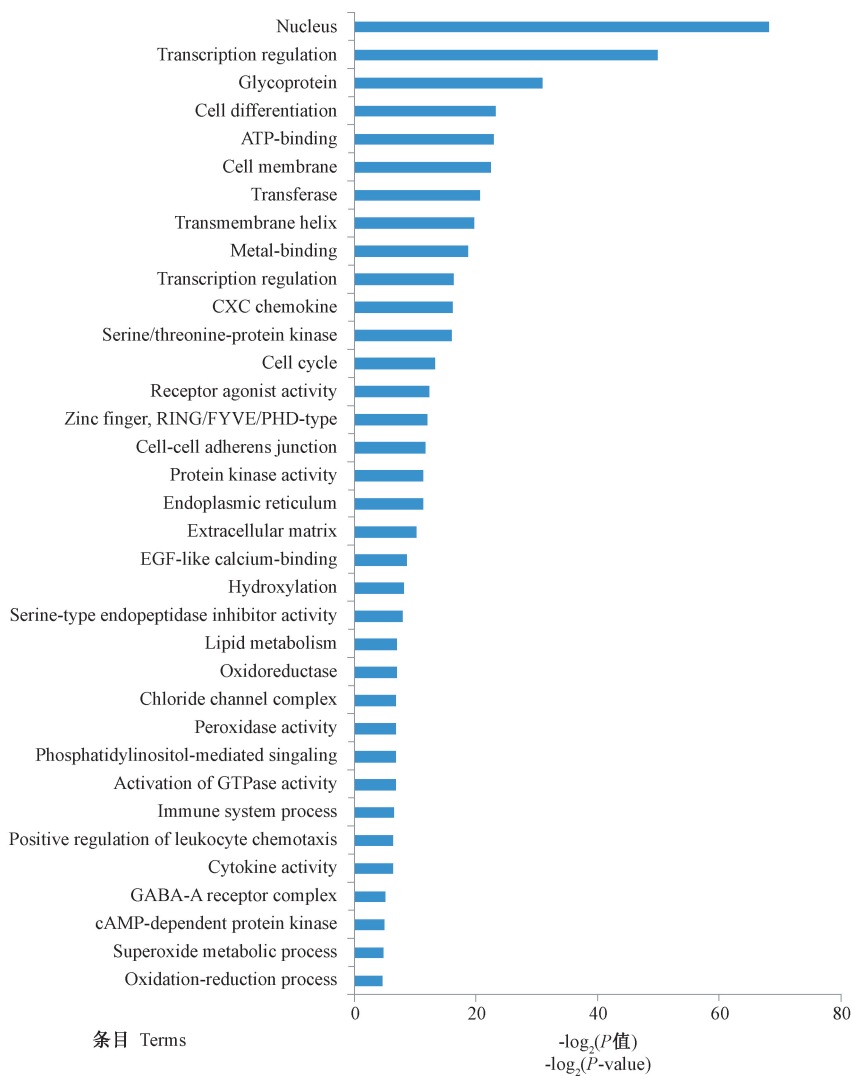


图 3 T 组与 C 组前 35 条差异表达基因分类注释条目

Figure 3 The top 35 GO terms of differentially expressed genes between the groups C and T

对骨关节炎进展相关的基因表达情况进行了整理(表 3),发现免疫调节和促炎类细胞因子相关基因(*Il6*、*Il9*、*Il17a*)显著上调。细胞外基质降解和重塑相关基因(*Mmp3*、*Mmp9*)显著下调。线粒体功能相关基因(*Cyc1*、*Cox3*、*Uqcr10*)表达显著上调。

为评估芯片表达谱数据可靠性,从差异表达基因列表中挑选 20 个基因(上调、下调基因各十个)进行荧光定量 PCR 实验验证。如图 5 所示,可见验证的绝大多数的基因表达情况与芯片数据吻合。

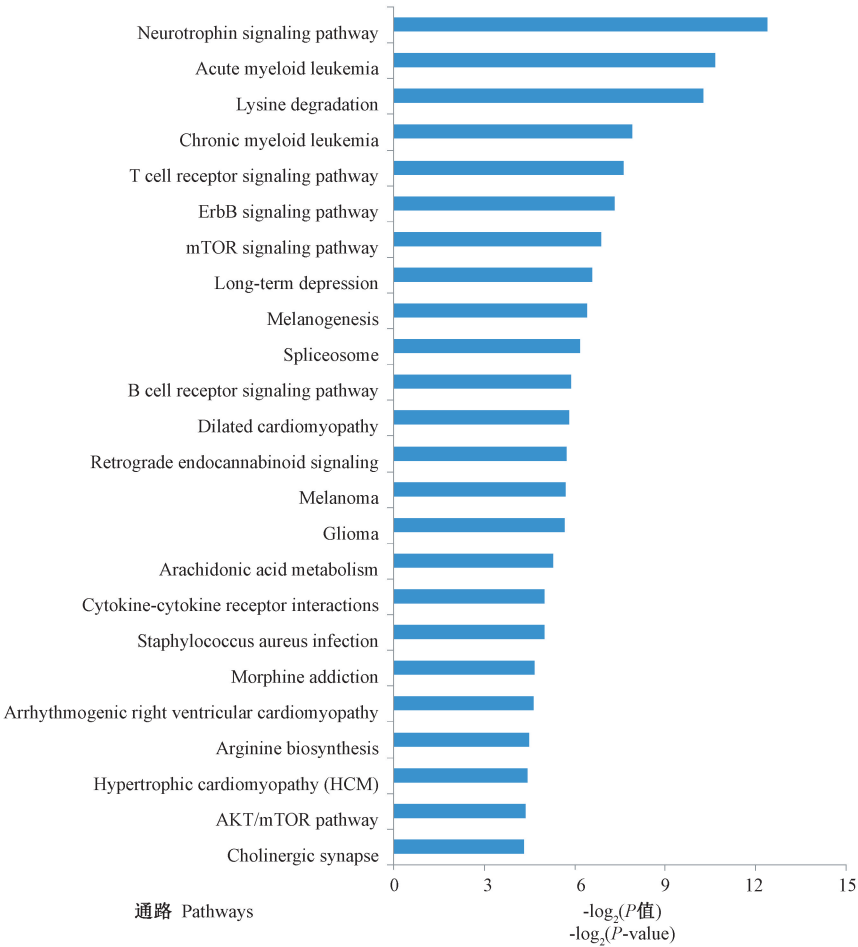


图 4 T 组与 C 组前 25 项差异表达基因 KEGG 注释通路
Figure 4 The top 25 KEGG pathways of differentially expressed genes between the groups C and T

表 1 T 组与 C 组前 10 个表达下调的差异表达基因
Table 1 The top 10 significantly down-regulated genes between the groups C and T

基因库编号 Genbank accession number	基因符号 Gene symbol	基因全称 Gene name	表达差异倍数 Fold change	P 值 P-value
NM_008772	<i>P2ry1</i>	Purinergic receptor P2Y, G-protein coupled 1	850.25	3.75E-09
NM_010218	<i>Fjx1</i>	Four jointed box 1 (Drosophila)	768.73	4.03E-11
NM_198703	<i>Wnk1</i>	WNK lysine deficient protein kinase 1	572.10	2.13E-06
NM_011602	<i>Tln1</i>	Talin 1	563.25	2.17E-08
NM_010688	<i>Laspl</i>	LIM and SH3 protein 1	408.40	1.96E-07
NM_009787	<i>Pdia4</i>	Protein disulfide isomerase associated 4	399.70	2.28E-09
NM_008933	<i>Prm2</i>	Protamine 2	395.35	1.22E-07
NM_146759	<i>Olfir214</i>	Olfactory receptor 214	365.00	9.15E-10
NM_178931	<i>Tnfrsf14</i>	Tumor necrosis factor receptor superfamily, Member 14 (herpesvirus entry mediator)	352.66	1.21E-06
NM_170756	<i>Spata2</i>	Spermatogenesis associated 2	292.84	6.52E-08

表 2 T 组与 C 组前 10 个表达上调的差异表达基因

Table 2 The top 10 most significantly up-regulated genes between the groups C and T

基因库编号 Genbank accession number	基因符号 Gene symbol	基因全称 Gene name	表达差异倍数 Fold change	P 值 P-value
XM_003688772	<i>Dnahc14</i>	Dynein, axonemal, heavy chain 14	120.15	4.75E-08
NM_001033270	<i>Slc4a7</i>	Solute carrier family 4, sodium bicarbonate cotransporter, member 7	111.70	5.35E-10
NM_203320	<i>Cxcl3</i>	Chemokine (C-X-C motif) ligand 3	108.80	1.03E-08
NM_011246	<i>Rasgrp1</i>	RAS guanyl releasing protein 1	106.28	8.59E-08
NM_001083890	<i>Spata31d1c</i>	Spermatogenesis associated 31 subfamily D, member 1C	98.99	3.27E-06
NM_177899	<i>Zfp866</i>	Zinc finger protein 866	93.25	3.61E-09
NM_008361	<i>Il1b</i>	Interleukin 1 beta	86.02	4.60E-09
NM_010897	<i>Nf1</i>	Neurofibromatosis 1	74.97	5.17E-10
NM_011990	<i>Slc7a11</i>	Solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 11	74.16	1.37E-09
NM_009140	<i>Cxcl2</i>	Chemokine (C-X-C motif) ligand 2	68.58	2.42E-05

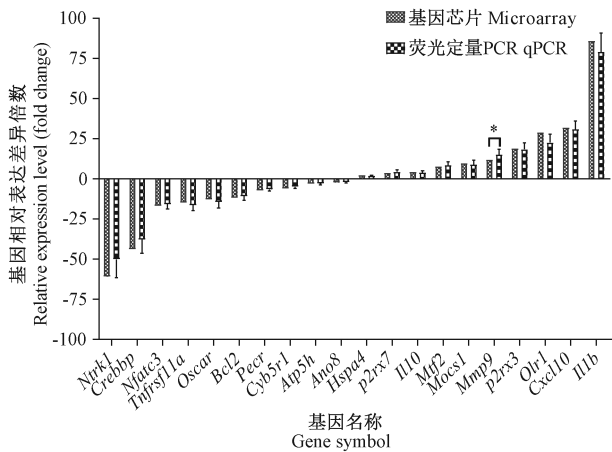
表 3 TNF-α 诱导的 OA 相关基因表达情况

Table 3 TNF-α-induced genes associated with OA in the current study

基因库编号 Genbank accession number	基因符号 Gene symbol	基因全称 Gene name	表达差异倍数 Fold change	P 值 P-value
NM_008372	<i>Il7r</i>	Interleukin 7 receptor	10.25 ↑	3.15E-08
NM_031168	<i>Il6</i>	Interleukin 6	5.59 ↑	7.51E-08
NM_010552	<i>Il17a</i>	Interleukin 17 A	5.41 ↑	1.94E-05
NM_008373	<i>Il9</i>	Interleukin 9	4.72 ↑	1.22E-05
NM_008353	<i>Il12rb1</i>	Interleukin 12 receptor, beta 1	4.66 ↑	5.96E-08
NM_010548	<i>Il10</i>	Interleukin 10	4.46 ↑	5.87E-10
AF235006	<i>Il24</i>	Interleukin 24	3.52 ↑	4.78E-05
NM_010743	<i>Il1r1</i>	Interleukin 1 receptor-like 1	2.87 ↑	7.14E-05
NM_013599	<i>Mmp9</i>	Matrix metalloproteinase 9	12.37 ↑	5.90E-10
NM_008605	<i>Mmp12</i>	Matrix metalloproteinase 12	18.55 ↓	1.05E-06
NM_010809	<i>Mmp3</i>	Matrix metalloproteinase 3	3.10 ↓	9.18E-08
NM_021412	<i>Mmp19</i>	Matrix metalloproteinase 19	2.69 ↓	1.72E-08
NM_032007	<i>Mmp1b</i>	Matrix metalloproteinase 1b (interstitial collagenase)	4.13 ↓	8.27E-07
NM_019471	<i>Mmp10</i>	Matrix metalloproteinase 10	3.50 ↓	2.85E-07
NM_007808	<i>Cycs</i>	Cytochrome c, somatic	2.61 ↑	2.27E-09
NM_025567	<i>Cyc1</i>	Cytochrome c-1	3.10 ↑	1.77E-08
NM_001039049	<i>Cox8c</i>	Cytochrome c oxidase subunit VIIIc	5.44 ↑	3.71E-05
NM_025461	<i>Cox16</i>	Cytochrome c oxidase assembly protein 16	2.84 ↑	1.34E-07
AK131579	<i>Cox3</i>	Cytochrome c oxidase subunit III	9.78 ↑	1.49E-09
NM_009945	<i>Cox7a2</i>	Cytochrome c oxidase subunit VIIa 2	8.54 ↑	3.26E-11
NM_197980	<i>Cox19</i>	Cytochrome c oxidase assembly protein 19	2.57 ↑	9.33E-08
NM_183405	<i>Cox6b2</i>	Cytochrome c oxidase subunit VIb polypeptide 2	8.37 ↑	2.87E-10
NM_199008	<i>Cox11</i>	Cytochrome c oxidase assembly protein 11	2.62 ↑	1.43E-07
NM_007749	<i>Cox7c</i>	Cytochrome c oxidase subunit VIIc	2.40 ↑	4.98E-03
AK165865	<i>COX1</i>	Cytochrome c oxidase subunit I	2.39 ↑	3.27E-07
NM_007749	<i>Cox7c</i>	Cytochrome c oxidase subunit VIIc	16.21 ↑	3.63E-09
NM_001017429	<i>Cox17</i>	Cytochrome c oxidase assembly protein 17	20.97 ↑	9.45E-05
NM_007750	<i>Cox8a</i>	Cytochrome c oxidase subunit VIIIA	2.72 ↑	8.43E-09
NM_025628	<i>Cox6b1</i>	Cytochrome c oxidase, subunit VIb polypeptide 1	6.67 ↑	3.16E-08
NM_053091	<i>Cox4i2</i>	Cytochrome c oxidase subunit IV isoform 2	10.53 ↑	2.45E-09
NM_197979	<i>Uqcrl0</i>	Ubiquinol-cytochrome c reductase, complex III subunit X	4.75 ↑	6.61E-09
NM_001163456	<i>Cox18</i>	Cytochrome c oxidase assembly protein 18	2.73 ↑	3.35E-06

注: ↑表示 T 组与 C 组相比,基因表达上调; ↓表示 T 组与 C 组相比,基因表达下调。

Note. Compared with the group C, ↑ and ↓ indicate up-regulation and down-regulation of gene expression in the group T, respectively.



注:以 *Gapdh* 表达量做内参校正。 *Mmp9* 的基因芯片检测表达量与 qPCR 实验测试表达量相比, * $P<0.05$ (t 检验)。

图 5 基因芯片表达数据的荧光定量 PCR 验证
Note. Normalized using *Gapdh* as an internal control. Microarray data of *Mmp9* compared with qPCR data, * $P<0.05$ (t -test).

Figure 5 Verification of microarray data through qPCR

3 讨论

以往对于 OA 病理机制的研究大多以某几个基因或某条信号通路进行,例如申成凯等^[11]探讨了白介素-1 β 基因与晚期 OA 的关联,张荣凯^[8]等则研究了脂蛋白基因在早期 OA 的表达情况,马春辉等^[12]研究了凋亡基因通路在 OA 的作用,杨占东^[13]等总结了 SREBPs 在调节骨关节炎软骨退变中的作用机制,这些研究对 OA 中某些显著的功能基因进行了深入细致的探讨,但总体而言,这些研究存在一定的片面性,极少有从整体上去挖掘 OA 相关的病理机制的研究, Qing 等学者^[14]曾以瘦素诱导的大鼠 OA 模型进行了表达谱芯片的分析,筛选出了如 *Bcl2l11* 等未被研究过的可能在 OA 起重要作用的基因,极大地丰富了 OA 相关领域的信息。本研究中,首次全面比较了 TNF- α 诱导的 OA 原代软骨细胞模型全基因组表达谱,用荧光定量 PCR 方法对一部分基因的芯片结果进行了验证,一些新的候选基因首次被发现与 OA 的发病机制有关。

最新的一些研究显示白介素 IL-1 和基质金属蛋白酶(MMP)的表达异常在 OA 的发病机理中有重要作用^[15-17]。通过对 GO 和 KEGG 通路分析,证实了这些基因在 OA 发病机制中的重要作用。

IL-1 是 OA 进展过程中软骨退变最重要的因素之一,也是基质稳态病理生理失衡的主要诱发因素。IL-1 还可抑制软骨细胞外基质合成代谢,导致软骨组织^[15]的破坏。本研究中,TNF- α 处理后的软骨细胞 IL-1 α 、IL-1 β (表 2) 和 IL-6、IL-9 和 IL-10 显著升高(表 3),提示 TNF- α 诱导 OA 的分子机制可能涉及炎症因子的调节。其次,基质金属蛋白酶系编码基因的表达(如 MMP-3、9、12)同样由 TNF- α 显著调节(表 3),这进一步提示了 TNF- α 参与 OA 的发病机理。

氧化应激是自由基在机体产生的一种负面作用,是导致衰老和多种疾病的一个重要因素。越来越多的证据表明,线粒体功能障碍和线粒体 DNA 损伤在 OA 的发生发展中起重要作用^[18]。Grishko 等^[19]研究发现 OA 患者软骨细胞中发现了线粒体 DNA 的损伤,活性氧自由基暴露后,线粒体 DNA 修复受阻,软骨细胞凋亡增加。本研究发现,经 TNF- α 诱导后,软骨细胞中涉及线粒体呼吸链相关的基因表达显著上调(表 3),印证了线粒体功能障碍在 OA 中的重要作用。

本研究发现小鼠原代软骨细胞经 TNF- α 处理后,大量细胞色素 C 氧化酶相关基因的表达显著上调(表 3),Wang 等^[20]发现可通过过氧化物酶体增殖激活受体 γ (PPAR γ) 共激活剂 1 α 可逆转 OA 中线粒体功能的衰减,此外,嘌呤受体基因 *P2ry1* 同样异常表达(表 1),这些都提示线粒体功能损伤在 OA 中可能有重要作用。此外,本研究发现一些神经功能相关的基因在本模型中的异常表达,如含嗅质蛋白(olfactomedin)结构域的基因 *Olfml1*、*Olfml3* 及嗅觉受体基因家族(olfactory receptor),神经纤维瘤基因(neurofibromatosis 1, *Nf1*) 都显著上调,这些全新的发现对 OA 中神经相关的病理机制提供了全新的线索。

综上所述,本研究利用小鼠基因表达芯片分析比较了 TNF- α 诱导的 OA 细胞模型基因表达的情况,并鉴定了一些 DEGs 和表达通路。此外,本研究还挖掘了一些新颖的 OA 相关的理论分子机制,后续这些病理假设还需要进一步探讨验证。

参考文献:

[1] Bijlsma JW, Berenbaum F, Lafeber FP. Osteoarthritis: an

- update with relevance for clinical practice [J]. *Lancet*, 2011, 377(9783): 2115–2126.
- [2] Conaghan PG, Porcheret M, Kingsbury SR, et al. Impact and therapy of osteoarthritis: the Arthritis Care OA Nation 2012 survey [J]. *Clin Rheumatol*, 2015, 34(9): 1581–1588.
- [3] Goldring SR. Alterations in periaricular bone and cross talk between subchondral bone and articular cartilage in osteoarthritis [J]. *Ther Adv Musculoskelet Dis*, 2012, 4(4): 249–258.
- [4] Abramson SB, Attur M. Developments in the scientific understanding of osteoarthritis [J]. *Arthritis Res Ther*, 2009, 11(3): 227.
- [5] 范凯健, 吴菁, 王婷玉. 胶原诱导与抗原诱导 C57BL/6 小鼠类风湿关节炎造模的比较研究 [J]. *中国比较医学杂志*, 2018, 28(11): 31–35.
- [6] Edd SN, Giori NJ, Andriacchi TP. The role of inflammation in the initiation of osteoarthritis after meniscal damage [J]. *J Biomech*, 2015, 48(8): 1420–1426.
- [7] 刘利国, 徐超, 伊力哈木·托合提. 自噬基因在骨关节炎软骨细胞凋亡过程中的保护和平衡效应 [J]. *中国组织工程研究*, 2015, 19(20): 3231–3235.
- [8] 张荣凯, 杨禄坤, 黄丽娟, 等. 脂蛋白基因在早期骨关节炎软骨下骨的表达 [J]. *中国骨伤*, 2014, 27(1): 54–57.
- [9] 金旻, 谢杨丽, 黄炜, 等. 原代培养小鼠关节软骨细胞的分化与诱导 [J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2009, 13(41): 8104–8108.
- [10] Li J, Chen X, Gong X, et al. A transcript profiling approach reveals the zinc finger transcription factor ZNF191 is a pleiotropic factor [J]. *BMC Genomics*, 2009, 10(1): 241–241.
- [11] 申成凯, 吕成昱, 王英振, 等. 白介素-1 β 基因多态性与晚期膝骨关节炎易感性的关联性研究 [J]. *中华关节外科杂志(电子版)*, 2013, 7(3): 378–385.
- [12] 张宏, 王旭昀, 郑伟康, 等. 药物治疗膝骨关节炎的研究进展 [J]. *中国医药导报*, 2018, 15(27): 38–41.
- [13] 杨占东, 于红燕, 高吉俊, 等. SREBPs 在调节骨关节炎关节软骨退变中的作用机制研究进展 [J]. *中国比较医学杂志*, 2018, 28(7): 113–117.
- [14] Fan Q, Liu Z, Shen C, et al. Microarray study of gene expression profile to identify new candidate genes involved in the molecular mechanism of leptin-induced knee joint osteoarthritis in rat [J]. *Hereditas*, 2018, 155(1): 4.
- [15] Yamada T, Okuda Y, Takasugi K, et al. Relative serum amyloid A (SAA) values: the influence of SAA1 genotypes and corticosteroid treatment in Japanese patients with rheumatoid arthritis [J]. *Ann Rheum Dis*, 2001, 60(2): 124–127.
- [16] Mustafa Z, Dowling B, Chapman K, et al. Investigating the aspartic acid (D) repeat of asporin as a risk factor for osteoarthritis in a UK Caucasian population [J]. *Arthritis Rheum*, 2005, 52(11): 3502–3506.
- [17] Bamshad M, Wooding S, Salisbury BA, et al. Deconstructing the relationship between genetics and race [J]. *Nat Rev Genet*, 2004, 5(8): 598–609.
- [18] 周巧, 刘健. 骨关节炎氧化应激及干预的研究进展 [J]. *风湿病与关节炎*, 2016, 5(12): 66–69.
- [19] Grishko VI, Ho R, Wilson GL, Pearsall AW 4th. Diminished mitochondrial DNA integrity and repair capacity in OA chondrocytes [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2009, 17(1): 107–113.
- [20] Wang Y, Zhao X, Lotz M, et al. Mitochondrial biogenesis is impaired in osteoarthritis chondrocytes but reversible via peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1 α [J]. *Arthritis Rheumatol*, 2015, 67(8): 2141–2153.

[收稿日期] 2018–12–15