

绝经后骨质疏松症免疫反应相关基因的鉴定及其中药活性成分的筛选

王刚¹, 董柏昶¹, 康伯源¹, 徐西林^{2*}

1. 黑龙江中医药大学, 黑龙江 哈尔滨 150006

2. 黑龙江中医药大学附属第三医院, 黑龙江 哈尔滨 150006

摘要: **目的** 采用生物信息学方法识别绝经后骨质疏松症中免疫反应相关的基因, 并探讨其作用机制和筛选靶向中药活性成分。**方法** 在基因表达数据库(GEO)中检索“postmenopausal osteoporosis”, 下载基因数据集 GSE230665, 通过 R 软件中的“limma”数据包获取差异表达基因, 使用 David 工具对差异基因进行基因本体(GO)功能富集分析并筛选出免疫反应相关的关键基因, 然后对关键基因进行 GO 功能富集分析和京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析。采用 STRING 平台和 Cytoscape 软件建立蛋白相互作用(PPI)网络, 用 MCODE 和 CytoNCA 插件识别重要基因簇模块和核心基因。在 CTD 数据库搜索“postmenopausal osteoporosis”对核心基因进一步筛选并搜索靶向核心基因的中药活性成分, 并在 PubChem 数据库中搜索中药活性成分的 3D 结构, Autodock 4 软件进行分子对接, 以及探索核心基因与绝经后骨质疏松症的相互作用。**结果** 在绝经后骨质疏松症中筛选出 43 个关键基因, GO 富集分析显示主要参与涉及正向调节炎症反应、白细胞介素(IL)-12 的产生、肿瘤坏死因子的产生、细胞迁移和趋化作用等; KEGG 通路主要涉及趋化因子信号通路、磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B (PI3K/Akt) 信号通路、肿瘤坏死因子(TNF)信号通路、核因子- κ B (NF- κ B) 信号通路等。鉴定出 9 个核心基因依次为 *IL-10*、*B2M*、*IL-17A*、*CXCR4*、*TLR4*、*CCR5*、*NOTCH1*、*TLR2*、*SMAD3*。通过验证, 在绝经后骨质疏松症患者中核心基因的表达均上调。核心基因对应的中药活性成分为雌二醇、白藜芦醇、槲皮素、姜黄素、双酚 A 和木黄酮等, 这些中药活性成分可能通过抑制免疫反应来修复绝经后骨质疏松症。**结论** 利用生物信息学筛选出与免疫反应相关的核心基因(*IL-10*、*B2M*、*IL-17A*、*CXCR4*、*TLR4*、*CCR5*、*NOTCH1*、*TLR2*、*SMAD3*) 以及其受靶向调控的主要中药活性成分(雌二醇、白藜芦醇、槲皮素、姜黄素、双酚 A 和木黄酮), 为进一步探索绝经后骨质疏松症的分子发病机制以及新的治疗靶点提供新的理论依据。

关键词: 生物信息学; 绝经后骨质疏松症; 骨免疫学; 核心基因; 雌二醇; 白藜芦醇; 姜黄素; 双酚 A

中图分类号: R285 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2024)04-0839-09

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2024.04.005

Screening of genes related to immune response in postmenopausal osteoporosis and their target herbal components

WANG Gang¹, DONG Bochang¹, KANG Boyuan¹, XU Xilin²

1. Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, Harbin 150006, China

2. The Third Hospital Affiliated to Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, Harbin 150006, China

Abstract: **Objective** To identify genes related to immune response in postmenopausal osteoporosis by bioinformatics, and to investigate the mechanism of their action and screen the active ingredients of targeted traditional Chinese medicines. **Methods** Search for “postmenopausal osteoporosis” in the gene expression database (GEO), download the gene dataset GSE230665, and obtain the differentially expressed genes through the “limma” packet in R software. David tool was used to perform GO functional enrichment analysis for differential genes and screen out key genes related to immune response, and then GO functional enrichment analysis and KEGG pathway enrichment analysis were performed for key genes. STRING platform and Cytoscape software were used to establish protein interaction (PPI) network, and MCODE and CytoNCA plug-ins were used to identify important gene cluster modules and core genes. Search for “postmenopausal osteoporosis” in CTD database to further screen core genes and search for TCM active ingredients

收稿日期: 2023-11-13

基金项目: 国家中医药管理局青年岐黄学者支持项目(国中医药人教发[2020]7号); 黑龙江省重点研发计划(GZ20210136); 黑龙江省中医药科研项目(ZHY2023-099)

作者简介: 王刚, 硕士, 主要研究方向为中医骨伤科学。E-mail: 273868288@qq.com

*通信作者: 徐西林, 主任医师, 博士, 主要研究方向为中西医结合临床。E-mail: eastoph@sina.com

targeting core genes, search for 3D structure of TCM active ingredients in PubChem database, and perform molecular docking with Autodock 4 software. And explore the interaction between core genes and postmenopausal osteoporosis. **Results** 43 Key genes were selected in postmenopausal osteoporosis, and GO enrichment analysis showed that they were mainly involved in the positive regulation of inflammatory response, the production of IL-12, tumor necrosis factor, cell migration and chemotaxis. KEGG pathway mainly involves chemokine signaling pathway, PI3K/Akt signaling pathway, TNF signaling pathway, NF- κ B signaling pathway, etc. 9 Core genes were identified as *IL-10*, *B2M*, *IL-17A*, *CXCR4*, *TLR4*, *CCR5*, *NOTCH1*, *TLR2*, and *SMAD3*. It was verified that the expression of core genes was up-regulated in postmenopausal osteoporosis patients. Estradiol, resveratrol, quercetin, curcumin, bisphenol A, and lignans showed high interaction indices with the core genes, and the active ingredients of these herbal medicines may repair postmenopausal osteoporosis by suppressing the immune response. **Conclusion** Bioinformatics was utilized to screen the core genes associated with immune response (*IL-10*, *B2M*, *IL-17A*, *CXCR4*, *TLR4*, *CCR5*, *NOTCH1*, *TLR2*, *SMAD3*) as well as their main TCM active ingredients (estradiol, resveratrol, quercetin, curcumin, bisphenol A, and lignoflavone) subject to targeted regulation, which will provide a new theoretical basis for further exploring the molecular pathogenesis as well as new therapeutic targets of postmenopausal osteoporosis.

Key words: bioinformatics; postmenopausal osteoporosis; bone immunology; core genes; estradiol; resveratrol; curcumin, bisphenol A

绝经后骨质疏松症是女性绝经后由于雌激素的中断加速骨的丢失,是一种常见的、难治性的代谢性骨病。具有疼痛、脊柱变形、骨折以及对患者产生不良的心理状态^[1]。根据我国骨质疏松症流行病学调查,在 50 岁以上的人群中,骨质疏松症的患者约为 19.2%,其中女性的患病率可达 32.5%,患病率是男性的 5 倍^[2]。在骨免疫学领域认为免疫细胞与成骨细胞、破骨细胞均来源于骨髓,因此在生理病理状态下,免疫细胞与骨细胞相互影响。绝经后女性体内雌激素含量减少导致机体处于长期低水平炎症状态,这时机体内免疫细胞可以通过信号转导通路调节各种免疫细胞和免疫因子,因而骨细胞生物学功能发生改变,进一步导致骨代谢平衡发生改变^[3]。绝经后女性的 Th 细胞通过分泌大量的白细胞介素 (IL) -17 和肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 参与核因子- κ B 受体活化因子 (RANK) 的信号转导,并且调节破骨细胞的分化^[4]。同时,女性绝经后,肠道菌群的数量、分布会发生显著改变,影响免疫调节功能,导致骨矿物质的丢失^[5-6]。CD4⁺T 细胞中的 Treg 细胞,对 Th1、Th2 和 Th17 细胞的分化和功能具有抑制作用,同时可以分泌转化生长因子 (TGF) - β 1 和抗炎因子 IL-4、IL-10,抑制了破骨细胞的增殖分化^[7-8]。而 Th17 细胞所分泌的 RANKL、IL-17、TNF- α ,对破骨细胞的生成具有激活作用^[4]。因此,在绝经后骨质疏松症中免疫调节在骨代谢平衡中起到了关键作用。

抑制免疫反应在绝经后骨质疏松症的防治过程中起着重要的作用。研究表明,肠道菌群中的长双歧杆菌可通过 Breg - Treg - Th17 细胞轴增加抗炎

细胞因子 (IL-10、IFN- γ) 的水平,并降低促炎因子 (IL-6、IL-17、TNF- α) 的表达,发挥抑制免疫反应以达到防治绝经后骨质疏松^[9]; Resolvins 来源 Omega-3 脂肪酸,可通过下调炎症细胞因子的释放和抑制炎症损伤部位中性粒细胞的募集来消除炎症反应,以达到减少破骨细胞生成的目的,作为骨质疏松症的新型治疗方法^[10]。本研究旨在阐明免疫反应促进绝经后骨质疏松症发生发展的分子机制,并探索绝经后骨质疏松症免疫反应相关基因的生物學功能和信号通路以及靶向中药活性成分的筛选,为靶向抑制免疫反应和探究治疗绝经后骨质疏松症潜在药物提供新思路。

1 材料与方法

1.1 绝经后骨质疏松症差异表达基因 (DEGs) 的筛选

在 GEO 和 Gene Cards 数据库搜索“postmenopausal osteoporosis”获得 GSE230665 数据集和 2 123 个基因。GSE230665 包括 3 个对照组和 12 个绝经后骨质疏松症组,其中这 15 个样本来源于股骨的骨组织;通过 R 软件中的“limma”数据包筛选 DEGs。限定标准为 $P < 0.05$ 和 $|\log_2FC| > 1$ 筛选出 DEGs。并构建 DEGs 的火山图进行可视化分析。

1.2 免疫反应相关的关键基因的筛选

将 GSE230665 的 DEGs 和 Gene Cards 数据集导入 Venny 2.1 软件,获得 2 个数据集公共基因。将 604 个公共基因输入 David 工具,依次选择“Gene_Ontology”“GOTERM_BP_DIRECT”,在表格中查看富集在“immune response”条目的基因,并将这些基因定义为免疫反应相关的关键基因。

1.3 关键基因的基因本体 (GO) 和京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 富集分析

将筛选出的关键基因输入 David 工具获取 GO 和 KEGG 通路相关分析。其中 GO 功能富集分析包括生物学过程 (BP)、分子功能 (MF) 和细胞组分 (CC) 3 个部分。

1.4 关键基因的蛋白相互作用 (PPI) 网络构建与核心基因筛选。

利用 STRING 平台和 Cytoscape 3.9.1 软件对关键基因进行 PPI 网络构建。并在 Cytoscape 3.9.1 软件上使用 CytoNCA 插件获取核心基因, 将前 10 个基因定义为核心基因, 并使用 MCODE 插件对关键基因进行聚类分析。

1.5 鉴定与绝经后骨质疏松症相关的核心基因

在 GSE230665 数据集中找到核心基因, 利用热图观察核心基因的表达。并用 CTD 数据库的“疾病-基因”中搜索“postmenopausal osteoporosis”, 得到与绝经后骨质疏松症相关基因, 然后与前 10 位核心基因取交集, 进一步证实绝经后骨质疏松症与核心基因相互作用, 并剔除与绝经后骨质疏松症无关的核心基因。

1.6 核心基因对应中药活性成分的筛选

在 CTD 数据库中搜索“postmenopausal osteoporosis”, 并在“Chemical-Genes Interaction”模块中分别搜索核心基因对应的中药活性成分, 并筛选出靶向作用于各核心基因的前 6 位中药活性成分 (不足 6 个按实际筛选的结果)。

1.7 分子对接

在 PubChem 数据库中搜索与核心基因相互作用指数较高的中药活性成分的 3D 结构 (PDB 格式), 在 Uniprot 数据库输入核心基因找到对应的 Uniprot ID, 然后将 Uniprot ID 输入 PDB 数据库中, 下载对应的靶蛋白 (PDB 格式), 用 PyMol 软件对蛋白进行处理后, 再用 Autodock 4 软件进行分子对接, 最后用 PyMol 软件进行可视化处理。

2 结果

2.1 绝经后骨质疏松症的 DEGs 的确定

在 GEO 数据库搜索“postmenopausal osteoporosis”获得 GSE230665 数据集, 用 R 语言“limma”数据包获得差异表达基因表格, 并以“ $P < 0.05$ ”和“ $|\log_2FC| > 1$ ”筛选出 12 856 个 DEGs, 利用 R 软件中的“ggplot2”构建 DEGs 的火山图, 见图 1。

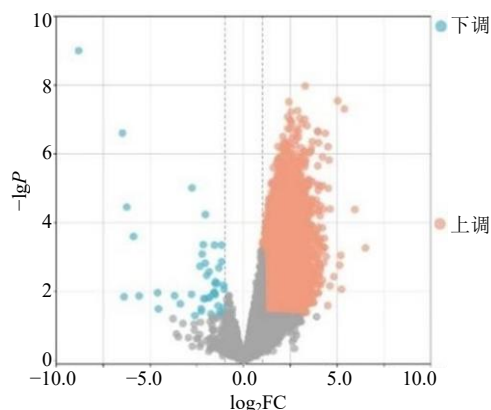


图 1 绝经后骨质疏松症差异表达基因的火山图

Fig. 1 Volcano map of postmenopausal osteoporosis differentially expressed genes

2.2 免疫反应相关的关键基因的确定

将 GSE230665 数据集的 12 856 个 DEGs 与 GeneCards 的 2 123 个基因导入 Venny 2.1 软件 (图 2), 获得 604 个公共基因热图。将公共基因输入 David 工具, 发现有前列腺素 E2 受体 EP4 亚型 (PTGER4)、CCAAT/增强子结合蛋白 β (CEBPB)、信号素-7A (SEMA7A)、神经源性基因位点切口同源物蛋白 1 (NOTCH1)、CXC 趋化因子受体 4 型 (CXCR4) 等 43 个关键基因富集在“immune response”条目上, 并且这 43 个基因在绝经后骨质疏松症的表达中均上调 (图 3)。



图 2 公共基因韦恩图

Fig. 2 Venn diagram of public genes

2.3 免疫反应相关的关键基因的 GO 与 KEGG 富集分析

将 43 个关键基因输入 DAVID 工具进行 GO 功能富集和 KEGG 通路相关分析。GO 功能富集分析, 关键基因主要富集在正向调节炎症反应、IL-12 的产生、干扰素- γ 介导的信号通路、细胞迁移、肿瘤坏死因子的产生等 BP; CC 主要涉及细胞膜外侧、细胞表面; MF 主要涉及肽抗原结合、受体结合、细胞因子活性、趋化因子活性、TAP 结合。KEGG 主要

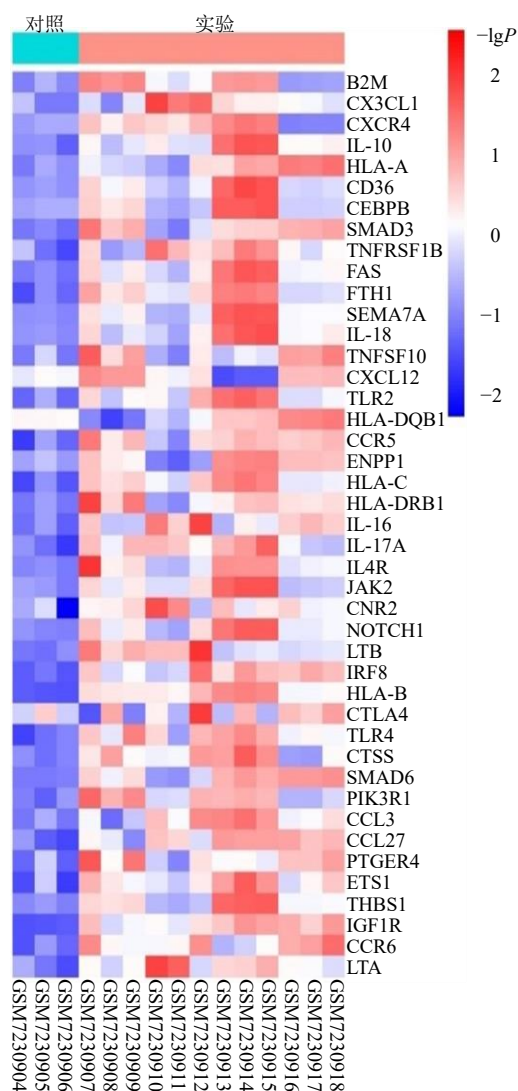


图 3 关键基因表达热图

Fig. 3 Heat map of key gene expression

富集到趋化因子信号通路、磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B (PI3K/Akt) 信号通路、产生 IgA 的肠道免疫网络、TNF 信号通路、细胞黏附分子、核因子- κ B (NF- κ B) 信号通路、TGF- β 信号通路等, 见图 4。

2.4 关键基因 PPI 网络和核心基因的确定

将关键基因导入 STRING 平台进行 PPI 网络可视化分析 (图 5A), 隐藏网络中的断开节点, 获得 40 个节点 313 条边的 PPI 网络, 将 TSV 格式表格导入 Cytoscape, 使用 CytoNCA 插件计算介数中心性 (BC), 节点的大小对应介数中心性的大小。将 BC 评分前 10 位基因确定为核心基因。前 10 个核心基因分别为 *IL-10*、 β 2-微球蛋白 (*B2M*)、*IL-17A*、*CXCR4*、细胞毒性 T 淋巴细胞蛋白 4 (*CTLA4*)、Toll 样受体 4 (*TLR4*)、C-C 趋化因子受体 5 型 (*CCR5*)、

神经源性基因位点切口同源物蛋白 1 (*NOTCH1*)、Toll 样受体 2 (*TLR2*)、SMAD 同源物 3 重组蛋白 (*SMAD3*) 作为绝经后骨质疏松症免疫反应相关的核心基因。且这 10 个核心基因在 DEGs 中表达均上调。对这 10 个核心基因进行 PPI 网络互作 (图 5B), 获得 10 个节点和 40 条边, 平均局部聚类系数为 0.903, PPI 富集: $P < 0.01$ 。核心基因共表达结果显示这 10 个核心基因表达存在一定相关性。在 Cytoscape 软件上使用 MCODE 插件构建关键基因的子网络 2 个。子网络 1 (图 5C) 主要涉及细胞黏附分子、用于产生 IgA 的肠道免疫网络; 子网络 2 (图 5D) 主要涉及趋化因子信号通路、TNF 信号通路、PI3K/Akt 信号通路。对核心基因进行富集通路分析, 其富集结果大多与免疫细胞、炎症反应等通路相关 (图 6)。

2.5 绝经后骨质疏松症免疫反应相关的核心基因的筛选与鉴定

在 GSE230665 数据集中观察筛选出的核心基因的表达水平, 发现 2.4 项下 10 个核心基因的表达均上调, 再使用 CTD 数据库验证核心基因与绝经后骨质疏松症之间的相互作用, 在 CTD 数据库“疾病-基因”搜索“postmenopausal osteoporosis”, 结果显示有 16 710 个基因与绝经后骨质疏松症相关。16 710 个基因和筛选出的 10 个核心基因取交集, 交集结果显示 *IL-10*、*B2M*、*IL-17A*、*CXCR4*、*TLR4*、*CCR5*、*NOTCH1*、*TLR2*、*SMAD3* 这 9 个核心基因与绝经后骨质疏松症的发生发展相关。同时发现 *CTLA4* 不在交集内, 与绝经后骨质疏松症没有相互作用关系, 并剔除 *CTLA4*。因此, 提示上述 9 个核心基因可能是修复绝经后骨质疏松症的重要靶点, 见图 7。

2.6 靶向核心基因的活性成分的筛选

选取 CTD 数据库靶向作用于各核心基因的前 6 个中药活性成分, 见表 1, 其中相互作用数是指证明某个中药活性成分作用于某个基因的论文数。结果显示核心基因对应的中药活性成分为雌二醇、白藜芦醇、槲皮素、姜黄素、双酚 A 和木黄酮等, 提示这些活性成分可能是通过抑制免疫反应来防治绝经后骨质疏松症。

2.7 分子对接

使用 Autodock 4 软件将雌二醇的 3D 结构分别与核心基因 *TLR4*、*SMAD3*、*TLR2*、*IL-10*、*CXCR4*、*B2M*、*NOTCH1*、*IL-17A*、*CCR5* 进行对接 (图 8)。

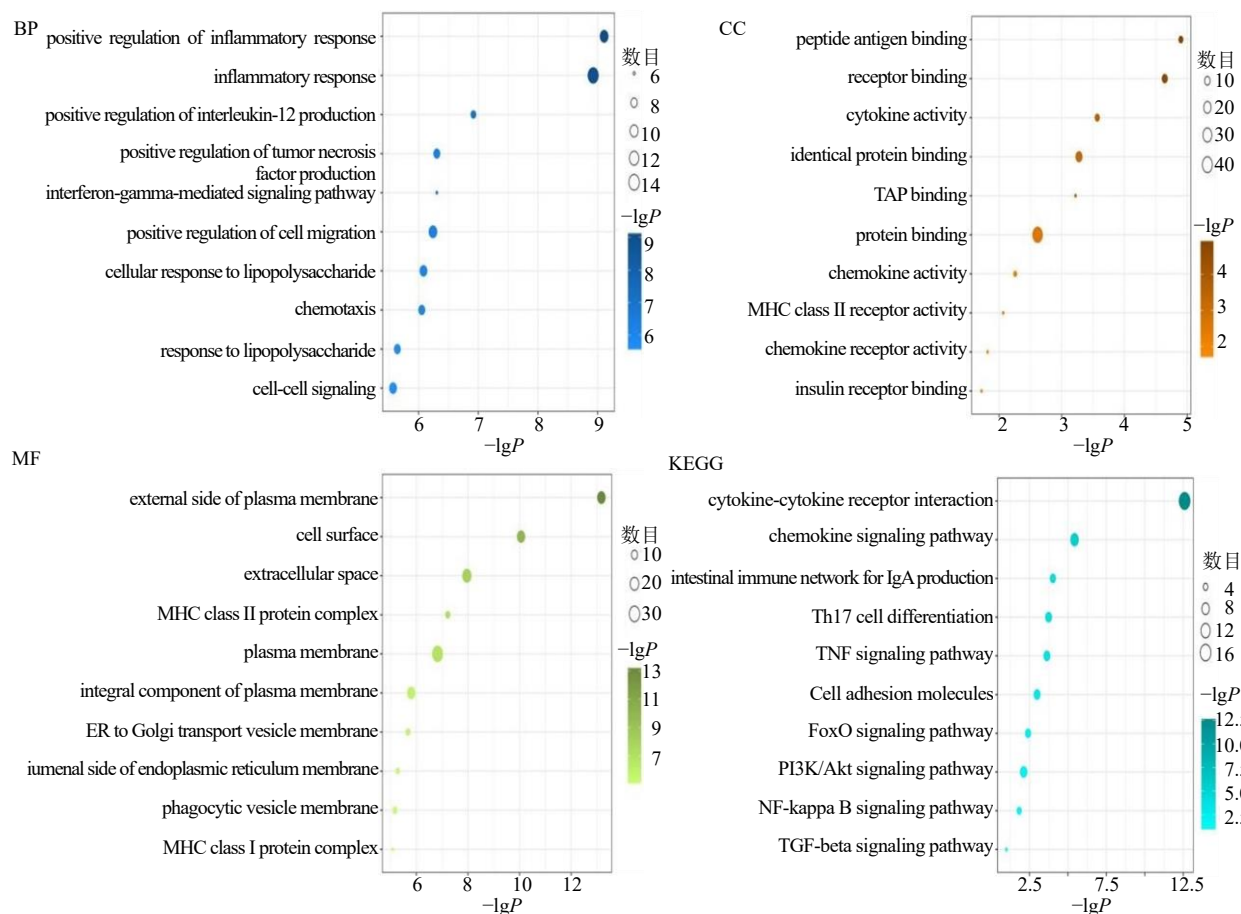


图 4 关键基因的 GO 功能富集分析和 KEGG 通路分析

Fig. 4 GO functional enrichment analysis and KEGG pathway analysis of key genes

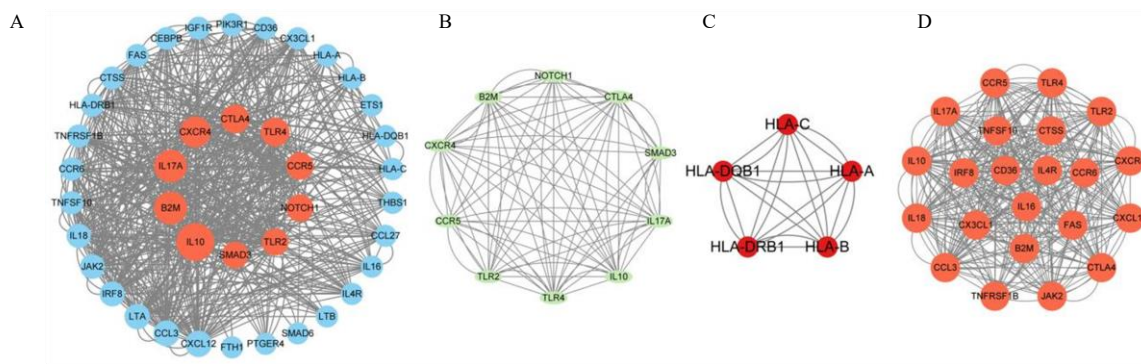


图 5 关键基因的 PPI 网络 (A)、核心基因 PPI 网络 (B)、子网络 1 PPI 网络 (C)、子网络 2 PPI 网络 (D)

Fig. 5 PPI network of key genes (A), and PPI network of core genes (B), PPI network of subnetwork 1 (C), PPI network of subnetwork 2 (D)

对接后发现其结合能分别为-6.79、-6.45、-6.03、-7.67、-6.49 和-6.54、-8.86、-8.51、-6.65 kcal/mol (1 cal=4.2 J), 结合能均小于-6 kcal/mol, 因此, 雌二醇与核心基因结合稳定。雌二醇结构构象稳定, 与各蛋白形成的氢键丰富。如雌二醇通过氨基酸残

基 GLU-230 与 TLR4 形成 1 个氢键; 通过氨基酸残基 GLU-182、ALA-135 和 LYS-140 与 SMAD3 形成 4 个氢键; 通过氨基酸残基 LYS-150 与 TLR2 形成 1 个氢键; 通过氨基酸残基 GLU-154、VAL-165 和 ASP-164 与 IL-10 形成 4 个氢键; 通过氨基酸残基

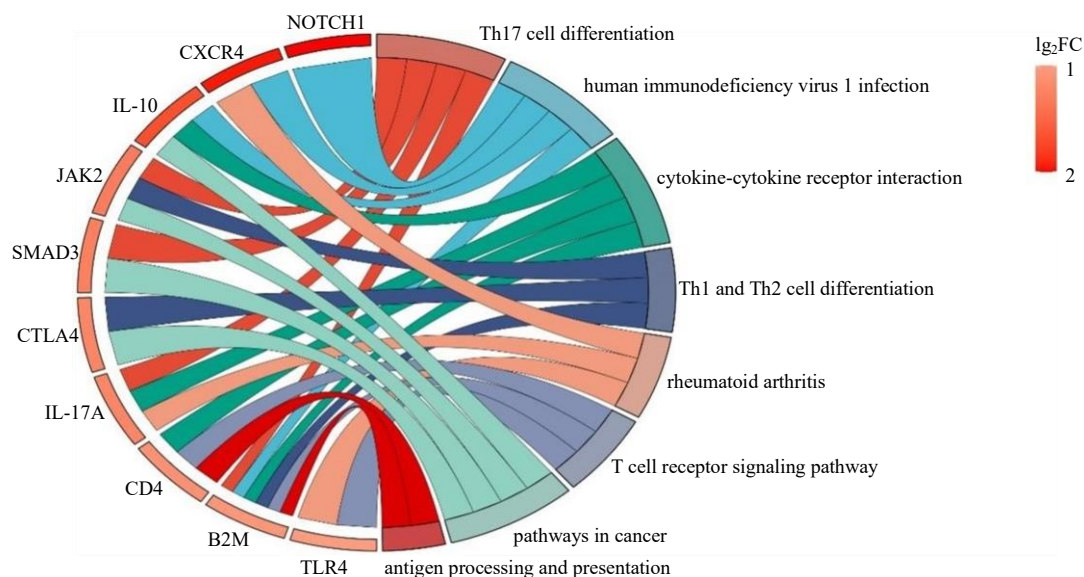


图 6 核心基因富集通路图

Fig. 6 Core gene enrichment pathway map

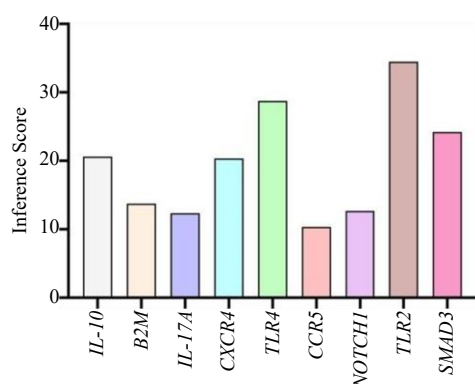


图 7 核心基因与绝经后骨质疏松症的推断分数

Fig. 7 Core gene and postmenopausal osteoporosis inference score

ARG-188 与 CXCR4 形成 1 个氢键；通过氨基酸残基 MET-99、SER-11 与 B2M 形成 2 个氢键；通过氨基酸残基 GLU-47、HIS-58 和 GLU-62 与 NOTCH1 形成 3 个氢键；通过氨基酸残基 GLU-118、SER-64 和 TRY-67 与 IL17A 形成 4 个氢键；通过氨基酸残基 THR-284、GLN-280 与 CCR5 形成 2 个氢键。对接结果显示雌二醇可能通过核心基因对绝经后骨质疏松症发挥修复作用。

3 讨论

绝经后骨质疏松症是老年女性雌激素中断后导致骨量减少、骨的微观结构发生损坏为特征的全身性骨病^[11]。骨免疫学认为免疫微环境参与骨质疏松症的发生、发展，RANK/RANKL/OPG 通路可通过

表 1 核心基因对应的中药活性成分

Table 1 Active ingredients of traditional Chinese medicine corresponding to core genes

基因	化合物	相互作用数	基因	化合物	相互作用数
TLR4	白藜芦醇	29	CXCR4	雌二醇	15
	槲皮素	26		双酚 A	7
	姜黄素	12		辣椒素	4
	氯菊酯	8		白藜芦醇	4
	果糖	6		槲皮素	3
	雌二醇	1		姜黄素	3
SMAD3	双酚 A	12	B2M	双酚 A	10
	雌二醇	11		雌二醇	3
	白藜芦醇	11	NOTCH1	双酚 A	13
	木黄酮	8		雷公藤内酯	13
	槲皮素	7		白藜芦醇	12
	姜黄素	4		乌头碱	10
				雌二醇	6
TLR2	双酚 A	10	IL-17A	槲皮素	5
	白藜芦醇	7		花青素	14
	雌二醇	6		双酚 A	11
	槲皮素	5		白藜芦醇	9
	姜黄素	3		麦冬苷	3
				木黄酮	3
				雌二醇	2
IL-10	双酚 A	37	CCR5	双酚 A	3
	白藜芦醇	35		雌二醇	1
	姜黄素	14		白藜芦醇	1
	辣椒素	9			
	槲皮素	8			
	雌二醇	7			

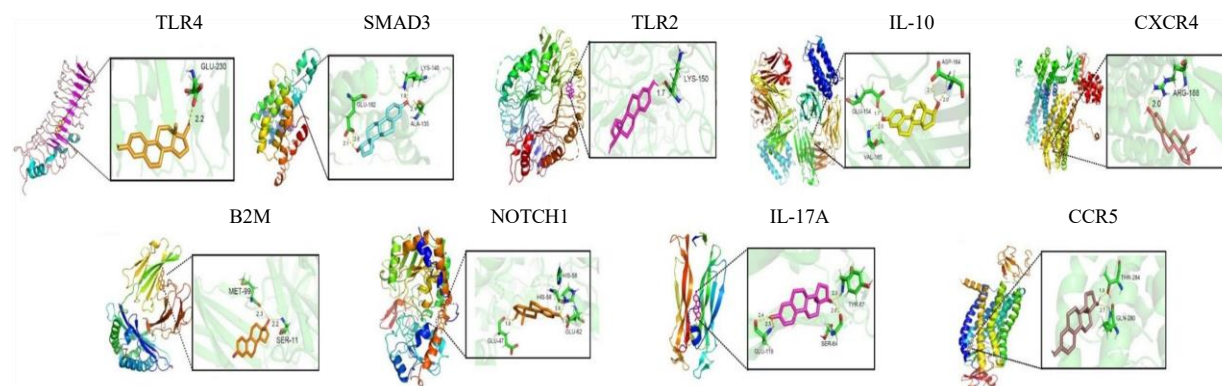


图8 雌二醇与核心基因结合点

Fig. 8 Estradiol binding sites to core genes

免疫细胞、免疫因子和趋化因子对骨代谢进行调控，导致骨量的吸收和形成失去平衡^[12]。因此，在防治绝经后骨质疏松症的过程中不仅要考虑从骨代谢角度考虑，还要从抑制免疫反应角度考虑。绝大多数绝经后骨质疏松症患者通常得不到及时的治疗来预防骨质疏松性骨折的发生，从而使患者的生活质量下降并承担高昂的经济负担，甚至导致高死亡率^[13-15]。因此，寻找绝经后骨质疏松症中与免疫反应相关的基因以及其靶向的中药活性成分是亟待解决的关键问题，为后续从免疫微环境角度出发诊断和修复绝经后骨质疏松症提供更多的机会。

本研究针对绝经后骨质疏松症患者筛选出 604 个 DEGs，对其进行 GO 分析，并筛选出 43 个与免疫反应相关的关键基因，进一步通过 PPI 网络分析以及 CTD 数据库验证筛选出 9 个核心基因，表明所筛选出的核心基因与绝经后骨质疏松症的发生、发展有着密切的关联。

研究结果显示，这些关键基因主要富集于正向调节炎症反应、IL-12 的产生、TNF- α 的产生、细胞迁移和趋化作用等；主要作用于细胞膜外侧、细胞表面和细胞外空间。研究表明绝经后骨质疏松症患者血清炎症细胞因子（TNF- α 、IL-6、IL-12）促进了破骨细胞的增殖，且绝经后骨质疏松症患者在服用重组人甲状旁腺激素联合雌激素后，可有效降低机体炎症反应，提高患者骨密度^[9, 16-17]。KEGG 通路分析结果显示，趋化因子信号通路、PI3K/Akt 信号通路、TNF 信号通路、NF- κ B 信号通路等。Wojdasiewicz 等^[18]发现趋化因子 CX3CL1 可以直接促进破骨细胞分化，同时 CX3CL1 与免疫细胞结合并在骨表面附近产生 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 等炎症细胞因子。Xi 等^[19]证实 PI3K/Akt 通路在维持骨量的

动态平衡发挥着重要作用，可以促进成骨细胞的分化并逆转骨质疏松的发生。Yasuda 等^[20]证实 RANKL/RANK/NF- κ B 通路对破骨细胞的激活起着重要的作用，成骨细胞产生的 RANKL 与破骨细胞表面的 RANK 相结合，并诱导 NF- κ B 活化，进而促进破骨细胞的分化；趋化因子属于免疫调节因子，可将白细胞募集至炎症及损伤部位，对骨的重塑具有重要的影响^[12]。研究结果提示绝经后骨质疏松症的发病与趋化因子信号通路、PI3K/Akt 信号通路、TNF 信号通路、NF- κ B 信号通路等密切相关。

为进一步了解核心基因的生物功能，本研究重点分析了 *TLR4*、*SMAD3*、*TLR2*、*IL-10*、*CXCR4*、*B2M*、*NOTCH1*、*IL-17A*、*CCR5*。这 9 个核心基因可能在 PMOP 的生理病理过程中发挥重要作用。*TLR4*、*TLR2* 属模式识别受体，Toll 受体家族成员。N-Myc 和 STAT 交互子（NMI）和人干扰素诱导蛋白 35（IFP35）可通过 *TLR4* 激活 NF- κ B 通路，从而激活巨噬细胞释放促炎症细胞因子，并且这些炎症细胞因子可反作用于 *TLR4* 炎症通路引发瀑布式炎症级联反应，进而促进破骨细胞的分化，促进绝经后骨质疏松症的发展^[21-22]；MYD88 和 TRAF6 可通过与 *TLR2* 相结合使 NF- κ B 活化，促进细胞因子分泌和炎症反应。并且还可以激活免疫细胞并促进细胞凋亡^[23-24]。*SMAD3* 是细胞内的蛋白，是 TGF- β 和相关蛋白的中心效应器，对伤口愈合和骨折的早期愈合具有抑制作用^[25]；*IL-17A* 具有潜在的强免疫炎症，可激活下游 TRAF6 介导的 NF- κ B 和 MAP 激酶途径，最终导致细胞因子，趋化因子的转录激活^[26]；*CXCR4* 可与细菌脂多糖（LPS）结合介导炎症反应，同时可激活单核细胞分泌 TNF^[27]；*CCR5* 是许多炎症因子的受体，参与 T 淋巴细胞向感染部

位迁移^[28]。B2M 是第一类主要组织相容性复合体 (MHC) 重要组成部分, 参与肽抗原向免疫系统的呈递^[29]。NOTCH1 作为膜结合配体的受体参与胸腺中 CD4 和 CD8 细胞的成熟^[30]。上述 8 个核心基因的功能多参与免疫反应、炎症反应和激活 NF- κ B 通路以促进骨吸收, 抑制骨形成, 促进绝经后骨质疏松症的发生。而 IL-10 可作用多种免疫细胞的免疫调节因子, 具有较强的抗炎作用, 防止炎症反应过度损伤组织^[31]。绝经后骨质疏松症属于慢性炎症性疾病, 因此, 抗炎和促炎细胞因子可同时存在。研究表明^[32], 与健康的同龄人相比, 骨质疏松患者 IL-10 的表达上调, 以抑制炎症细胞因子的产生 (如 IL-17A), 使钙磷代谢达到平衡, 抑制骨的吸收。

通过 CTD 数据库查询各核心基因与绝经后骨质疏松症之间的推断分数, 结果显示 *TLR2*、*TLR4*、*SMAD3*、*IL-10*、*CXCR4*、*B2M*、*NOTCH1*、*IL-17A*、*CCR5* 与绝经后骨质疏松症的推断分数分别为 34.48、28.74、24.23、20.66、20.38、13.75、12.67、12.35、10.31。提示这些基因可能从免疫反应角度出发修复绝经后骨质疏松症。再用 CTD 数据库对核心基因对应的中药活性成分进行筛选, 发现核心基因对应的中药活性成分为雌二醇、白藜芦醇、槲皮素、姜黄素、双酚 A 和木黄酮等, 为后续靶向治疗绝经后骨质疏松症提供新的方向。

分子对接结果显示, 雌二醇与绝经后骨质疏松症中免疫反应相关的核心基因结合稳定。有研究表明, 雌二醇可抑制脂多糖诱导的 RAW264.7 细胞内 TLR4 的表达, 同时雌二醇可抑制 NF- κ B 通路的激活, 从而抑制细胞炎症反应的发生, 对绝经后骨质疏松症起到修复作用^[33]; 姜黄素对氧化应激反应和 FoxO3a 通路有抑制作用并间接抑制解除 Wnt 通路, 以达到改善和延迟绝经后骨质疏松症^[34]; 槲皮素可调节 NF- κ B 受体, 并上调 RANKL/RANK/OPG 信号通路以减少骨的丢失^[34]。与研究筛选结果一致。因此, 本研究所筛选的中药活性成分为后续临床靶向抑制免疫反应以治疗绝经后骨质疏松症的研究提供新思路。

本研究筛选出绝经后骨质疏松症发生发展中与免疫反应相关的核心基因和信号通路, 筛选出 *TLR2*、*TLR4*、*SMAD3*、*IL-10*、*CXCR4*、*B2M*、*NOTCH1*、*IL-17A* 和 *CCR5* 这 9 个核心基因和趋化因子信号通路、PI3K/Akt 信号通路、TNF 信号通路和 NF- κ B 信号通路等, 这些核心基因与通路可能与

绝经后骨质疏松症的发生发展密切相关。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 王真, 王从安, 王永泉, 等. 口服补肾类中成药治疗绝经后骨质疏松症有效性与安全性的网状 Meta 分析 [J]. 中草药, 2022, 53(13): 4084-4099.
- [2] 中华医学会骨质疏松和骨矿盐疾病分会. 中国骨质疏松症流行病学调查及“健康骨骼”专项行动结果发布 [J]. 中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志, 2019, 12(4): 317-318.
- [3] Cline-Smith A, Axelbaum A, Shashkova E, et al. Ovariectomy activates chronic low-grade inflammation mediated by memory T cells, which promotes osteoporosis in mice [J]. *J Bone Miner Res*, 2020, 35(6): 1174-1187.
- [4] Li J Y, D'Amelio P, Robinson J, et al. IL-17A is increased in humans with primary hyperparathyroidism and mediates PTH-induced bone loss in mice [J]. *Cell Metab*, 2015, 22(5): 799-810.
- [5] Li C, Huang Q, Yang R, et al. Gut microbiota composition and bone mineral loss-epidemiologic evidence from individuals in Wuhan, China [J]. *Osteoporos Int*, 2019, 30(5): 1003-1013.
- [6] Li L S, Rao S T, Cheng Y Z, et al. Microbial osteoporosis: The interplay between the gut microbiota and bones via host metabolism and immunity [J]. *Microbiologyopen*, 2019, 8(8): e00810.
- [7] Kim Y G, Lee C K, Nah S S, et al. Human CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells inhibit the differentiation of osteoclasts from peripheral blood mononuclear cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 357(4): 1046-1052.
- [8] Yuan F L, Li X, Lu W G, et al. Regulatory T cells as a potent target for controlling bone loss [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 402(2): 173-176.
- [9] Sapra L, Shokeen N, Porwal K, et al. *Bifidobacterium longum* ameliorates ovariectomy-induced bone loss via enhancing anti-osteoclastogenic and immunomodulatory potential of regulatory B cells (Bregs) [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 875788.
- [10] Ferbeboh M, Vallières F, Benderdour M, et al. The pathophysiology of immunoporosis: Innovative therapeutic targets [J]. *Inflamm Res*, 2021, 70(8): 859-875.
- [11] 马远征, 王以朋, 刘强, 等. 中国老年骨质疏松症诊疗指南(2018) [J]. 中国骨质疏松杂志, 2018, 24(12): 1541-1567.
- [12] 何姣姣, 陈以发, 陈玉林, 等. 绝经后骨质疏松的骨免疫学机制 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2023, 29(7): 1032-1036.
- [13] Xu Q, Li D, Chen J, et al. Crosstalk between the gut

- microbiota and postmenopausal osteoporosis: Mechanisms and applications [J]. *Int Immunopharmacol*, 2022, 110: 108998.
- [14] McCloskey E, Rath J, Heijmans S, *et al*. The osteoporosis treatment gap in patients at risk of fracture in European primary care: A multi-country cross-sectional observational study [J]. *Osteoporos Int*, 2021, 32(2): 251-259.
- [15] Eastell R, Rosen C J, Black D M, *et al*. Pharmacological management of osteoporosis in postmenopausal women: An endocrine society* clinical practice guideline [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2019, 104(5): 1595-1622.
- [16] 彭玉, 梅伟群, 李志琛, 等. 重组人甲状旁腺激素(1-34)联合雌激素对绝经后骨质疏松患者骨代谢和炎症反应的改善效果 [J]. 中国妇幼保健, 2022, 37(20): 3725-3728.
- [17] 孙乃坤. 老年女性骨质疏松患者血清白细胞介素-6、白细胞介素-12、降钙素及雌二醇水平表达及临床意义 [J]. 中国老年学杂志, 2012, 32(12): 2517-2518.
- [18] Wojdasiewicz P, Turczyn P, Dobies-Krzesniak B, *et al*. Role of CX3CL1/CX3CR1 signaling axis activity in osteoporosis [J]. *Mediators Inflamm*, 2019, 2019: 7570452.
- [19] Xi J C, Zang H Y, Guo L X, *et al*. The PI3K/AKT cell signaling pathway is involved in regulation of osteoporosis [J]. *J Recept Signal Transduct Res*, 2015, 35(6): 640-645.
- [20] Yasuda H. Discovery of the RANKL/RANK/OPG system [J]. *J Bone Miner Metab*, 2021, 39(1): 2-11.
- [21] Xiahou Z K, Wang X L, Shen J, *et al*. NMI and IFP35 serve as proinflammatory DAMPs during cellular infection and injury [J]. *Nat Commun*, 2017, 8(1): 950.
- [22] 程鉢冻, 陶雪芬, 赵荣, 等. TLR4/NF- κ B 通路骨质疏松症关系的研究进展 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2023, 29(7): 1037-1042.
- [23] Aliprantis A O, Yang R B, Mark M R, *et al*. Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through toll-like receptor-2 [J]. *Science*, 1999, 285(5428): 736-739.
- [24] Brightbill H D, Libraty D H, Krutzik S R, *et al*. Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors [J]. *Science*, 1999, 285(5428): 732-736.
- [25] Qing J, Zhang Y, Derynck R. Structural and functional characterization of the transforming growth factor-beta-induced Smad3/c-Jun transcriptional cooperativity [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(49): 38802-38812.
- [26] Liu C N, Qian W, Qian Y C, *et al*. Act1, a U-box E3 ubiquitin ligase for IL-17 signaling [J]. *Sci Signal*, 2009, 2(92): ra63.
- [27] Triantafilou K, Triantafilou M, Dedrick R L. A CD14-independent LPS receptor cluster [J]. *Nat Immunol*, 2001, 2(4): 338-345.
- [28] Sharapova T N, Romanova E A, Sashchenko L P, *et al*. Tag7-Mts1 complex induces lymphocytes migration via CCR5 and CXCR3 receptors [J]. *Acta Naturae*, 2018, 10(4): 115-120.
- [29] Sreejit G, Ahmed A, Parveen N, *et al*. The ESAT-6 protein of mycobacterium tuberculosis interacts with beta-2-microglobulin (β 2M) affecting antigen presentation function of macrophage [J]. *PLoS Pathog*, 2014, 10(10): e1004446.
- [30] Brüttsch R, Liebler S S, Wüsthube J, *et al*. Integrin cytoplasmic domain-associated protein-1 attenuates sprouting angiogenesis [J]. *Circ Res*, 2010, 107(5): 592-601.
- [31] Yoon S I, Logsdon N J, Sheikh F, *et al*. Conformational changes mediate interleukin-10 receptor 2 (IL-10R2) binding to IL-10 and assembly of the signaling complex [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(46): 35088-35096.
- [32] Teimourian M, Jafaraiian Z, Hosseini S R, *et al*. Both immune hormone IL-10 and parathormone tend to increase in serum of old osteoporotic people independently of 1, 25 dihydroxy vitamin D3 [J]. *Caspian J Intern Med*, 2016, 7(4): 283-289.
- [33] 余紫薇, 王晓杜, 罗通旺, 等. 17 β -雌二醇抑制 LPS 诱导 Raw264.7 细胞炎症反应及其作用机制 [J]. 中国兽医学报, 2022, 42(4): 756-762.
- [34] 杨青坡, 王法正, 邱红, 等. 姜黄素通过 FoxO3a/Wnt 信号途径抑制去卵巢大鼠骨质疏松的作用研究 [J]. 中国医药科学, 2020, 10(19): 23-27.
- [35] 王龙飞, 高玉海, 谢高倩, 等. 槲皮素改善骨质疏松的作用机制研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2023, 38(3): 714-718.

[责任编辑 高源]