

·论著·

基于生物信息学分析的激素性股骨头坏死 相关核心基因和通路识别

王宽^{1,2}, 茆军^{1,2}, 张立^{1,2}, 邢润麟^{1,2}, 梅伟^{1,2}, 丁亮^{1,2}, 张农山^{1,2}, 王培民^{1,2}

(1.南京中医药大学第一临床医学院, 江苏 南京 210029;

2.江苏省中医院骨科, 江苏 南京 210029)

摘要:目的 对激素性股骨头坏死(SONFH)差异表达基因进行生物信息学分析,确定与SONFH的发生和发展相关的关键致病生物标志物,并预测潜在的SONFH治疗药物。方法 从基因表达总表(GEO)数据库中下载GSE123568表达谱,采用GEO2R在线工具软件分析,获得差异表达基因(DGEs)。通过String数据库构建SONFH差异表达基因蛋白质相互作用(PPI)网络,通过Cytoscape软件cytoHubba插件筛选出核心基因,并进行差异表达基因功能富集分析、通路富集分析和基因富集分析(GSEA),SONFH潜在治疗药物的预测。结果 共筛选出了160个SONFH差异表达基因,在各种关键途径中高度富集,包括红细胞发育、JAK-STAT通路、toll受体通路等。DGIdb数据库中预测了3个潜在治疗药物,分别是甘氨酸、富马酸亚铁、硫酸甘氨酸亚铁。结论 研究确定了10个潜在基因,可能成为早期筛查的重要标志物;甘氨酸、富马酸亚铁、硫酸甘氨酸亚铁是SONFH潜在的治疗药物。

关键词:激素性股骨头坏死;差异表达基因;生物信息学分析

中图分类号:R684

文献标识码:A

DOI:10.3969/j.issn.1006-1959.2021.20.017

文章编号:1006-1959(2021)20-0068-06

Identification of Core Genes and Pathways Related to Steroid-induced Osteonecrosis of the Femoral Head Based on Bioinformatics Analysis

WANG Kuan^{1,2}, MAO Jun^{1,2}, ZHANG Li^{1,2}, XING Run-lin^{1,2}, MEI Wei^{1,2}, DING Liang^{1,2},ZHANG Nong-shan^{1,2}, WANG Pei-min^{1,2}

(1.The First Clinical Medical College of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, Jiangsu, China;

2.Department of Orthopedics, Jiangsu Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210029, Jiangsu, China)

Abstract: Objective Bioinformatics analysis of differentially expressed genes in steroid-induced osteonecrosis of the femoral head (SONFH) was performed to identify key pathogenic biomarkers associated with the occurrence and development of SONFH, and predict potential SONFH therapies. **Methods** The GSE123568 Expression profile was downloaded from the Gene Expression Omnibus (GEO) database, the differentially expressed genes (DGEs) were analyzed using the GEO2R online tool. SONFH differentially expressed gene protein interaction (PPI) network was constructed through String database, core genes were screened through cytoHubba of Cytoscape software. And functional enrichment analysis, pathway enrichment analysis and prediction of SONFH potential therapeutic drugs were performed. **Results** A total of 160 differentially expressed SONFH genes were selected, which were highly enriched in various key pathways, including erythrocyte development, JAK-stat pathway and toll receptor pathway. The DGIdb database was predicted three potential therapeutic agents, namely ferrous glycine, ferrous fumarate, and ferrous glycine sulfate. **Conclusion** The study identified for the first time 10 potential genes that could be important markers for early screening. Glycine, ferrous fumarate and ferrous sulfate are potential therapeutic agents for SONFH.

Key words: Steroid-induced osteonecrosis of the femoral head; Differentially expressed genes; Bioinformatics analysis

激素性股骨头坏死(steroid-induced osteonecrosis of the femoral head, SONFH)是指高剂量激素导致股骨头活性成分死亡的病理过程。SONFH是非侵袭性坏死最常见的原因之一^[1],在没有有效治疗的情况下,80%的患者会在1~3年内出现股骨头塌陷,且难以逆转^[2],大多数患者需要人工关节置换术。SONFH主要发病人群为中青年,但人工关节置换术的长期效果仍难以预测^[3]。因此,SONFH早期阶段的检测、寻找有效的方法就显得尤为重要。然而现有的SONFH生物标志物预测价值有限,迫切需要进一步深入研究SONFH发生发展的分子机制,从而实现SONFH的早发现、早诊断、早治疗,以提高治疗效果,改善患者预后。基因芯片是基于碱基互补

配对原则,利用化学的合成等技术,出现的高通量测序方法^[4]。研究显示^[5],疾病的发生是受特异基因表达量的变化影响,这些基因变化的表达水平与人类正常的表达水平有明显的不同。本研究基于生物信息学提取差异基因,研究其所在通路及参与的生理病理过程,从而发现关键性的致病基因,旨在为SONFH的早期发现和诊断提供方向,预测潜在的SONFH治疗药物,为SONFH的分子发生机制、临床诊断和药物治疗提供参考。

1 资料与方法

1.1 芯片数据的筛选 截止至2020年11月,以“steroid-induced osteonecrosis of the femoral head, homo sapiens”为关键词从公共基因表达总表(Gene Expression Omnibus, GEO)数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)搜索目标基因芯片,经过筛选,最终

作者简介:王宽(1995.8-),男,江苏常州人,硕士研究生,主要从事临床骨科研究

选取 GSE123568 作为本次研究的目标数据基因芯片。GSE123568 共有 40 个样本,由 30 例 SONFH 患者样本和 10 例健康样本组成。

1.2 SONFH 差异表达基因筛选 GEO2R (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/GEO2R/>)是一个基于 R 语言的差异表达基因(DGEs)筛选工具,比较之间的差异。得到差异分析结果。在此结果中筛选差异表达基因,需同时满足以下 2 个条件:①adj.P<0.01;② $|\log_2FC|>5$,即差异倍数(Foldchange)FC>32 或 FC<-32。

1.3 PPI 网络的构建及核心基因的筛选 将潜在靶点导入 STRING 数据库 (<https://string-db.org/cgi/input.pl>)获取蛋白互作网络(PPI),使用 CytoscapeV3.7.0 可视化,并完成拓扑分析。运用 cytoHubba 插件,获取排名前 10 位的核心基因。

1.4 SONFH 差异表达基因富集分析(Gene Set Enrichment Analysis,GSEA)将筛选出的差异表达基因上传至 Metascape 数据库(<https://metascape.org/>),进行 GO 功能富集分析和 KEGG 通路富集分析。GO 分析包括生物学过程、细胞成分、分子功能 3 方面内容,主要对差异表达基因进行生物学过程、细胞成分、分子生物学功能进行分析;KEEG 主要针对差异表达基因的信号通路进行富集分析。

1.5 核心基因生物进程可视化与 GSEA 分析 核心基因的选择以不低于 10 度进行。Cytoscape 的生物网络基因肿瘤学工具(Bingo)插件帮助可视化了核心基因的生物分析过程。同时应用 MSigDB v7.0 进行 GSEA 分析。

1.6 SONFH 潜在治疗药物筛选 药物-基因相互作用数据库(DGIdb,<https://dgidb.org/>)是一个整合了来自组织和展示论文、数据库和网络资源的药物-基

因相互作用和基因可药性信息的数据库。将核心基因列表上传到 DGIdb 数据库,根据得分筛选潜在治疗药物。

2 结果

2.1 SONFH 差异表达基因筛选结果 按照筛选条件,得到 GSE123568 共有的 160 个差异表达基因,其中上调基因 34 个,下调基因 126 个,见图 1。

2.2 SONFH 差异表达基因富集分析 GO 功能富集分析主要分为 BP、CC 和 MF,见图 2。BP 主要包括红细胞发育、辅因子代谢过程、含卟啉化合物的生物合成过程、阳离子稳态等生物学过程。CC 主要有光谱蛋白相关细胞骨架、基底外侧质膜、线粒体基质、真空裂解等细胞成分。MF 主要集中于细胞骨架的结构组成、2 铁-2 硫簇合、驱动蛋白结合、蛋白质同源二聚活性等分子功能。KEGG 通路分析结果见图 3,有助于找出针对差异基因的最明显丰富的途径。特异性信号转导途径主要表现为脂肪酸延长、癌症中的转录失调、醛固酮调节的钠重吸收、卟啉与叶绿素代谢等。

2.3 SONFH 差异表达基因的 PPI 网络构建和核心基因筛选结果 将差异基因提交至 String 平台,得到 PPI 网络,经过 Cytoscape 的 cytoHubba 插件筛选得到 12 个核心基因见表 1,PPI 网络见图 4。

2.4 生物进程可视化与 GSEA 分析 核心差异基因的分析共有 10 个基因,并且度值不低于 10。分析其潜在价值的生物学分析过程见图 5,可见红细胞发育在细胞生物学过程中的重要性。GSEA 结果表明,核心差异基因的异常调节与一些重要的生物学过程有关,包括 JAK-STAT 通路、toll 受体通路、溶酶体、自然杀伤细胞介导的细胞毒性,见图 6。

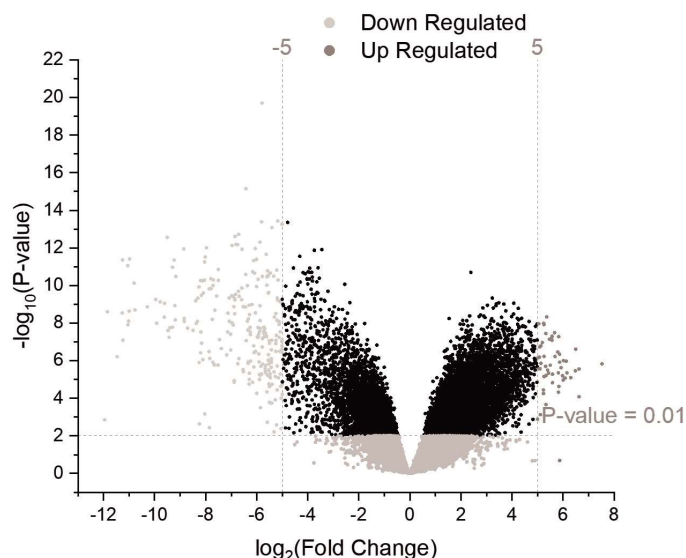


图 1 差异基因火山图

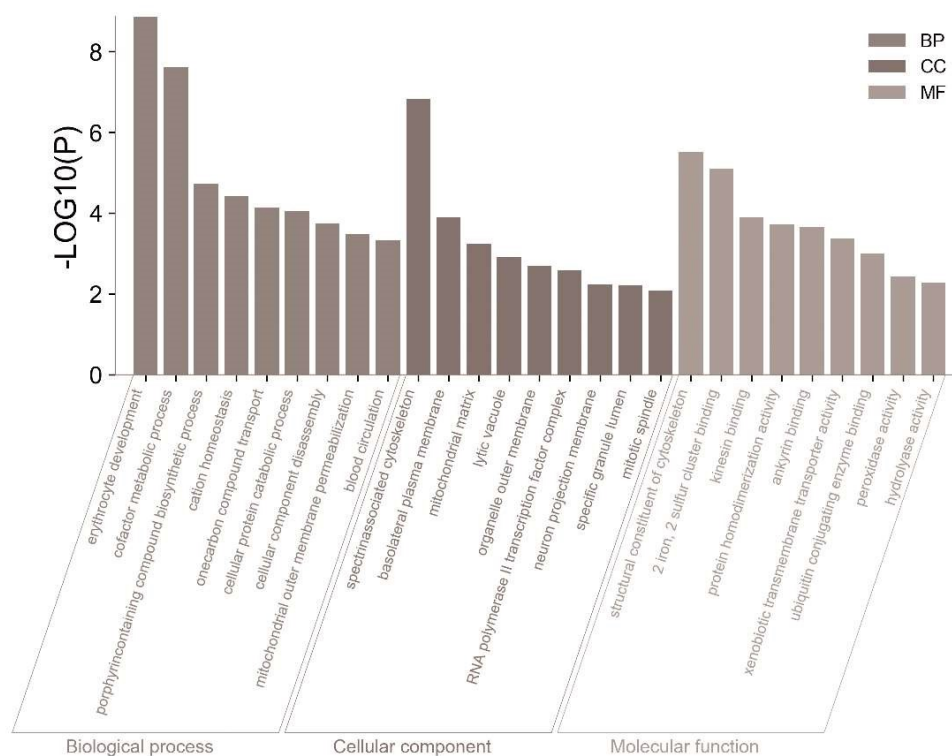


图2 GO 富集分析

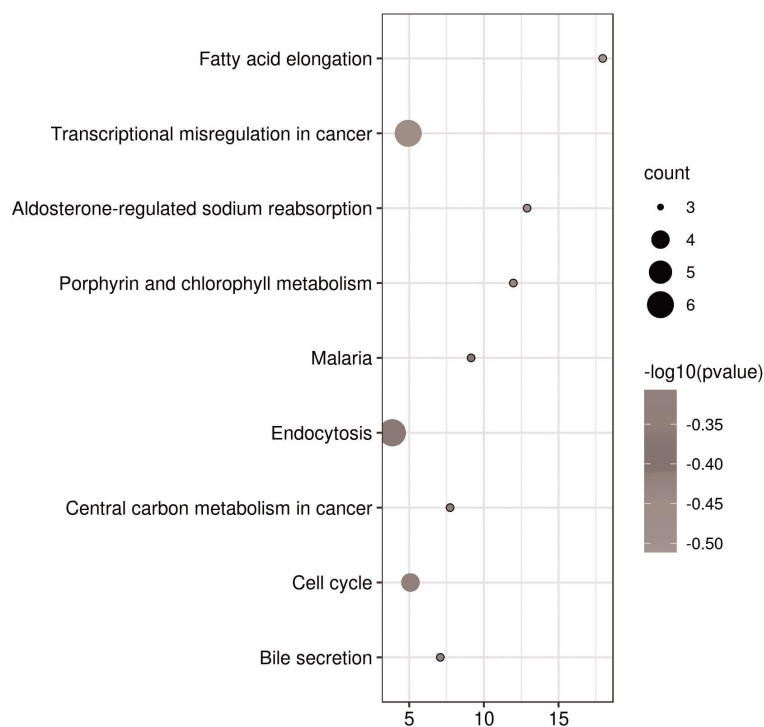


图3 KEGG 富集分析

表1 核心基因

基因	度值	基因	度值
SLC4A1	23	EPB41	13
EPB42	21	KLF1	12
ALAS2	19	RHAG	12
AHSP	14	FECH	11
GYPB	14	SPTA1	11

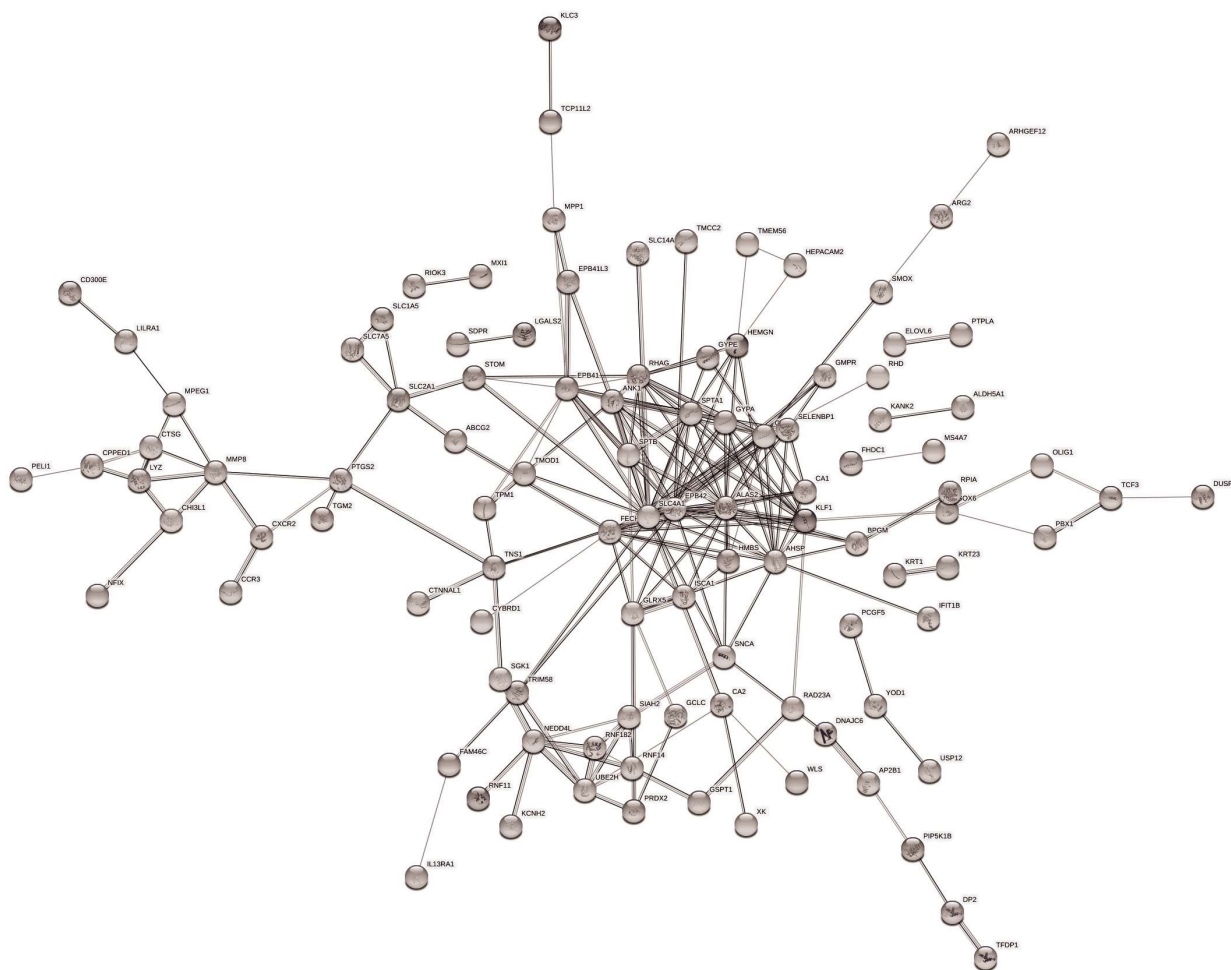
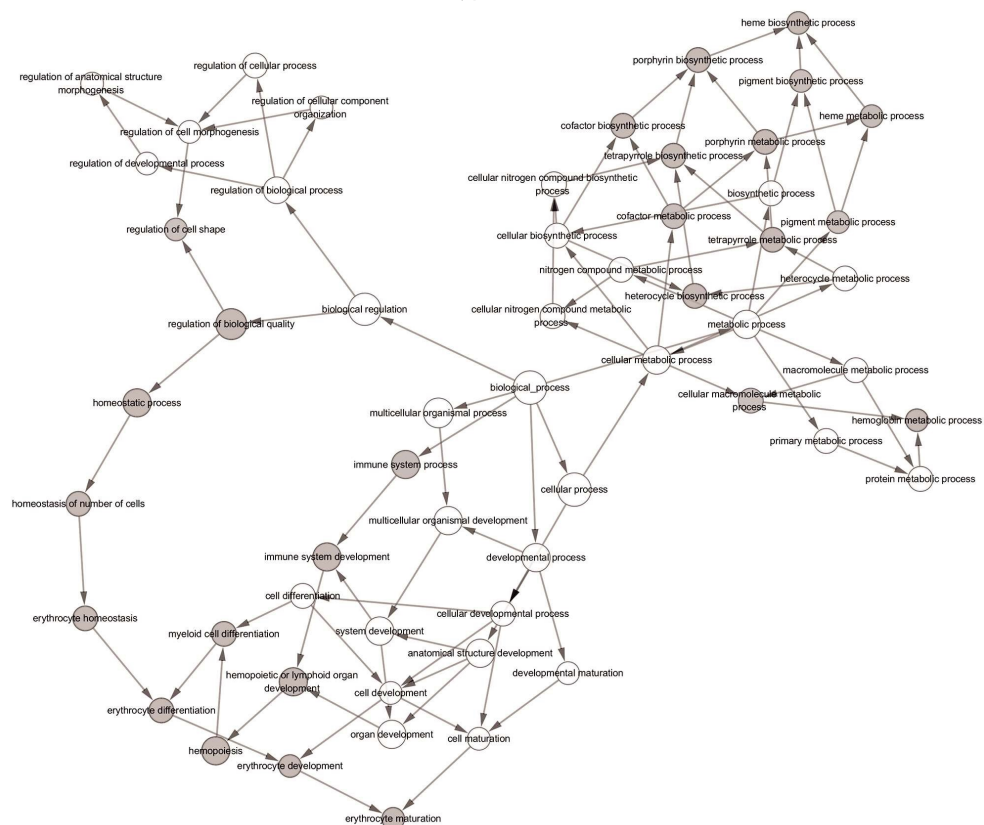
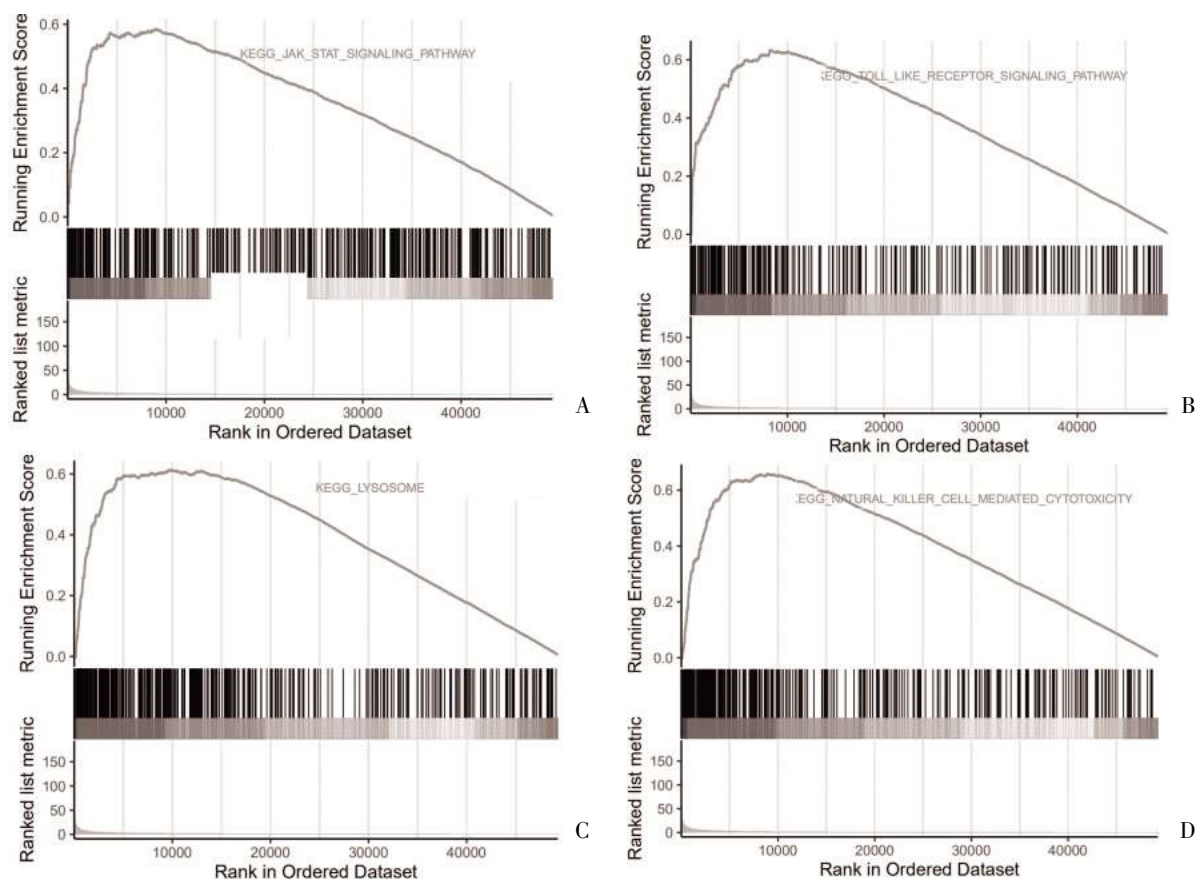


图 4 差异基因 PPI 图



注:节点的颜色深度表示校正后的 P 值,节点的大小代表了节点中基因的数量

图 5 核心基因的生物分析过程



注:A:JAK-STAT通路;B:Toll受体通路;C:溶媒体;D:自然杀伤细胞介导的细胞毒性

图6 GSEA基因集浓缩图谱

2.5 SONFH 潜在治疗药物预测筛选结果 根据 PPI 网络中筛选出的 10 个核心基因,分别为 SLC4A1、EPB42、ALAS2、AHSP、GYPB、EPB41、KLF1、RHAG、FECH、SPTA1。在 DGIdb 数据库中寻找相关潜在药物,最后搜索发现共 4 个基因具有相关药物。由基因 SLC4A1 预测到的潜在治疗药物有美托洛尔、阿替洛尔;由 ALAS2 预测到的潜在治疗药物有甘氨酸、磷酸吡哆醛;由 AHSP 预测到的潜在治疗药物有富马酸亚铁、硫酸亚铁甘氨酸;排名前 3 的药物甘氨酸、富马酸亚铁、硫酸甘氨酸亚铁作为候选治疗药物。

3 讨论

本研究通过对 GEO 数据库中的 SONFH 进行生物信息学分析获得差异表达基因,并分析了有关这些基因富集的生物学过程、细胞成分、分子功能和信号通路,为 SONFH 的机制研究提供了理论依据与研究方向参考。分析可见,SLC4A1、EPB42、ALAS2、AHSP、EPB41、KLF1 等核心差异基因多为红细胞发育相关膜蛋白,其异常表达常常会引起红细胞周期停滞、溶血性贫血等可能^[6]。异常形态红细胞可使血液黏滞性增加,血流缓慢,加之变形性差,

易堵塞毛细血管引起局部缺氧和炎症反应。股骨头的微循环作为循环系统的终末分支,关节软骨下负重侧微血管的分布均较非负重侧密集股骨头相对较差,局部的微循环阻塞,继而引起骨内压增加,导致股骨头缺血性坏死^[7]。

在骨坏死的发病机制中,类固醇对凝血功能的影响可能发挥着关键作用。既往研究表明^[8],类固醇还会影响内皮细胞功能,干预血管修复和新血管生成,导致凝血酶和其他血管活性物质的产生,影响血浆纤溶酶原激活物抑制和组织纤溶酶原激活之间的平衡。最后结局就是血栓形成。另外,类固醇同时干预脂质的代谢和动态平衡^[9],两者都会加剧高凝状态,减少流向股骨头等敏感部位的血流。此外临床研究表明^[10],低肝 CYP3A 活性和几种基因多态性与类固醇诱导的 ONFH 的风险显著相关。核心差异基因的异常表达人群,可能具有更强的遗传易感性。对于类固醇对机体影响,耐受性更差,导致了 SONFH 的高发生率。

GSEA 分析结果可见多通路在 SONFH 发病机制中扮演角色。JAK-STAT 通路少数多效级联反应之一,与体内发育和体内稳态的多种信号相关。介

导细胞因子和生长因子的主要信号传导。可能在 SONFH 的发生发展中起着中介作用。Toll 受体通路可通过诱导促炎性细胞因子的产生和共刺激分子的上调来激发先天免疫的快速激活,主要激活 NF- κ B 和 MAPK 产生促炎细胞因子。研究表明^[11],类固醇通过作用于 NF- κ B(RANK)和 RANK-配体的受体激活(RANK-L)来刺激骨丢失,而 RANK-L 是激活破骨细胞和辅助 T 细胞免疫的关键系统。溶媒体是动物细胞中膜定界的细胞器,是细胞的主要消化腔室,进行各种大分子的降解,是细胞自噬的最终结局。实验研究表明^[12],自噬参与了 SONFH 的病理过程,并与细胞凋亡密切相关,自噬与骨细胞的相互作用与激素的剂量有关,还影响 SONFH 中成骨细胞和破骨细胞之间的相互作用。自然杀伤细胞介导的细胞毒性作为先天免疫系统,其所含的效应蛋白穿透细胞膜并诱导程序性细胞死亡。

避免手术、药物控制是多数 SONFH 患者的期待治疗,寻找有效、敏感的治疗 SONFH 药物有助于改善患者的预后。本研究预测了甘氨酸、富马酸亚铁、硫酸甘氨酸亚铁 3 种药物。甘氨酸为内源性抗氧化剂还原性谷胱甘肽的组成氨基酸,在神经信号的传递以及参与各种生理和病理反应中起着的重要基础作用,发挥着抗炎、免疫调节和细胞保护作用^[13]。在缺血再灌注损伤中,因缺血而破坏的组织细胞,再灌注又加重这种破坏。巨噬细胞和中性粒细胞的激活、氧自由基和毒性因子的生成、降解酶如蛋白酶的活化导致炎症反应、组织破坏和功能衰竭。甘氨酸可以通过上述机制抑制这些反应,保护细胞免受缺血再灌注损伤,也可以通过保护线粒体功能,促进缺血部位的血管再生以延缓股骨头坏死的进展^[14]。富马酸亚铁、硫酸甘氨酸亚铁主要是治疗缺铁性贫血的药物,补充铁剂,促进血红蛋白的形成^[15]。与 SONFH 相关的研究,目前暂缺。有待医学的进一步发展。

综上所述,目前的研究首次确定了 SONFH 患者的 10 个核心基因。在其发生和进展过程中起着重要作用。此外,JAK-STAT 通路、Toll 受体通路、溶媒体、自然杀伤细胞介导的细胞毒性在其中扮演主要角色。预测了甘氨酸、富马酸亚铁、硫酸甘氨酸亚铁作为治疗 SONFH 的潜在药物。进一步阐明 SONFH 的发病机制和生物学进程,有待于临床试验和基础研究的开展。

参考文献:

- [1]Zhao DW,Yu M,Hu K,et al.Prevalence of Nontraumatic Osteonecrosis of the Femoral Head and its Associated Risk Factors in the Chinese Population: Results from a Nationally Representative Survey[J].Chin Med J (Engl),2015,128(21):2843-2850.
- [2]Mont MA,Jones LC,Hungerford DS.Nontraumatic osteonecrosis of the femoral head: ten years later [J].J Bone Joint Surg Am,2006,88(5):1117-1132.
- [3]Chang C,GreenSPAN A,Gershwin ME.The pathogenesis, diagnosis and clinical manifestations of steroid-induced osteonecrosis [J].J Autoimmun,2020(110):102460.
- [4]Jourde-Chiche N,Whalen E,Gondouin B,et al.Modular transcriptional repertoire analyses identify a blood neutrophil signature as a candidate biomarker for lupus nephritis[J].Rheumatology (Oxford),2017,56(3):477-487.
- [5]Kaessmann H.Origins, evolution, and phenotypic impact of new genes[J].Genome Res,2010,20(10):1313-1326.
- [6]Wang R,Yang S,Xu M,et al.Exome sequencing confirms molecular diagnoses in 38 Chinese families with hereditary spherocytosis[J].Sci China Life Sci,2018,61(8):947-953.
- [7]沈晓文.激素引起股骨头缺血坏死中微循环障碍的实验和临床研究[J].介入放射学杂志,2007,16(2):129-131.
- [8]Zhang Q,L V J,Jin L.Role of coagulopathy in glucocorticoid-induced osteonecrosis of the femoral head [J].J Int Med Res,2018,46(6):2141-2148.
- [9]Krenn V,Müller S,Krenn VT,et al.Pathophysiology of aseptic femoral head necrosis: Pathogenesis and histopathological differential diagnosis[J].Orthopade,2018,47(9):710-716.
- [10]Kubo T,Ueshima K,Saito M,et al.Clinical and basic research on steroid-induced osteonecrosis of the femoral head in Japan [J].J Orthop Sci,2016,21(4):407-413.
- [11]Parrondo RD,Sher T.Prevention Of Skeletal Related Events In Multiple Myeloma: Focus On The RANK-L Pathway In The Treatment Of Multiple Myeloma [J].Onco Targets Ther,2019(12):8467-8478.
- [12]Luo P,Gao F,Han J,et al.The role of autophagy in steroid necrosis of the femoral head: a comprehensive research review [J].Int Orthop,2018,42(7):1747-1753.
- [13]杜瑞平,张兴夫,高民,等.甘氨酸的免疫调节作用及其分子机制[J].动物营养学报,2015,27(3):663.
- [14]Guo D,Murdoch CE,Xu H,et al.Vascular endothelial growth factor signaling requires glycine to promote angiogenesis [J].Sci Rep,2017,7(1):14749.
- [15]赵聪,黄浩,陈贵堂.缺铁性贫血与补铁剂研究概况[J].食品安全质量检测学报,2016,7(8):3216-3221.

收稿日期:2021-04-22;修回日期:2021-05-25

编辑/肖婷婷