

# 基于生物信息学的肩袖撕裂与绝经后骨质疏松症的共病研究

汪青, 钱胤华, 钱平康, 徐锋

(昆山市中医医院骨科, 江苏 昆山 215300)

**摘要:**目的 探讨肩袖撕裂(RCT)与绝经后骨质疏松症(PMOP)之间的关系,为肩袖撕裂及绝经后骨质疏松症的共病研究提供新的思路。方法 收集自2021年1月1日-2022年6月30日因肩袖撕裂住院的绝经后女性患者的骨密度,并进行分析。应用生物信息学的方法,构建PMOP与RCT共同靶基因的PPI网络,使用cytoscape软件插件cytohubba按照Degree筛选核心基因,并使用R语言进行GO及KEGG富集分析。结果 共入组受试者104例,骨量异常共67例,占64.42%,其中骨质疏松症为17例,占16.35%。60岁以上人群,骨质疏松症约占1/3。通过查询数据库共获得绝经后骨质疏松症相关基因共967个,肩袖撕裂相关基因共281个,共同靶点152个。筛选获取前20位核心靶点,包括:信号转导和转录激活因子3(STAT3)、白介素6(IL-6)、血管内皮生长因子A(VEGFA)、金属基质蛋白酶2(MMP2)等。GO生物学过程主要集中在腺体发育、细胞对氧化应激的反应等,KEGG主要富集在癌症中的蛋白聚糖、雌激素信号通道等。结论 肩袖撕裂和绝经后骨质疏松症共病在临床常见,两者具有一定的相关性。未来可以从炎症、血管再生、氧化应激和雌激素相关信号通道进行研究。

**关键词:**绝经后骨质疏松症;肩袖撕裂;共病;信号转导和转录激活因子3;白介素6;血管内皮生长因子A;金属基质蛋白酶2

中图分类号:R681

文献标识码:A

DOI:10.3969/j.issn.1006-1959.2023.15.002

文章编号:1006-1959(2023)15-0006-06

## Study on the Comorbidity of Rotator Cuff Tear and Postmenopausal Osteoporosis Based on Bioinformatics

WANG Qing, QIAN Yin-hua, QIAN Ping-kang, XU Feng

(Department of Orthopedics, Kunshan Hospital of Chinese Medicine, Kunshan 215300, Jiangsu, China)

**Abstract:** **Objective** To explore the relationship between rotator cuff tear (RCT) and postmenopausal osteoporosis (PMOP), and to provide new ideas for the study of the comorbidity of rotator cuff tear and postmenopausal osteoporosis. **Methods** Bone mineral density of postmenopausal women hospitalized with rotator cuff tears from January 1, 2021 to June 30, 2022 were collected and analyzed. Using the method of bioinformatics, the PPI network of common target genes of PMOP and RCT was constructed. The core genes were screened according to degree by using cytoscape software cytohubba, and the enrichment analysis of GO and KEGG was carried out by using R language. **Results** A total of 104 subjects were enrolled, of which 67 cases were abnormal bone mass, accounting for 64.42%, including 17 cases of osteoporosis, accounting for 16.35%. Osteoporosis accounts for about 1/3 of people over 60 years old. A total of 967 genes related to postmenopausal osteoporosis, 281 genes related to rotator cuff tear and 152 common targets were obtained by querying the database. The top 20 core targets were screened, including signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3), interleukin 6 (IL-6), vascular endothelial growth factor A (VEGFA), matrix metalloproteinase 2 (MMP2), etc. GO biological processes mainly focus on gland development, cellular response to oxidative stress, etc. KEGG was mainly enriched in proteoglycans in cancer, estrogen signaling pathway, etc. **Conclusion** Rotator cuff tear and postmenopausal osteoporosis are common in clinic, and there is a certain correlation between them. In the future, we can study the signal channels related to inflammation, angiogenesis, oxidative stress and estrogen.

**Key words:** Postmenopausal osteoporosis; Rotator cuff tear; Comorbidity; Signal transducer and activator of transcription 3; Interleukin 6; Vascular endothelial growth factor A; Metalloproteinase 2

绝经后骨质疏松症(postmenopausal osteoporosis, PMOP)是绝经后女性常见的骨骼疾病,其特点是骨量下降,骨骼微结构损伤,容易发生腰椎、髋部等脆性骨折,造成社会及家庭严重的负担<sup>[1]</sup>。肩袖撕裂(rotator cuff tear, RCT)是中老年人群肩关节疼痛的

常见原因,诊治不当容易导致肩关节功能障碍甚至残疾。在绝经后女性人群中,RCT合并骨质疏松非常常见,两者有一些共同的危险因素,如:年龄、吸烟、高胆固醇血症、遗传等<sup>[1-3]</sup>,提示RCT与PMOP可能存在一些内在关联。本研究分析了2021年1月1日-2022年6月30日因RCT住院的绝经后女性患者的骨密度情况,并应用生物信息学方法对PMOP及RCT的共病基因进行分析,筛选出两者共同的靶点及涉及的信号通道,为RCT合并PMOP的临床治疗提供新的思路。

### 1 资料与方法

1.1 一般资料 收集昆山市中医医院自2021年1月

基金项目:苏州市临床重点病种诊疗技术专项项目(编号:LCZX202127)

作者简介:汪青(1983.5-),男,江苏昆山人,博士,副主任医师,主要从事骨质疏松病与运动损伤的研究

通讯作者:徐锋(1970.12-),男,江苏昆山人,本科,主任医师,主要从事骨关节病与运动损伤的研究

1 日-2022 年 6 月 30 日因 RCT 住院的绝经后女性患者的骨密度,并进行分析。纳入标准:①绝经后女性,自然绝经>1 年;②诊断为 RCT;③患者无可能影响骨代谢的慢性疾病;④患者 6 个月内未服用影响骨密度的药物。排除标准:①合并严重的内科基础疾病及精神疾病;②合并恶性肿瘤。骨密度由技术员使用双能 X 射线吸收仪(美国通用电气医疗公司,型号 Lunar)进行测量。骨密度结果通常以 T 值表示, $T \text{ 值} = (\text{实测值} - \text{同种族同性别正常青年人峰值骨密度}) / \text{同种族同性别正常青年人峰值骨密度的标准差}$ 。 $T \text{ 值} \leq -2.5$  诊断为骨质疏松症, $T \text{ 值} \geq -1$  为骨量正常, $-2.5 < T \text{ 值} < -1.0$  为骨量下降。

1.2 方法 分别以绝经后骨质疏松症(postmenopausal osteoporosis)及肩袖撕裂(rotator cuff tear)作为关键词,在疾病数据库(Disgenet、TTD、Genecards)中筛选靶点,其中 Genecards 筛选相关度 $\geq 1$ 。使用 Venny2.1.0 得到两种疾病的共同靶点,通过 string 数据库制作靶点间相互作用 PPI 网络,并导入 cytoscape3.7.2,使用插件 cytohubba 按照节点连接度(degree)筛选核心靶点。使用 R 语言进行 GO 生物过程富集分析以及 KEGG 通路富集分析,分别将筛选出的前 10 个 GO 条目与前 15 条 KEGG 条目进行可视化。

## 2 结果

### 2.1 RCT 绝经后女性的骨密度情况 共入组受试者

104 例,骨量异常共 67 例,占 64.42%,其中骨质疏松症为 17 例,占 16.35%,骨量下降为 50 例,占 48.08%。骨量正常者为 37 例,占 35.58%。40~49 岁组共 18 例,其中骨量正常为 11 例,骨量下降为 7 例;50~59 岁组共 36 例,其中骨量正常为 14 例,骨量下降为 18 例,骨质疏松 4 例;60~69 岁组共 37 例,其中骨量正常为 9 例,骨量下降为 17 例,骨质疏松 11 例;>70 岁组共 12 例,其中骨量正常为 1 例,骨量下降为 7 例,骨质疏松 4 例。

2.2 PMOP 及 RCT 相关基因收集结果 通过疾病数据库查询,共获得绝经后骨质疏松症相关基因共 967 个,肩袖撕裂相关基因共 281 个,生成韦恩图,映射出共同靶点 152 个(图 1)。

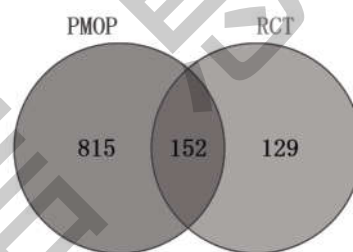


图 1 绝经后 PMOP 与 RCT 映射共同靶点韦恩图

2.2 PPI 网络及关键靶点基因 经 string 数据库在 0.9 信度下构建 PMOP 与 RCT 相互作用 PPI 网络(图 2),网络共有 151 个节点,具有 581 条相互作用关系。



图 2 共同靶点相互作用 PPI 网络图(置信度为 0.9)

导入 cytoscape 软件并进行分析,使用插件 cytohubba 按照 Degree 筛选,获取前 20 位核心靶点,包括:信号转导和转录激活因子 3(STAT3)、白介素 6(IL-6)、丝裂原活化蛋白激酶 3(MAPK3)、血管内皮生长因子 A (VEGFA)、表皮生长因子受体(EGFR)、金属基质蛋白酶 2 (MMP2)等(图 3)。

2.3 GO 及 KEGG 富集分析 使用 R 语言 clusterProfiler 包进行 GO 及 KEGG 富集分析。GO 生物学过程主要集中在腺体发育(gland development),细胞对氧化应激的反应 (cellular response to oxidative stress)、细胞对化学应激的反应(cellular response to chemical stress)、细胞对活性氧的反应(cellular response to reactive oxygen species) 等;KEGG 主要富集在癌症中的蛋白聚糖(Proteoglycans in cancer)、松弛素信号通道 (relaxin signaling pathway)、雌激素信号通道 (estrogen signaling pathway)、内分泌抵抗信号通道 (endocrine resistance)等。选取前 10 条 GO 及 15 条

KEGG 结果以气泡图的形式展示(图 4、图 5)。使用 cytoscape 软件绘制 PMOP 与 RCT 共同靶基因-信号通路相互作用图(图 6)。使用 R 语言绘制雌激素信号通道(图 7),框内为 PMOP 与 RCT 共病基因。

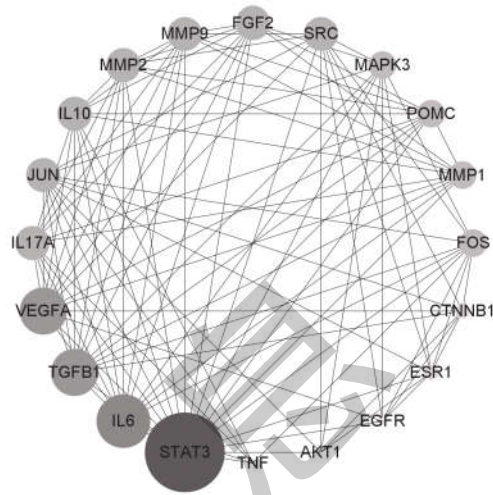


图 3 核心靶点图(靶点大小为 degree 值)

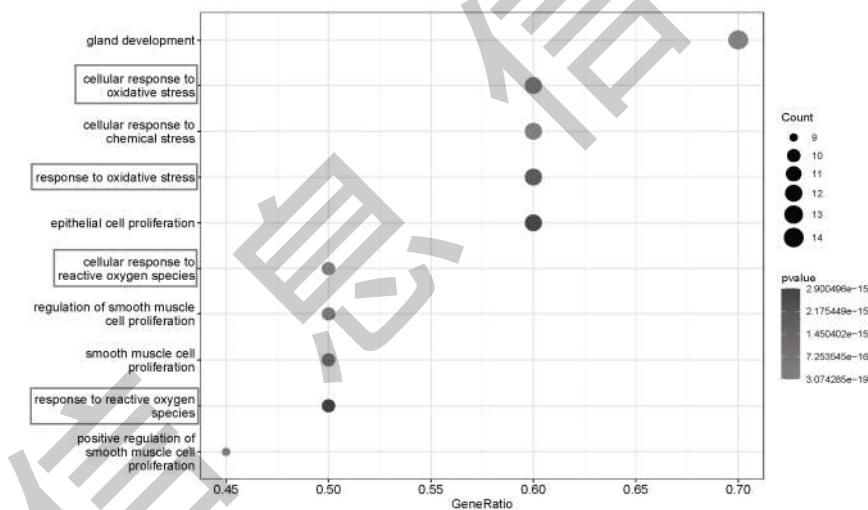


图 4 GO 富集分析结果

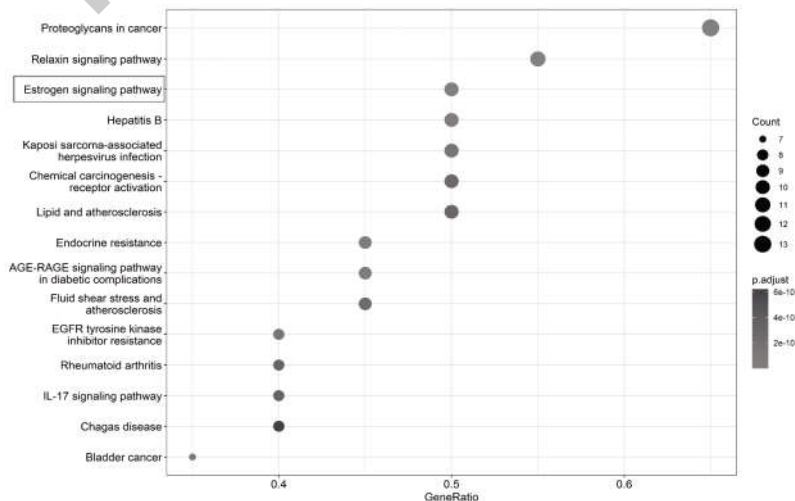
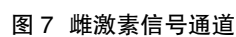
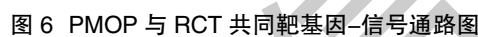


图 5 KEGG 富集分析结果





### 3 讨论

RCT 与 PMOP 均是年龄相关性疾病。骨质疏松增加了肩袖修补术的手术难度,并与术后再撕裂有关。因此研究 RCT 与 PMOP 相关性具有重要的临床价值。本研究回顾性的分析了 RCT 绝经后女性患者的骨密度情况,结果表明骨量异常占 64.42%,其中骨质疏松症占 16.35%。60 岁以上人群,骨质疏松症约占 1/3,这说明 RCT 和 PMOP 共病非常常见,两者具有一定的相关性。

本研究通过构建 PMOP 与 RCT 共同靶基因的 PPI 网络,筛选出 STAT3、IL-6、MAPK3、VEGFA、EGFR、MMP2 等关键蛋白。STAT3 参与骨代谢调节,与多种骨骼疾病有关。研究发现 STAT3 通过线粒体途径调控成骨细胞,通过组织蛋白酶 K(cathepsin K)调控破骨细胞,敲除 STAT3 的成骨细胞及破骨细胞均出现功能障碍,进而引起骨骼疾病<sup>[4,5]</sup>。STAT3 在撕裂的肩袖组织中高表达,并与腱内血管系统有关<sup>[6]</sup>。绝经后女性的雌激素水平下降,使免疫系统低度活化,促炎因子 IL-6、TNF- $\alpha$  等能够诱导巨噬细胞集落刺激因子(macrophage colony-stimulating factor, MCSF)和核因子  $\kappa$  B 受体活化因子配体(Receptor Activator for Nuclear Factor- $\kappa$  B Ligand, RANKL)的表达,刺激破骨细胞并抑制成骨细胞,造成骨代谢失衡。炎症与 RCT 关系密切。研究发现<sup>[7]</sup>,炎症性疾病中 RCT 的发生率升高。IL-6、IL-1 等促炎因子能够诱导细胞凋亡,而细胞凋亡是 RCT 最要的病理学表现<sup>[8]</sup>,RCT 边缘细胞凋亡数量是正常的 2 倍<sup>[9]</sup>。VEGF 能够调控骨髓充质干细胞、成骨细胞、破骨细胞,并且促进血管生成,参与偶联血管与骨的生成与重建,在骨代谢中发挥重要作用<sup>[10]</sup>。研究发现<sup>[11]</sup>,PMOP 患者的 VEGF 水平明显低于正常人群,说明 VEGF 与骨质疏松症具有重要关联。血管生成与 RCT 同样密不可分。RCT 常发生在距离肩袖止点 1 cm 的乏血管区。RCT 患者的肩峰下滑囊中,高表达 VEGF<sup>[12]</sup>。肩袖腱病患者的血清 VEGF 也显著升高<sup>[13]</sup>。另外,VEGF 对肩袖腱骨愈合也至关重要<sup>[14]</sup>。

GO 生物学过程主要集中在氧化应激相关的多条途径。氧化应激对骨重建有重要的影响:①刺激破骨细胞分化。ROS 通过 RANK-RANKL-OPG、ERK-NF- $\kappa$ B 等多条信号通道促进破骨细胞分化<sup>[15]</sup>;②降低骨祖细胞向成骨细胞谱系分化。氧化应激导致骨祖细胞,如骨髓间充质干细胞成骨分化减弱<sup>[16]</sup>;

③降低成骨细胞活性,增加成骨细胞及骨细胞凋亡。氧化应激导致 ROS 积聚,造成线粒体功能障碍,影响细胞分化,并最终诱导成骨细胞及骨细胞凋亡<sup>[17]</sup>。同时,氧化应激与肌腱退变有关。氧化应激导致肌腱胶原合成减少,基质降解增多<sup>[18]</sup>。既往研究提示,氧化应激与肩袖退变、撕裂及术后腱骨愈合不良有关。Yazar I 等<sup>[18]</sup>的一项研究发现,退行性肩袖撕裂患者的血清氧化应激指标远高于对照组,暗示氧化应激可能与退行性 RCT 有关。Itoigawa Y 等<sup>[19]</sup>的一项研究发现,肩袖术后再撕裂患者的超氧化物歧化酶远高于肩袖愈合患者,提示超氧化物诱导的氧化应激可能是肩袖术后再撕裂的重要原因。有动物研究也得到类似的结果<sup>[20]</sup>。

KEGG 信号通道富集在癌症中的蛋白聚糖(proteoglycans in cancer)、松弛素(Relaxin signaling pathway)、雌激素(estrogen signaling pathway)等信号通道。其中,雌激素信号通道在 PMOP 及 RCT 中均具有重要的作用。PMOP 主要是由于绝经后雌激素水平下降,雌激素对破骨细胞的抑制作用减弱,破骨细胞数量增多,骨吸收能增强。另一方面,雌激素作为抗氧化剂的能力减弱,氧化应激导致成骨前体细胞、成骨细胞、骨细胞凋亡增多,骨形成能力下降,最终造成骨代谢失衡。雌激素对肌腱的代谢和功能具有重要影响<sup>[21]</sup>。Longo UG 等<sup>[22]</sup>的一项研究发现,冈上肌腱细胞表达雌激素受体,且绝经后女性撕裂的冈上肌肌腱细胞的雌激素受体表达量远高于男性,并与组织病理学评分有相关性。体外实验发现<sup>[23]</sup>,雌激素能刺激冈上肌肌腱来源的细胞增殖。全层肩袖撕裂与雌激素相关受体- $\beta$ (ESRRB)显著相关<sup>[24]</sup>,并且雌激素水平还与肩袖术后再撕裂有关<sup>[25,26]</sup>。

本研究应用生物信息学的方法,初步探讨了 PMOP 与 RCT 之间的共病基因及相关信号通道,为探索 PMOP 与 OP 的治疗靶点提供了一定理论参考。根据生物信息学分析的结果,对于绝经后女性,RCT 合并骨质疏松的治疗,未来可以从以下几个方向探索:①炎症与免疫调节;②血管再生;③抗氧化应激;④雌激素及相关受体调节。本研究仍存在一定的局限性,临床部分纳入的样本数较少,生物信息学分析仅停留在信息整合及理论分析阶段,未来仍需根据生物信息学的结果,开展进一步的临床及到动物研究,阐明 PMOP 与 RCT 之间关系,为临床应用提供依据。

## 参考文献:

- [1]中华医学会骨质疏松和骨矿盐疾病分会.原发性骨质疏松症诊疗指南(2017)[J].中国骨质疏松杂志,2019,25(3):281-309.
- [2]Song A,Cannon D,Kim P,et al.Risk factors for degenerative, symptomatic rotator cuff tears: a case-control study[J].J Shoulder Elbow Surg,2022,31(4):806-812.
- [3]Yamamoto A,Takagishi K,Osawa T,et al.Prevalence and risk factors of a rotator cuff tear in the general population[J].J Shoulder Elbow Surg,2010,19(1):116-120.
- [4]Davidson RK,Himes ER,Takigawa S,et al.The loss of STAT3 in mature osteoclasts has detrimental effects on bone structure[J].PLoS One,2020,15(7):e0236891.
- [5]Zhou H,Newnum AB,Martin JR,et al.Osteoblast/osteocyte-specific inactivation of Stat3 decreases load-driven bone formation and accumulates reactive oxygen species[J].Bone,2011,49(3):404-411.
- [6]Nakama K,Gotoh M,Yamada T,et al.Interleukin-6-induced activation of signal transducer and activator of transcription-3 in ruptured rotator cuff tendon[J].J Int Med Res,2006,34(6):624-631.
- [7]Suh YS,Kim HO,Cheon YH,et al.Metabolic and inflammatory links to rotator cuff tear in hand osteoarthritis: A cross sectional study[J].PLoS One,2020,15(2):e0228779.
- [8]Longo UG,Berton A,Papapietro N,et al.Epidemiology, genetics and biological factors of rotator cuff tears [J].Med Sport Sci, 2012,57:1-9.
- [9]Yuan J,Murrell GA,Wei AQ,et al.Apoptosis in rotator cuff tendonopathy[J].J Orthop Res,2002,20(6):1372-1379.
- [10]熊军,刘韦,曾凡,等.脂质体介导 VEGF 基因对成骨细胞增殖、合成骨钙素以及细胞周期的相关研究[J].现代生物医学进展,2018,18(16):3042-3045.
- [11]Senel K,Baykal T,Seferoglu B,et al.Circulating vascular endothelial growth factor concentrations in patients with postmenopausal osteoporosis[J].Arch Med Sci,2013,9(4):709-712.
- [12]HajAssaad A,Willacy R,Wilson R.A Systematic Review of the Histological and Molecular Changes in the Subacromial Bursa in Rotator Cuff Disease[J].J Surg Orthop Adv,2020,29(1):1-4.
- [13]Savitskaya YA,Izaguirre A,Sierra L,et al.Effect of angiogenesis-related cytokines on rotator cuff disease: the search for sensitive biomarkers of early tendon degeneration [J].Clin Med Insights Arthritis Musculoskelet Disord,2011,4:43-53.
- [14]Xu Q,Sun WX,Zhang ZF.High expression of VEGFA in MSCs promotes tendon-bone healing of rotator cuff tear via microRNA-205-5p [J].Eur Rev Med Pharmacol Sci,2019,23(10):4081-4088.
- [15]Filaire E,Toumi H.Reactive oxygen species and exercise on bone metabolism: friend or enemy?[J].Joint Bone Spine,2012,79(4):341-346.
- [16]Yang Y,Sun Y,Mao WW,et al.Oxidative stress induces downregulation of TP53INP2 and suppresses osteogenic differentiation of BMSCs during osteoporosis through the autophagy degradation pathway [J].Free Radic Biol Med,2021,166:226-237.
- [17]Liu M,Wu X,Cui Y,et al.Mitophagy and apoptosis mediated by ROS participate in AlCl<sub>3</sub>-induced MC3T3-E1 cell dysfunction[J].Food Chem Toxicol,2021,155:112388.
- [18]Yazar I,Sarikaya B,Koyuncu I,et al.Evaluation of Oxidative Stress in Degenerative Rotator Cuff Tears [J].J Shoulder Elbow Surg,2022,31(10):e490-e497.
- [19]Itoigawa Y,Yoshida K,Nojiri H,et al.Association of Recurrent Tear After Arthroscopic Rotator Cuff Repair and Superoxide-Induced Oxidative Stress [J].Am J Sports Med,2021,49(8):2048-2055.
- [20]Uehara H,Itoigawa Y,Wada T,et al.Relationship of superoxide dismutase to rotator cuff injury/tear in a rat model [J].J Orthop Res,2022,40(5):1006-1015.
- [21]Leblanc DR,Schneider M,Angele P,et al.The effect of estrogen on tendon and ligament metabolism and function [J].J Steroid Biochem Mol Biol,2017,172:106-116.
- [22]Longo UG,Mazzola A,Carotti S,et al.The role of estrogen and progesterone receptors in the rotator cuff disease: a retrospective cohort study[J].BMC Musculoskelet Disord,2021,22(1):891.
- [23]Maman E,Somjen D,Maman E,et al.The response of cells derived from the supraspinatus tendon to estrogen and calciotropic hormone stimulations: in vitro study[J].Connect Tissue Res,2016,57(2):124-130.
- [24]Teerlink CC,Cannon-Albright LA,Tashjian RZ.Significant association of full-thickness rotator cuff tears and estrogen-related receptor-beta (ESRRB) [J].J Shoulder Elbow Surg,2015,24(2):e31-e35.
- [25]Smith KM,Hotaling JM,Presson AP,et al.The Effect of Sex Hormone Deficiency on the Incidence of Rotator Cuff Repair: Analysis of a Large Insurance Database[J].J Bone Joint Surg Am, 2022,104(9):774-779.
- [26]Tanaka K,Kanazawa T,Gotoh M,et al.Effects of Estrogen-Deficient State on Rotator Cuff Healing [J].Am J Sports Med, 2019,47(2):389-397.

收稿日期:2022-10-29;修回日期:2022-11-25

编辑/肖婷婷