

·生物信息学·

慢性阻塞性肺疾病与骨质疏松症的生物信息学分析

姜瑞^{1,2}, 张征^{1,2}, 谭爱华^{2,3}

(1.湖北中医药大学针灸骨伤学院,湖北 武汉 430065;

2.湖北中医药大学附属黄冈市中医医院骨科,湖北 黄冈 438000;

3.北京中医药大学博士后流动站,北京 100007)

摘要:目的 利用生物信息学分析慢性阻塞性肺疾病(COPD)与骨质疏松症(OP)的关系。方法 在Genecards、OMIM、DRUGBANK等数据库查找出COPD和OP的疾病基因靶点,将所获得靶点分别进行汇总、筛选、去重后分别得到两组疾病的最终基因靶点。将两组疾病的最终基因靶点取交集,将共同基因靶点导入STRING数据库构建蛋白互作(PPI)网络图,下载tsv格式的PPI网络,导入Cytoscape3.9.1软件,通过插件cytoHubba,筛选出Degree前20位的目标靶基因。利用DAVID数据库对两种疾病的共同靶基因进行GO和KEGG富集分析。结果 筛选出COPD相关基因393个、OP相关基因1389个,取交集后获得共同靶点基因172个,根据PPI网络图可知,STAT3、IL6、AKT1、CTNNB1、IL10、MAPK1、IL17、TNF等为COPD与OP的共同关键靶基因,GO富集显示其主要与雌激素代谢、炎症反应、细胞对缺氧的反应、免疫反应、增龄等相关,KEGG信号通路包括JAK-STAT信号通路、HIF-1信号通路、IL-17信号通路等。结论 通过COPD与OP的共同关键基因和涉及的信号通路,了解两种疾病相关性及为后续相关研究提供了一定的理论基础。

关键词:生物信息学;骨质疏松症;慢性阻塞性肺疾病;靶基因

中图分类号:R259

文献标识码:A

DOI:10.3969/j.issn.1006-1959.2023.17.001

文章编号:1006-1959(2023)17-0001-06

Bioinformatics Analysis of Chronic Obstructive Pulmonary Disease and Osteoporosis

JIANG Rui^{1,2}, ZHANG Zheng^{1,2}, TAN Ai-hua^{2,3}

(1.College of Acupuncture and Moxibustion and Orthopaedics,Hubei University of Chinese Medicine,Wuhan 430065,Hubei,China;

2.Department of Orthopedics,Huanggang Hospital of Traditional Chinese Medicine Affiliated with Hubei University of Chinese Medicine,Huanggang 438000,Hubei,China;

3.Beijing University of Chinese Medicine Postdoctoral Station,Beijing 100007,China)

Abstract: Objective To analyze the relationship between chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and osteoporosis (OP) by bioinformatics.

Methods The disease gene targets of COPD and OP were identified in Genecards, OMIM, DRUGBANK and other databases, and the obtained targets were aggregated, screened and de-duplicated to obtain the final gene targets of the two groups of diseases, respectively. The final gene targets of the two groups were intersected, and the common gene targets were imported into the STRING database to construct a protein interaction (PPI) network diagram. The tsv format PPI network was downloaded and imported into Cytoscape 3.9.1 software. The top 20 target genes of Degree were screened by the plug-in cytoHubba. GO and KEGG enrichment analysis of the common target genes of the two diseases was performed using the DAVID database. **Results** A total of 393 COPD-related genes and 1389 OP-related genes were screened out, and 172 common target genes were obtained after intersection. According to the PPI network diagram, STAT3, IL6, AKT1, CTNNB1, IL10, MAPK1, IL17 and TNF were the common key target genes of COPD and OP. GO enrichment was mainly related to estrogen metabolism, inflammatory response, cell response to hypoxia, immune response and aging. KEGG signaling pathways included JAK-STAT signaling pathway, HIF-1 signaling pathway and IL-17 signaling pathway. **Conclusion** Through the common key genes and signaling pathways involved in COPD and OP, it provides a theoretical basis for understanding the correlation between the two diseases and for subsequent related research.

Key words: Bioinformatics; Osteoporosis; Chronic obstructive pulmonary disease; Target gene

慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease, COPD),简称慢阻肺,是一种以持续存在的呼吸系统症状和气流受限为特征,临床上常

见、可以预防和治疗的慢性气道疾病^[1]。研究表明^[2],目前我国60岁以上人群COPD患病率已超过27%,全国总患病人数为9990万。骨质疏松症

基金项目:1.湖北省自然科学基金项目(编号:2022CFB391);2.湖北省重点实验室开放基金项目(编号:PT022204);3.黄冈市科技创新专项(编号:YBXM20230003-3)

作者简介:姜瑞(1997.5-),男,湖北枣阳人,硕士研究生,主要从事中医药防治骨关节伤病的研究

通讯作者:谭爱华(1991.3-),男,湖北巴东人,博士,助理研究员,硕士生导师,博士后,主要从事中西医结合内科学研究

(osteoporosis, OP)是以骨量减少,骨强度下降,骨微细结构破坏,易发生脆性骨折为主要特征的全身性骨病^[3]。据报道^[4],全国 60 岁以上患有骨质疏松的人口已超过 2.1 亿,随着我国人口老龄化的进展,这个数字还将持续上升。COPD 与 OP 的发生发展有着密切相关性,50%~70%的 COPD 患者发生骨质减少或骨质疏松^[5]。长期慢性缺氧、营养不良和糖皮质激素的使用被认为是导致 COPD 患者骨密度下降的主要诱因^[6]。骨质疏松的出现同时又会使患者的呼吸功能受限,抑制呼吸功能,从而加重 COPD^[7]。本研究利用生物信息学技术,从 Genecards 等 5 大数据库筛选出这两个疾病的潜在相关核心靶点、生物学过程及相关通路,探讨了影响二者疾病相互作用及发生发展可能的作用机制,为今后对二者相关研究提供一定的思路。

1 资料与方法

1.1 疾病相关靶点获取 在 GeneCards 数据库(<https://www.Genecards.org/>)、OMIM 数据库(<https://omim.org/>)、TTD 数据库(<http://db.idrblab.net/ttd/>)、DRUG-BANK 数据库(<https://go.drugbank.com/>)和 DisGeNET 数据库(<https://www.Disgenet.org/>)中以“osteoporosis”和“chronicobstructive pulmonarydisease”为关键词分别进行检索,获得 OP 及 COPD 的疾病基因。为了提高准确性,从 GeneCards 数据库中选择了高相关性得分的前 300 个靶基因。随后,将所获得靶点分别进行汇总、筛选、去重后即得到该疾病的靶点基因,作为慢性阻塞性肺疾病和骨质疏松症的最终靶点。

1.2 关键靶基因筛选及蛋白互作网络(PPI)分析 将骨质疏松症和慢性阻塞性肺疾病的靶基因导入 Draw Venn Diagram(<https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>)平台获得共同靶点基因。然后将 COPD 与 OP 共同靶点基因导入 STRING 在线数据库(<https://cn.string-db.org/cgi/>)构建蛋白互作网络 PPI。下载 tsv 格式的 PPI 网络,导入 Cytoscape3.9.1 软件,以绘制更加直观的 PPI 可视化网络图。使用网络分析仪插件 cytoHubba,筛选出 Degree 前 20 位的目标靶基因,根据节点连通性(度)调整目标的大小和颜色,根据综合评分调整连接线的厚度和颜色,形成骨质疏松-慢性阻塞性肺疾病关键靶点基因。

1.3 基因富集分析与可视化网络 将骨质疏松症和

慢性阻塞性肺疾病的共同疾病靶基因导入 DAVID 数据库(<https://david.ncicrf.gov/>)进行 GO 功能和 KEGG 通路富集分析,并绘制富集结果气泡图。

2 结果

2.1 OP 与 COPD 基因收集结果 GeneCards 数据库中 OP 和 COPD 相关基因分别为 4736 个和 2010 个; OMIM 数据库中 45 个和 6 个;TTD 数据库中 29 个和 63 个;DRUGBANK 数据库中 236 个和 98 个; DisGeNET 数据库中 1099 个和 3 个;从 GeneCards 数据库中选择了高相关性得分的前 300 个靶基因,数据库汇总数据、删除重复基因,最终得到 OP 相关基因 1389 个,COPD 相关基因 393 个。通过取交集后获得 172 个 OP 与 COPD 共同靶点基因,见图 1。

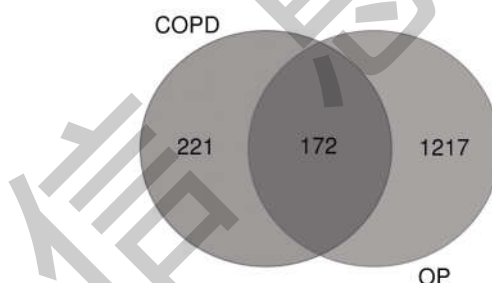


图 1 COPD 与 OP 共同靶点基因韦恩图

2.2 PPI 网络及关键靶点基因 将共同靶点基因上传到 STRING 数据库中,将最小交互评分设置为 0.9,隐藏自由节点,生成 PPI 交互网络见图 2。结果表明,网络图中共有 167 个节点,有 578 条边,平均节点度为 6.92,平均聚类系数为 0.464。下载其 tsv 文件,导入 Cytoscape3.9.1 软件,筛选了前 20 位的核心靶点见图 3。所获得的核心靶点直接或间接影响骨质疏松症和慢性阻塞性肺疾病。

2.3 GO 和 KEGG 富集分析 经 DAVID 数据库获得 695 项 GO 富集结果($P<0.05$)及 144 条 KEGG 信号通路($P<0.05$),以 P 值升序排列,对前 50 个 GO、KEGG 通路进行筛选,分别筛选出符合条件的,最终筛选出 15 个 GO,13 条 KEGG 信号通路,并将其以气泡图的形式展现出来,见图 4、图 5。运用 Cytoscape3.9.1 软件绘制 COPD 与 OP 共同靶基因-信号通路相互作用图,图中菱形节点表示疾病基因、箭头节点表示富集的 KEGG 信号通路,节点间连线数量表示相互作用频率,节点越大,富集的疾病靶点基因越多,见图 6。

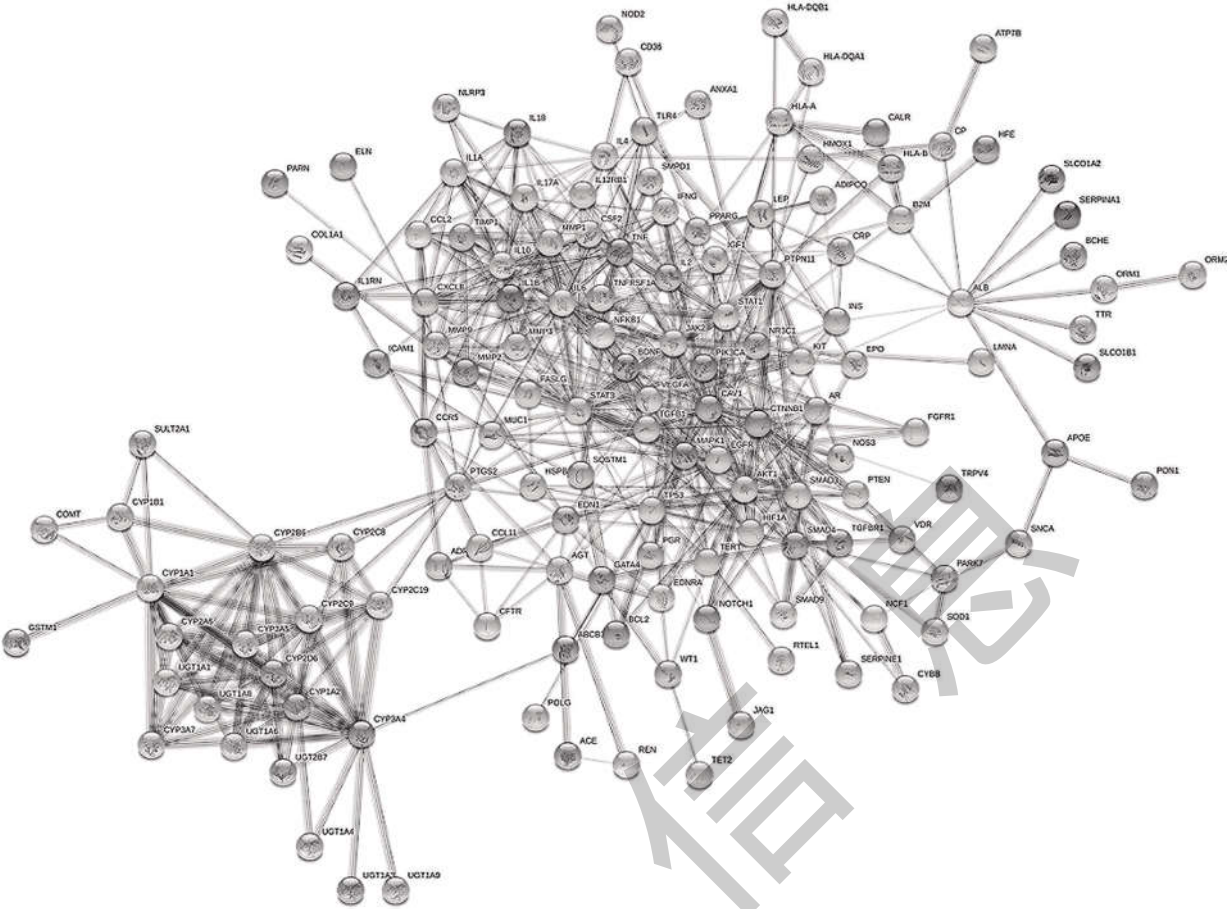


图 2 COPD 与 OP 共同靶点 PPI 网络图

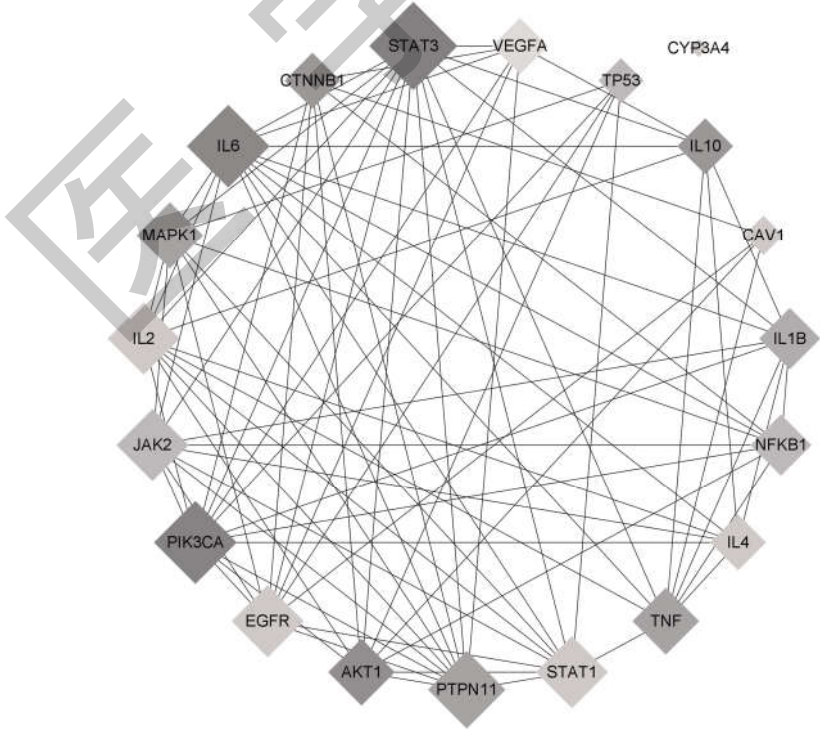


图 3 PPI 网络中 Degree 前 20 的靶基因

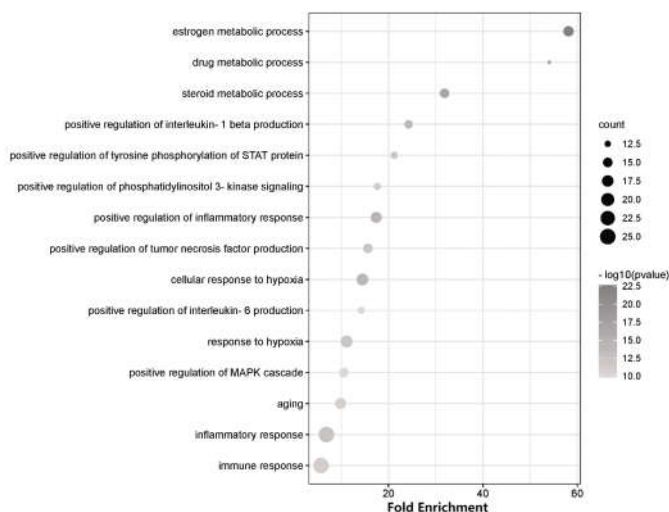


图 4 GO 富集分析结果

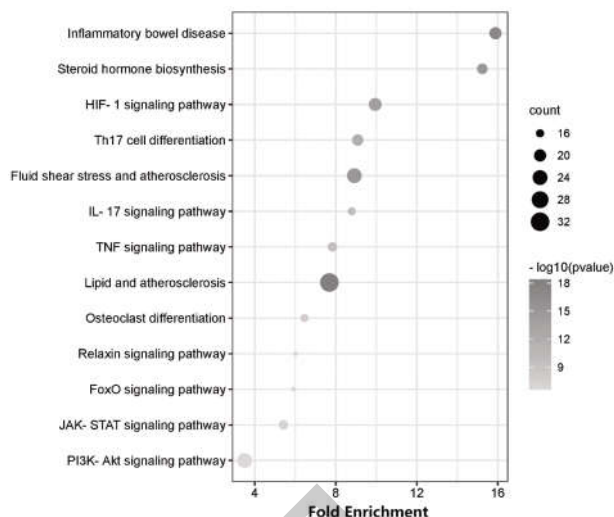


图 5 KEGG 富集分析结果

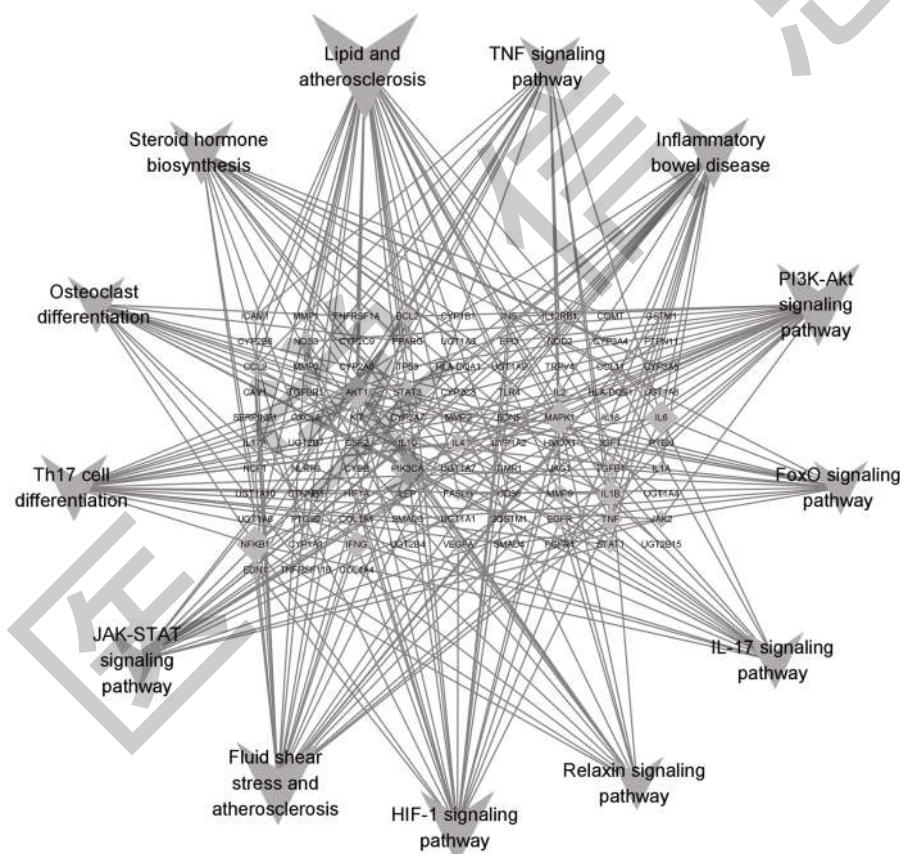


图 6 COPD 与 OP 共同靶基因-信号通路图

3 讨论

OP 与 COPD 均为临床上较复杂的疾病,目前二者的发病机制并未完全清楚。本研究利用生物信息学技术对 OP 与 COPD 的共同疾病靶基因展开分析,筛选出两种疾病的共同核心靶基因 20 个,关键生物学过程 15 个,KEGG 信号通路 13 条。这些核心

靶基因、生物学过程及信号通路与 OP 与 COPD 的疾病之间有着密切关联,为理清这两种疾病之间的关系及探索今后的研究方向提供了一定的帮助。

通过 OP 与 COPD 共同靶基因的 PPI,筛选出 STAT3、IL6、AKT1、CTNNB1、IL10、MAPK1、IL17、TNF 等关键蛋白。STAT3 的正常表达是调控人类气

道平滑肌细胞增殖功能正常的前提,当 STAT3 过度表达时,会引起肺气道炎症的形成与加剧。IL6 能诱导机体 JAK 激酶活化、STAT3 的磷酸化,调节机体的炎症反应^[8,9]。IL17 可以促进 COPD 患者气道的炎症反应,加重了气道重塑的程度^[10]。Th17 细胞释放 IL17,引导间充质干细胞向成骨谱系分化,同时也间接增加破骨细胞分化^[11]。TNF- α 与 COPD 的发生发展关系密切,是经典的促炎分子,能扩大炎症反应。TNF- α 破坏了 RANKL/OPG 的平衡,发挥着抑制成骨细胞的成骨作用及促进破骨细胞破骨作用。STAT3 二聚体可以促进 Th17 细胞的增殖和分化,促进 IL17 和 TNF- α 的分泌^[12]。

通过对 COPD 与 OP 共同靶基因进行 GO 和 KEGG 分析发现,GO 功能主要富集在雌激素代谢、炎症反应、细胞对缺氧的反应、免疫反应、增龄等方面。雌激素影响通过骨代谢引起骨质疏松症,绝经后卵巢雌激素分泌减少是女性快速骨流失的初始阶段的原因^[13]。越来越多的研究发现,雌激素在 COPD 的发生发展发挥着重要作用。Jordan RE 等^[14]发现暴露在相同的危险水平下,女性相较于男性更容易患上 COPD,且疾病进展更迅速。Amaral A 等^[15]的研究结果与其一致,认为发现女性吸烟者比男性吸烟者发生气流阻塞的可能性更大。雌激素影响 COPD 的发生发展机制可能与其能够参与维持肺组织细胞结构和肺弹性反冲,从而保持气道开放有关。香烟具有潜在的抗雌激素作用,会导致女性患者肺功能受损,这可能是导致女性吸烟者相较于男性更容易患上 COPD 的原因^[16,17]。高龄是二者的共同危险因素,随着年龄增长,二者患病的几率都会上升。炎症反应、免疫反应也均是目前二者研究的热点,可见生物信息学分析结果与临床现象具有一致性,生物信息学具有较高的可信度和指导意义。

KEGG 富集结果表明,JAK-STAT 信号通路、HIF-1 信号通路、IL17 信号通路、PI3K-Akt 信号通路、TNF 信号通路及 FoxO 信号通路等可能是 COPD 与 OP 病理机制中的共同信号通路。此外,炎症性肠病通路及脂质与冠状动脉粥样硬化通路与这二者均有密切联系。

在 COPD 中,JAK-STAT 信号通路参与调控多种炎症因子的生成,如 TNF- α 和 IL6、IL10 等,这些炎症因子既可以对人体肺组织和支气管造成直接损伤,也可以通过募集、活化炎症细胞释放更多的炎症

因子^[18]。缺氧诱导因子-1(hypoxia inducible factors-1, HIF-1)是缺氧反应基因表达的核转录因子,由 α 和 β 两个亚单位组成, α 亚单位包括 (HIF-1 α ,HIF-2 α , HIF-3 α),其中 HIF-1 α 对机体的氧气浓度非常敏感^[19]。当机体缺氧时,HIF-1 α 能够促进机体的炎症反应,增加炎症因子的产生,如 IL1、IL6、TNF- α 等,炎症反应会导致 COPD 患者气道重塑的发生,加剧病情的发展。若敲除 HIF-1 α 可减少因机体缺氧导致的炎症因子生成,可能抑制 COPD 的发生发展。此外,HIF-1 α 可通过激活 EGFR/PI3K/AKT 通路促进 COPD 的炎症反应,从而加重 COPD 病理改变^[20]。

在 OP 中,JAK-STAT 信号通路亦发挥着重要作用。有研究表明^[21],IL6 可通过 JAK-STAT 信号通路介导破骨细胞的分化。还有学者发现^[22],干扰素可介导该信号通路促进破骨细胞的生成。此外,成纤维细胞生长因子 23(FGF23)通过 JAK/STAT 通路参与骨质疏松症的发生发展^[23]。还有研究表明^[24],通过 JAK 抑制剂抑制 JAK/STAT 信号通路,可以抑制破骨细胞的生成。研究表明^[25],延长 B 细胞中 HIF-1 α 信号通路,会促进 RANKL 的产生和破骨细胞的形成,若 B 细胞中 HIF-1 α 的缺失可以防止雌激素缺乏诱导的小鼠骨丢失。可见,B 细胞中 HIF-1 α 信号对控制破骨细胞的形成至关重要,HSP70/HIF-1 α 轴可能作为骨质疏松症的新治疗靶点。

此外,还有学者发现^[26],HIF-1 α 通过激活 MLO-Y4 细胞中 JAK2/STAT3 通路促进 RANKL 的表达,并增强骨细胞介导的破骨细胞分化。PI3K/AKT 通路是调节细胞增殖、分化、代谢等基本功能的重要途径,可调节卵巢颗粒细胞功能,影响体内激素水平,通过控制成骨细胞和破骨细胞的增殖分化影响骨代谢,是影响成骨细胞与破骨细胞功能协调的关键途径,激活 PI3K/AKT 信号通路可双向调控成骨细胞分化和破骨细胞凋亡^[27]。

通过对 COPD 与 OP 进行生物信息学分析,寻找二者共同靶点和作用途径,并通过可视化网络更清晰地表达二者之间的相互关系,可为药物同时调节两种疾病提供了潜在的靶点。炎症反应、细胞对缺氧的反应、增龄等在两种疾病的发生发展中发挥重要作用。JAK-STAT 信号通路、HIF-1 信号通路、IL17 信号通路、PI3K-Akt 信号通路均起着直接或间接的作用。当然,随着生物信息学和疾病数据库的不断发展,数据的可靠性和准确性将继续提高,还需要

进一步的研究来使结论更加可靠。

参考文献:

- [1] Halpin D, Criner GJ, Papi A, et al. Global Initiative for the Diagnosis, Management, and Prevention of Chronic Obstructive Lung Disease. The 2020 GOLD Science Committee Report on COVID-19 and Chronic Obstructive Pulmonary Disease [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2021, 203(1): 24-36.
- [2] Wang C, Xu J, Yang L, et al. Prevalence and risk factors of chronic obstructive pulmonary disease in China (the China Pulmonary Health [CPH] study): a national cross-sectional study [J]. *Lancet*, 2018, 391(10131): 1706-1717.
- [3] Rachner TD, Khosla S, Hofbauer LC. Osteoporosis: now and the future [J]. *Lancet*, 2011, 377(9773): 1276-1287.
- [4] 夏维波, 章振林, 林华, 等. 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.
- [5] Cecins E, Cavalheri V, Taaffe DR, et al. Prevalence of suspected poor bone health in people with chronic obstructive pulmonary disease - a cross-sectional exploratory study [J]. *Chron Respir Dis*, 2022, 19: 231422547.
- [6] Wan Q, Schoenmaker T, Jansen ID, et al. Osteoblasts of calvaria induce higher numbers of osteoclasts than osteoblasts from long bone [J]. *Bone*, 2016, 86: 10-21.
- [7] Chen YW, Coxson HO, Coupal TM, et al. The contribution of thoracic vertebral deformity and arthropathy to trunk pain in patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) [J]. *Respir Med*, 2018, 137: 115-122.
- [8] Vilgelm AE. Illuminating the mechanism of IL-6-mediated immunotherapy resistance [J]. *Cell Rep Med*, 2023, 4(1): 100901.
- [9] Xu J, Lin H, Wu G, et al. IL-6/STAT3 Is a Promising Therapeutic Target for Hepatocellular Carcinoma [J]. *Front Oncol*, 2021, 11: 760971.
- [10] Mannion JM, McLoughlin RM, Lalor SJ. The Airway Microbiome-IL-17 Axis: a Critical Regulator of Chronic Inflammatory Disease [J]. *Clin Rev Allergy Immunol*, 2023, 64(2): 161-178.
- [11] Fischer V, Haffner-Luntzer M. Interaction between bone and immune cells: Implications for postmenopausal osteoporosis [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2022, 123: 14-21.
- [12] Li Y, Lu L, Xie Y, et al. Interleukin-6 Knockout Inhibits Senescence of Bone Mesenchymal Stem Cells in High-Fat Diet-Induced Bone Loss [J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2020, 11: 622950.
- [13] Eastell R, O'Neill TW, Hofbauer LC, et al. Postmenopausal osteoporosis [J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2016, 2: 16069.
- [14] Jordan RE, Miller MR, Lam KB, et al. Sex, susceptibility to smoking and chronic obstructive pulmonary disease: the effect of different diagnostic criteria. Analysis of the Health Survey for England [J]. *Thorax*, 2012, 67(7): 600-605.
- [15] Amaral A, Strachan DP, Burney P, et al. Female Smokers Are at Greater Risk of Airflow Obstruction Than Male Smokers. UK Biobank [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2017, 195(9): 1226-1235.
- [16] Gut-Gobert C, Cavaillès A, Dixmier A, et al. Women and COPD: do we need more evidence? [J]. *Eur Respir Rev*, 2019, 28(151): 180055.
- [17] Zysman M, Raheison-Semjen C. Women's COPD [J]. *Front Med (Lausanne)*, 2021, 8: 600107.
- [18] Zhao K, Dong R, Yu Y, et al. Cigarette smoke-induced lung inflammation in COPD mediated via CCR1/JAK/STAT/NF-kappaB pathway [J]. *Aging (Albany NY)*, 2020, 12(10): 9125-9138.
- [19] Strowitzki MJ, Cummins EP, Taylor CT. Protein Hydroxylation by Hypoxia-Inducible Factor (HIF) Hydroxylases: Unique or Ubiquitous? [J]. *Cells*, 2019, 8(5): 384.
- [20] Zhang HX, Yang JJ, Zhang SA, et al. HIF-1alpha promotes inflammatory response of chronic obstructive pulmonary disease by activating EGFR/PI3K/AKT pathway [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 22(18): 6077-6084.
- [21] Kaneshiro S, Ebina K, Shi K, et al. IL-6 negatively regulates osteoblast differentiation through the SHP2/MEK2 and SHP2/Akt2 pathways in vitro [J]. *J Bone Miner Metab*, 2014, 32(4): 378-392.
- [22] Groetsch B, Schachtschabel E, Tripal P, et al. Inflammatory activation of the FcγR and IFNγR pathways co-influences the differentiation and activity of osteoclasts [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 958974.
- [23] Xu L, Zhang L, Zhang H, et al. The participation of fibroblast growth factor 23 (FGF23) in the progression of osteoporosis via JAK/STAT pathway [J]. *J Cell Biochem*, 2018, 119(5): 3819-3828.
- [24] Damerau A, Gaber T, Ohrndorf S, et al. JAK/STAT Activation: A General Mechanism for Bone Development, Homeostasis, and Regeneration [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(23): 9004.
- [25] Meng X, Lin Z, Cao S, et al. Estrogen-mediated downregulation of HIF-1alpha signaling in B lymphocytes influences postmenopausal bone loss [J]. *Bone Res*, 2022, 10(1): 15.
- [26] Zhu J, Tang Y, Wu Q, et al. HIF-1alpha facilitates osteocyte-mediated osteoclastogenesis by activating JAK2/STAT3 pathway in vitro [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(11): 21182-21192.
- [27] Xi JC, Zang HY, Guo LX, 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.

收稿日期: 2023-01-28; 修回日期: 2023-02-25

编辑/肖婷婷