

· 基础研究 ·

慢性骨髓炎患者骨组织的转录组特征分析

张扬¹, 刘亦杨^{2,3}, 沈立锋⁴, 林炳远³, 寿旦⁵, 郭峭峰³, 张春³

(1. 浙江中医药大学附属第一医院 浙江省中医院骨伤研究所, 浙江 杭州 310053; 2. 南京中医药大学中西医结合临床医学院 南京鼓楼医院, 江苏 南京 210008; 3. 浙江省立同德医院骨伤科, 浙江 杭州 310012; 4. 浙江大学医学院附属邵逸夫医院骨科, 浙江 杭州 310005; 5. 浙江中医药大学药学院, 浙江 杭州 310053)

【摘要】 目的: 采集和分析慢性骨髓炎患者骨组织的转录组信息, 为探究慢性骨髓炎发病的分子机制, 明确 MAPK 信号通路在慢性骨髓炎发病过程中的作用。方法: 收集 2019 年 6 月至 2020 年 6 月就诊的四肢创伤性骨髓炎 4 例, 病灶骨样本 (Necrosis 组) 以及正常骨组织 (Control 组), 使用 Illumina HiSeq Xten 高通量测序平台采集转录组信息, 并采用 FPKM 方法计算基因在骨组织中的表达量。通过对比病灶组织与正常组织的转录本水平, 筛选差异基因, 并进行 GO 富集和 KEGG 富集。采用大鼠骨髓炎动物模型, 选取细胞外信号调节酶 MAP3K7 (mitogen-activated protein 3 kinase 7)、活化 T 细胞核因子 1 (nuclear factor of activated T cells 1, NFATC1) 做差异靶点的免疫组化验证。结果: 高通量测序共获得 5 548 个差异基因, 其中 Necrosis 组上调 2 701 个, 下调 2 847 个。筛选正常骨组织和病灶骨的差异基因中富集到 MAPK 信号通路的基因, 并与破骨细胞分化 (osteoclast differentiation) 信号通路相关的基因取交集, 共有基因为核因子 κ B 激酶亚基 β 抑制剂 I κ BK β (inhibitor of nuclear factor kappa B kinase subunit beta)、MAP3K7、NFATC1、核因子 κ B 亚基 2 (nuclear factor kappa B subunit 2, NF κ B2)。在大鼠骨髓炎模型中, MAP3K7、NFATC1 在骨髓以及损伤骨组织周围高表达。结论: 基于转录组学分析显示慢性骨髓炎的发病和 MAPK 信号通路相关, I κ BK β 、MAP3K7、NFATC1、NF κ B2 有可能成为新的临床诊断和疾病治疗的靶点。

【关键词】 转录组学; 慢性骨髓炎; MAPK 信号通路; 破骨细胞分化信号通路

中图分类号: R681

DOI: 10.12200/j.issn.1003-0034.20221149

开放科学 (资源服务) 标识码 (OSID):

**Transcriptomic characteristics analysis of bone from chronic osteomyelitis**

ZHANG Yang¹, LIU Yi-yang^{2,3}, SHEN Li-feng⁴, LIN Bing-yuan³, SHOU Dan⁵, GUO Qiao-feng³, ZHANG Chun³ (1. Institute of Orthopaedics and Traumatology, the First Affiliated Hospital of Zhejiang Chinese Medical University, Zhejiang Provincial Hospital of Chinese Medicine, Hangzhou 310053, Zhejiang, China; 2. Clinical Medical College of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine of Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing Drum Tower Hospital, Nanjing 210008, Jiangsu, China; 3. Department of Orthopaedics, Tongde Hospital of Zhejiang Province, Hangzhou 310012, Zhejiang, China; 4. Department of Orthopaedics, Sir Run Run Shaw Hospital affiliated with the Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310005, Zhejiang, China; 5. School of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, Zhejiang, China)

ABSTRACT Objective To explore the molecular mechanism of chronic osteomyelitis and to clarify the role of MAPK signal pathway in the pathogenesis of chronic osteomyelitis, by collecting and analyzing the transcriptional information of bone tissue in patients with chronic osteomyelitis. **Methods** Four cases of traumatic osteomyelitis in limbs from June 2019 to June 2020 were selected, and the samples of necrotic osteonecrosis from chronic osteomyelitis (necrotic group), and normal bone tissue (control group) were collected. Transcriptome information was collected by Illumina HiSeq Xten high throughput sequencing platform, and the gene expression in bone tissue was calculated by FPKM. The differentially expressed genes were screened by comparing the transcripts of the Necrotic group and control group. Genes were enriched by GO and KEGG. MAP3K7 and NFATC1 were selected as differential targets in the verification experiments, by using rat osteomyelitis animal model and immunohistochemical analysis. **Results** A total of 5548 differentially expressed genes were obtained by high throughput sequenc-

基金项目: 浙江省基础公益研究计划 (编号: LGF19H060007, LGF20H060004, LGF21H280004, LY20H270002); 浙江省中医药科技计划 (编号: 2021ZA033, 2021ZB060)

Fund project: Basic Public Welfare Research Program of Zhejiang Province (No. LGF19H060007, GF20H060004, LGF21H280004, LY20H270002)

通讯作者: 刘亦杨 E-mail: orthopaedic_liuyy@163.com

Corresponding author: LIU Yi-yang E-mail: orthopaedic_liuyy@163.com

ing by comparing the necrotic group and control group, including 2701 up-regulated and 2847 down-regulated genes. The genes enriched in MAPK pathway and osteoclast differentiation pathway were screened, the common genes expressed in both MAPK and osteoclast differentiation pathway were (inhibitor of nuclear factor κ subunit Beta, I κ BK β), (mitogen-activated protein kinase 7, MAP3K7), (nuclear factor of activated t cells 1, NFATC1) and (nuclear factor Kappa B subunit 2, NF κ B2). In rat osteomyelitis model, MAP3K7 and NFATC1 were highly expressed in bone marrow and injured bone tissue. **Conclusion** Based on the transcriptome analysis, the MAPK signaling and osteoclast differentiation pathways were closely related to chronic osteomyelitis, and the key genes I κ BK β , MAP3K7, NFATC1, NF κ B2 might be new targets for clinical diagnosis and therapy of chronic osteomyelitis.

KEYWORDS Transcriptomics; Chronic osteomyelitis; MAPK pathway; Osteoclast differentiation pathway

伴随社会工业化的进程,慢性骨髓炎的发病率逐年升高,业已成为创伤性骨髓炎的代名词,其病程长,迁延难愈,是骨科的难点和热点问题^[1-2]。其致病菌多样,非手术难以有效控制感染,术后也存在着骨愈合困难,骨不连高发,感染易复发等特点^[3-4]。虽然根据病史、查体、细菌培养及影像学检查可以对大多数慢性骨髓炎作出诊断,但值得注意的是,有约 30% 的患者细菌培养呈阴性,即使作为诊断“金标准”的病理检查,也可能因切片取材问题而出现“假阴性”或其他具有感染性质的结果。因此,深入研究慢性骨髓炎的发病机制,寻找新的诊断方法和精准的诊断指标是目前临床亟待解决的问题,有助于提高诊断的精确度并为治疗新靶点的发现提供依据。转录组包括 mRNA、非编码 RNA 等,是细胞或组织中的所有转录产物的集和,也是研究细胞及整体转录水平的有效手段^[5]。转录组学是指在组织、动物或人水平上研究基因转录、表达和功能。基于转录组学的特点和功能,目前已广泛应用于疾病机制、临床诊断和药物开发等领域^[6]。RNA 测序技术是转录组学研究的有效技术手段^[7]。本研究采用 RNA-Seq 技术筛选慢性骨髓炎患者的骨组织样本与正常骨组织样本的差异表达 mRNA,通过生物信息分析方法探究疾病相关的靶标,为阐述慢性骨髓炎致病机制提供新的研究思路与方向,有利于疾病的早期诊断、治疗。

1 资料与方法

1.1 病例选择

纳入标准:选取创伤导致慢性骨髓炎患者;年龄 18~65 岁;无主要脏器及周围血管病变;无糖尿病及其他免疫系统疾病。排除标准为:年龄<18 岁或者>65 岁,合并有其他脏器疾病或全身情况差而不能耐受手术;患者不配合治疗及随访;糖尿病或其他免疫系统疾病患者。

1.2 研究对象与分组

选取 2019 年 6 月至 2020 年 6 月就诊的四肢创伤性骨髓炎 4 例,男 2 例,女 2 例;年龄 25~60 岁;病程 9~15 个月。病灶部位:胫腓骨 1 例,股骨 1 例,跟骨 2 例。致伤原因:摔伤 2 例,车祸伤 2 例。就诊前患

处手术次数 1~3 次。存在内固定 2 例;2 例存在窦道,2 例存在软组织缺损伴有骨及内固定外露,1 例存在骨缺损;所有患者窦道或创面分泌物细菌培养均为金黄色葡萄球菌。本研究经浙江省立同德医院医学伦理委员会审查通过,伦理审查批号:[2019]046 号。

1.3 研究方法

1.3.1 病理组织学检查 慢性骨髓炎组(Necrosis 组)及对照组(Control 组)样本,置 10% 福尔马林液中固定 24 h 以上,再冲洗后置 EDTA 符合脱钙液脱钙 7 d,脱钙完成后进行脱水、石蜡包埋,置切片机上进行切片(厚度 5 μ m)。切片经过脱蜡;梯度浓度乙醇脱水,蒸馏水清洗等步骤;采用苏木精染液及伊红染液进行染色;染色后在二甲苯溶液中透明;用中性树脂封片;在显微镜下观察切片并拍照。

1.3.2 慢性骨髓炎患者骨组织转录组学研究 骨组织样本 RNA 提取、测序:清创术中收集患者病灶骨样本,去除软组织,并在行自体骨植骨时取自体髂骨颗粒(纯松质骨),用无菌生理盐水冲洗,立即保存于液氮中备用。骨组织样本采用边加液氮边碾磨的方式碾碎,待骨组织成粉末状后,加入 Trizol 提取骨组织的总 RNA,并进行分离和纯化。采用 NanoDrop ND-1000 对总 RNA 的量与纯度进行质控。再通过 Bioanalyzer 2100 对 RNA 的完整性进行检测,浓度>50 ng $\cdot\mu$ l⁻¹,RIN 值(RNA integrity number)>7.0,骨密度吸光度值(optical density, OD)260/280>1.8,总 RNA>1 μ g 满足下游实验。

使用 oligo(dT)磁珠通过两轮的纯化对其中带有(多聚腺苷酸, PolyA)的 mRNA 进行特异性捕获。捕获的 mRNA 在高温下片段化后,在逆转录酶作用下合成为 cDNA。用大肠杆菌 DNA 聚合酶 I, RNase H, 将 DNA 和 RNA 转化成 DNA 双链,将 dUTP 溶液掺入双链 DNA 末端补齐,两端分别加 A 碱基,连接到具有 T 碱基的接头;采用 oligo(dT)磁珠进行筛选和纯化,UDG 酶消化并预变性,形成文库大小为(300 \pm 50) bp 的片段,文库按照 Illumina Novaseq™ 4000 标准操作,进行高通量双端测序。

差异基因筛选:基于边合成边测序技术,在 Illu-

mina HiSeq Xten 高通量测序平台进行测序, 获得原始数据 Raw Data, 并过滤得到 clean Reads, 利用 Trinity 法从头组装 clean Reads。借助于 TopHat2 对测序产生的 clean Reads 与参照基因组进行对比, 得到有关的位置信息, 以及测序样本中的特征信息。使用 FPKM 作为计算转录本或基因表达水平的指标。参照 $\text{Fold Change} \geq 2$ 且 $\text{FDR} < 0.01$ 的标准筛选本研究差异基因。

GO 富集和 KEGG 富集分析: 通过 Ensemble (www.Ensemble.org) 和 NCBI 数据库(www.ncbi.nlm.nih.gov)对测序所得到的差异表达基因进行筛选, 根据 P 值从小到大排序, 选取 Top100 的差异基因, 并注释到基因本体 (gene ontology, GO) 数据库(www.geneontology.org) 和京都基因与基因组百科全书 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) 数据库(www.Kegg.jp)上进行比对分析, 进行 GO 及 KEGG 的富集分析, 绘制 GO 气泡图和 KEGG 热图。

1.3.3 慢性骨髓炎动物模型验证 慢性骨髓炎大鼠模型制备: 采用项目组优化的慢性骨髓炎模型制备方法, 选取健康 SD 大鼠, 6~8 周, 雄性, 体重(200±10) g, SPF 级, 饲养条件为室温 22 °C, 恒湿, 自由饮水。动物使用许可证号: SYXK(浙)20190010, 动物实验在浙江省中医药研究院实验动物中心完成。3%戊巴比妥钠进行麻醉, 于胫骨前内侧缘切开皮肤、筋膜、骨膜, 显露胫骨上端前内侧, 以 1 mm 磨钻在胫骨平台打孔, 用骨蜡封闭孔, 缝合表皮, 注射 $1 \times 10^6 \text{ CFU} \cdot \text{ml}^{-1}$ 金黄色葡萄球菌混悬液。造模后 4 周, 对慢性骨髓炎大鼠模型进行外观观察, 以及 Micro-CT 扫描鉴定以验证模型制备成功。

差异基因免疫组化验证: 模型动物处死取材, 置多聚甲醛中固定 48 h, 再冲洗后置 EDTA 脱钙液脱钙 4 周, 脱水、石蜡包埋切片, 脱蜡, 加 H_2O_2 封闭内源性过氧化物酶; 滴加山羊血清。依次加适当比例稀释的抗 NFATC1、MAP3K7 mAb (4 °C 过夜)、山羊抗兔 IgG 50 μl (室温孵育 10 min) 及 SP-HRP 50 μl (室温孵育 10 min), 最后用 DAB 显色, 封片, 光学显微镜光镜下观察阳性染色细胞数。

1.4 观察项目与方法

本研究对临床慢性骨髓炎骨组织进行影像学及病理组织学检查, 确定为慢性骨髓炎典型病例。取病灶处样本及正常的自体髂骨, 采用转录组测序技术进行 Necrosis 组及 Control 组差异表达基因 (differentially expressed genes, DEGs) 分析, 在此基础上进行 Necrosis 组及 Control 组进行相关性分析, KEGG 通路富集及 GO 功能分析, 最终在慢性骨髓炎大鼠模型进行疾病靶标基因验证。

1.5 统计学处理

采用 SPSS 22.0 软件进行统计学分析, 正态分布定量资料以均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用单因素方差分析进行组间比较, 基因表达量相关性采用 Pearson 相关性分析。

2 结果

2.1 慢性骨髓炎患者影像及病理学检查

对慢性骨髓炎病灶进行影像学及病理检查, 并进行分析。影像学结果表明, 病灶部位出现软组织水肿、骨质破坏或增生、骨膜反应、骨缺损、死骨等。对病灶骨进行 HE 染色, 病理组织学检查结果表明, 病灶组织出现死骨, 局部有淋巴细胞浸润, 有些伴有纤维骨组织退变。以上均是慢性骨髓炎常见的典型特征 (图 1)。

2.2 RNA 检测及质控结果

采用 Nanodrop、Agilent 2100 方法检测样品的 RNA 纯度、浓度和完整性, Bioanalyzer 2100 对 RNA 的完整性进行检测。选取浓度 $> 50 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$, RIN 值 > 7.0 , OD 值 $260/280 > 1.8$, 总 RNA $> 1 \mu\text{g}$ 作为后续测序实验的样本。Control 组 (正常骨) 和 Necrosis 组 (病灶骨) 4 个生物学重复得到的过滤后 clean reads ($\times 10^6$) 以及 clean reads 占比结果表明, clean reads 占比均 $> 90\%$ 。各样本碱基质量值 ≥ 30 占比均 $> 98\%$, 提示测序质量较好。质控合格、样本 RNA 检测结果及测序质量结果见表 1。

2.3 生物学重复样本的基因表达量及相关性分析

Control 组和 Necrosis 组的基因表达量相关性分析结果的 Pearson 相关系数见图 2。相关系数越高, 代表基因表达水平越相似。主成分分析 (principal component analysis, PCA) 分析结果显示, Control 组的 4 个生物学重复样本 Control_1、Control_2、Control_3、Control_4 的检测结果一致性较好, 而 Necrosis 组中生物学重复样品 Necrosis_1 与 Necrosis_2、Necrosis_3 Necrosis_4 存在明显偏离。因此, 为了减少误差, 后续分析将 Necrosis_1 样本数据剔除。

2.4 DEGs 的筛选及聚类分析

Control 组和 Necrosis 组之间检测到 DEGs 5 548 个, 其中 Necrosis 组上调 DEGs 2 701 个, 下调 DEGs 2 847 个。对其中 Top 100 的差异基因进行聚类分析 DEGs ($P < 0.01, q < 0.05, \text{fold change} > 2$) 进行聚类分析, 获得聚类热图 (图 3a), 更直观看到组间 DEGs 表达量的变化以及组内样品表达一致性。

2.5 KEGG Pathway 富集分析以及 GO 生物学过程富集分析

对全部差异基因进行 KEGG 通路富集分析 (pathway) 和 GO 生物学过程 (biological process) 富

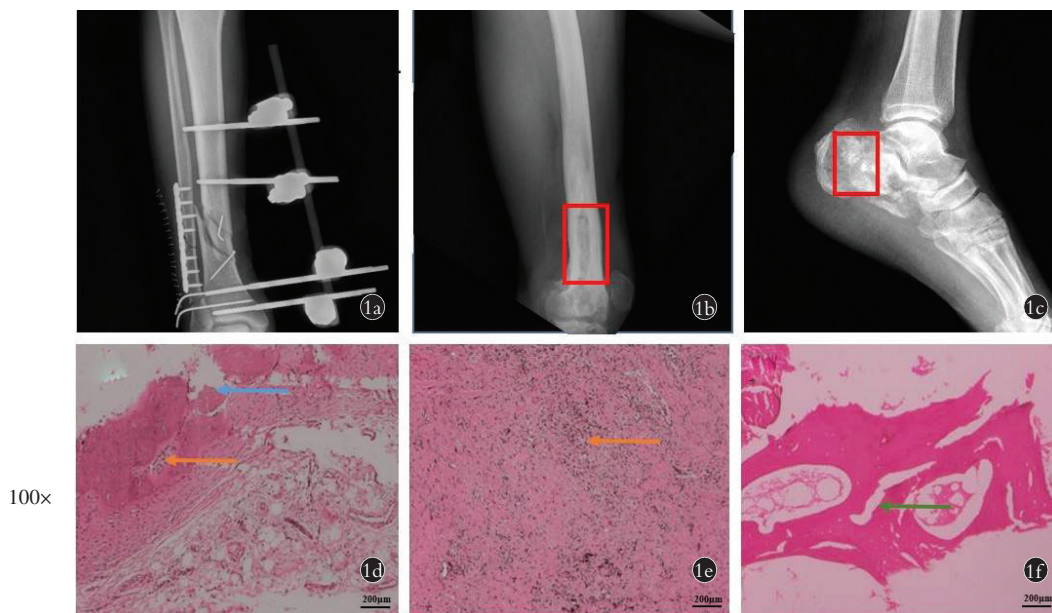


图 1 慢性骨髓炎患者病灶影像学及病理检查结果 **1a.** 胫腓骨骨髓炎病灶部位 X 线 **1b.** 股骨骨髓炎病灶部位 X 线 **1c.** 跟骨骨髓炎病灶部位 X 线 **1d.** 病灶组织骨病理图可见坏死骨组织,骨髓腔内可见淋巴细胞浸润,蓝色箭头为死骨组织,橙色箭头为淋巴细胞浸润(HE×100) **1e.** 病灶组织骨病理图可见骨髓腔中大量淋巴细胞浸润(HE×100) **1f.** 病灶坏死骨组织周围可见组织退变,绿色箭头为纤维骨组织伴退变(HE×100)

Fig.1 Imaging and pathological results of bone lesions in chronic osteomyelitis patients **1a.** Radiogram of tibiofibular osteomyelitis **1b.** Radiogram of femoral osteomyelitis **1c.** Radiogram of calcaneal osteomyelitis **1d.** Necrotic bone tissue was showed in bone tissue of the lesion,lymphocyte infiltration was showed in bone marrow cavity,blue arrows represented dead bone tissue,orange arrows represented lymphocyte infiltration (HE×100) **1e.** A large number of lymphocytes could be seen in the bone marrow cavity (HE×100) **1f.** Tissue degeneration was showed around the necrotic bone tissue,and green arrows represented fibrous bone tissue with degeneration(HE×100)

表 1 质控合格样本 RNA 检测结果及测序质量结果
Tab.1 Results of RNA quality and RAN-sequencing quality for valid samples

组别	O.D. 260/280	Conc./($\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$)	Amount/ μg	RIN 值	Clean reads/($\times 10^6$)	Clean reads/%	碱基质量值 $\geq 30\%$ /%
Necrosis 1	2.036	0.63	20.10	9.00	89.09	96.68	98.20
Necrosis 2	2.13	0.14	3.28	7.90	89.47	95.62	98.24
Necrosis 3	1.48	1.71	51.33	9.3	84.05	95.39	98.34
Necrosis 4	2.13	1.15	34.52	7.4	93.83	95.80	98.35
Control 1	2.15	0.72	72.45	8.50	90.19	93.86	98.14
Control 2	1.95	0.18	5.50	9.20	89.61	94.21	98.18
Control 3	2.18	1.15	95.63	9.00	89.02	96.42	98.38
Control 4	2.15	0.70	20.99	8.80	86.65	96.08	98.38

集分析,见图 3b。KEGG 通路富集主要在 PI3K-AKT 信号通路、Hippo 信号通路,Rheumatoid arthritis, TGF- β 信号通路,TNF 信号通路,Vascular smooth muscle contraction,NF κ B 信号通路,Wnt 信号通路等通路。GO 生物学过程(biological process) 富集分析主要在 skeletal system development,angiogenesis collagen fibril organization,blood vessel development, collagen binding 等生物学过程,见图 3c。

2.6 MAPK 信号通路靶点筛选

由文献资料可知,慢性骨髓炎细菌感染促进

RANKL 介导的破骨细胞生成主要是通过 MAPK 信号通路中 ERK、JNK、P38 通路等,上调转录因子 NFATc1 和 c-FOS 表达,进而促进骨吸收实现的^[8-9]。因此,本研究对 Control 组和 Necrosis 组的 DEGs 中检测到的富集到 MAPK 信号通路的基因进行筛选,并与 Control 组和 Necrosis 组的 DEGs 中破骨细胞分化(osteoclast differentiation)信号通路相关的基因取交集(差异基因与信号通路富集见表 2),发现共有基因有:IkB κ (inhibitor of nuclear factor κ B kinase subunit beta),MAP3K7 (mitogen-activated protein ki-

nase kinase kinase 7), NFATC1 (nuclear factor of activated T cells 1), NFκB2 (nuclear factor κ B subunit 2)。

将上述共有基因与其 GO 功能中与骨形成相关的生物学过程 (biological process) 绘制网络图, 见图 4。结果显示 IκBκβ 与 NF-κB signaling, I-κB phosphorylation, IκB kinase activity, response to virus, kinase activity 等 GO 功能相关; MAP3K7 与 activation of MAPKK activity, activation of MAPK activity, magnesium ion binding, stimulatory C-type lectin receptor 信号通路, positive regulation of T cell cytokine production, MAP kinase kinase activity, transforming growth factor β receptor 信号通路, Wnt 信号通路, calcium modulating pathway, NF-κ B signaling, I-κ B phosphorylation, JNK cascade, I κ B kinase complex, positive regulation of interleukin -2 production, positive regulation of JUN kinase activity 等 GO 功能相关; NFATC1 与 Wnt 信号通路, calcineurin-NFAT signaling cascade, Fc-εpsilon receptor 信号通路, mitogen-activated protein kinase p38 binding, negative regulation of vascular smooth muscle cell differentiation 等 GO 功能相关; NFκ B 2 与 response to lipopolysaccharide, NF-κB2 complex, NF-κB signaling, positive regulation of NF-κB transcription factor activity 等 GO

功能相关。

2.7 慢性骨髓炎动物模型验证及差异基因验证

慢性骨髓炎模型制备 4 周后, 胫骨平台外观观察以及 Micro-CT 三维重建图结果表明, 与空白组比较, 模型组造模局部有窦道形成, 骨感染和骨损伤严重, 有明显骨缺损。提示细菌感染引起骨缺损, 破坏皮质骨结构, 骨愈合困难, 与临床慢性骨髓炎临床表现一致, 提示慢性骨髓炎动物模型制备成功。

选取 NFATC1、MAP3K7 两个差异基因做动物模型上的免疫组化验证, 结果表明, 在模型组的骨髓腔以及块状的损伤骨组织周围, 有大量多核的破骨细胞以及破骨细胞前体细胞, 在上述区域两个指标 NFATC1、MAP3K7 均有阳性表达, 且模型组的 NFATC1、MAP3K7 阳性染色率高于空白对照组 (**P*<0.01, ***P*<0.001), 见图 5。上述结果提示 NFATC1、MAP3K7 可作为慢性骨髓炎的疾病靶标, 见图 6。

3 讨论

破骨细胞的骨吸收与成骨细胞的骨形成的耦联机制是骨重建和骨修复过程的重要环节^[10]。慢性骨髓炎在骨感染过程中, 正常的骨重建过程被炎症改变, 导致骨代谢紊乱。前期研究表明, 细菌内毒素可刺激分泌多种促炎因子, 如肿瘤坏死因子-α (tumor necrosis factor, TNF-α), TNF-α 可结合成骨细胞表

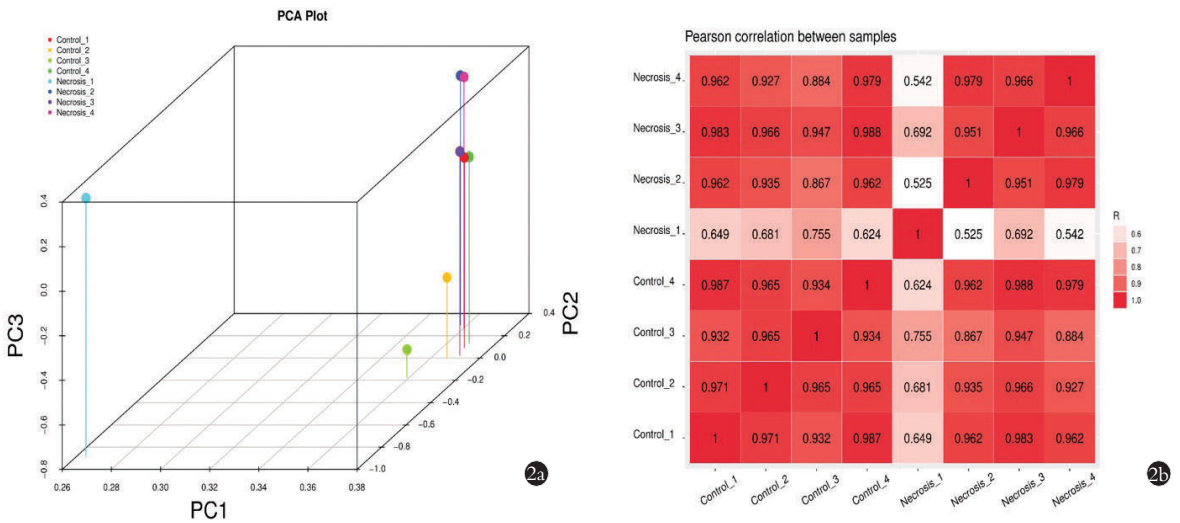


图 2 Control 组 (正常骨) 和 Necrosis 组 (病灶骨) 样本的相关性分析 2a. 主成分分析 (principal component analysis, PCA) 分析 Control 组和 Necrosis 组的样本一致性, Necrosis_1 存在明显偏离 2b. Pearson 相关性分析: Necrosis_1 存在明显偏离

Fig.2 Correlation analysis of control group and necrosis group 2a. Principal component analysis (PCA) is used to analyze the sample consistency of control group and necrosis group_1 There is obvious deviation 2b. Pearson correlation analysis. Necrosis_1 There is obvious deviation

表 2 KEGG 通路中 MAPK、破骨细胞分化信号通路

Tab.2 MAPK and osteoclast differentiation signaling pathways in KEGG Pathway

KEGG 富集分析	DEGs
MAPK 信号通路	MEF2C, NFκB2, ARRB2, CACNB4, MAP3K7, PPM1A, DUSP16, TAOK2, CACNB4, NFATC1, TGFB3, NTRK2, IκBκβ
破骨细胞分化	NFκB2, MAP3K7, TREM2, FOSL2, FOSB, LILRA1, NFATC1, MITF, IFNAR1, NFATC2, IκBκβ, PIK3CA, TNFRSF11A, CTSK

差异基因聚类热图 (Top 100)

KEGG Enrichment Scatter Plot

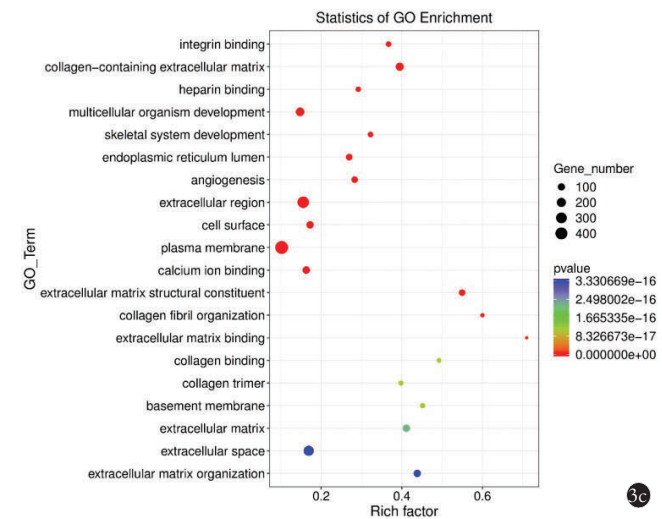
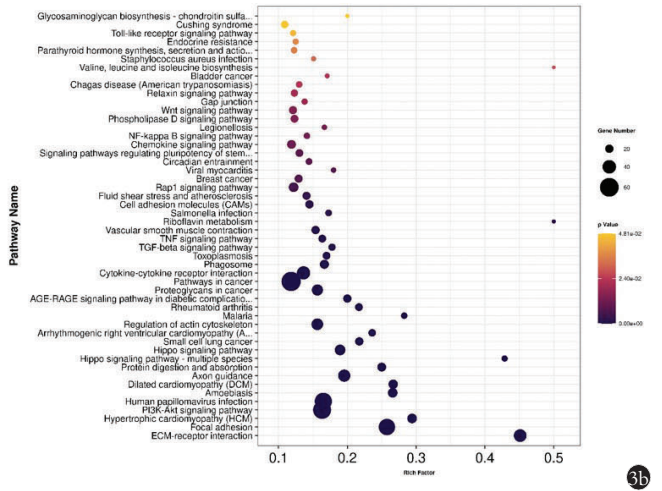
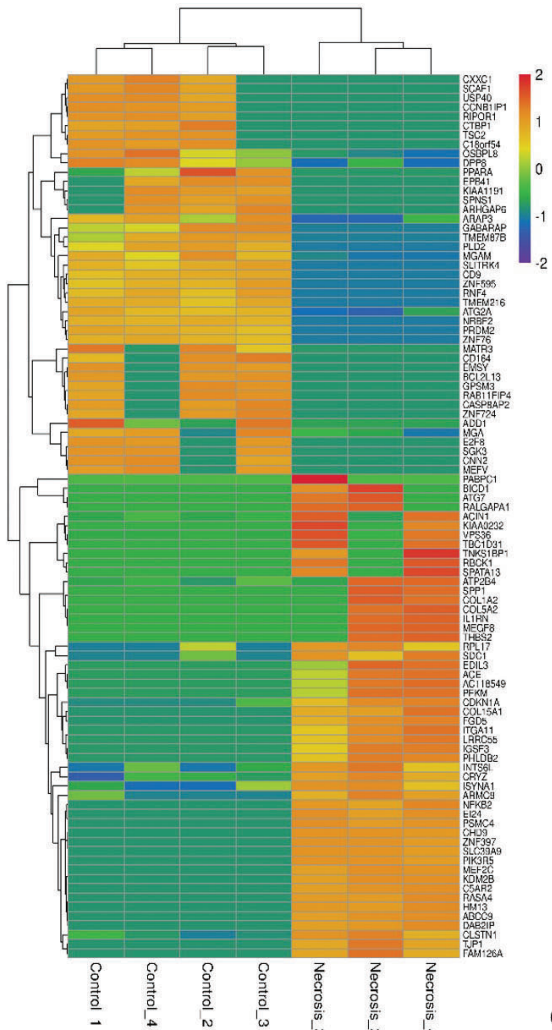


图 3 差异基因聚类分析及功能注释图 3a. Top100 差异基因热图,色块的颜色越红,表达量越高;颜色越蓝,表达量越低 3b. 全部差异基因 KEGG 通路富集 3c. GO 生物学过程富集图

Fig.3 Cluster analysis and functional annotation of differential genes 3a. Heat map of top100 differential gene, the redder the color of the color block, the higher the expression amount; the bluer the color, the lower the expression 3b. KEGG pathway enrichment of differential genes 3c. GO (biological process) enrichment of differential genes

面的肿瘤坏死因子受体 TNFR, 抑制成骨细胞分化相关信号转导通路, 减少骨基质的形成和骨矿化^[11]。另一方面, 细菌内毒素可上调破骨细胞前体细胞的 NF-κB 受体激活蛋白配体 (receptor activator of nuclear factor-κB ligand, RANKL), 使其与受体 RANK 结合, 激活下游的 MAPK 信号通路, MAPK 信号通路激活是通过执行保守的三级酶促级联反应, 最终激活 MAPK (磷酸化), 促进破骨细胞前体融合成为成熟的破骨细胞或增加破骨细胞内功能基因和蛋白的表达^[12]。破骨细胞活性相关信号转导通路主要有: NF-κB 通路、MAPK 通路、PI3K/Akt 通路等^[13]。RANKL 与 RANK 进行配体-受体结合后激活 P38, 活化的 P38 通过下游底物 MAPK 激活蛋白激酶-2,

进而调控下游转录因子 c-fos、NFATc1 表达, 从而促进破骨细胞分化^[14]。NF-κB 通路被认为在破骨细胞激活过程中发挥最重要的作用, 有研究表明 NF-κB 的抑制剂 IκBK 降解, 使 NF-κB 不能进入细胞核中与其靶基因的启动子结合, 从而抑制启动基因转录来调控破骨细胞的分化功能^[15]。上述过程中 NFATc1 和 c-fos 是破骨细胞成熟过程中 2 个关键转录因子, 可诱导破骨细胞特异基因 TRAP、cathepsin K 的表达, 促进骨吸收^[16]。本研究通过转录组学实验, 筛选到与破骨细胞增殖分化以及 MAPK 信号通路相关的靶点 IκBKβ、MAP3K7、NFATC1、NFκB2, 支持了炎症诱导的破骨细胞增殖分化在慢性骨髓炎骨不连的致病机制的作用, 上述基因可能成为慢性骨不连的诊

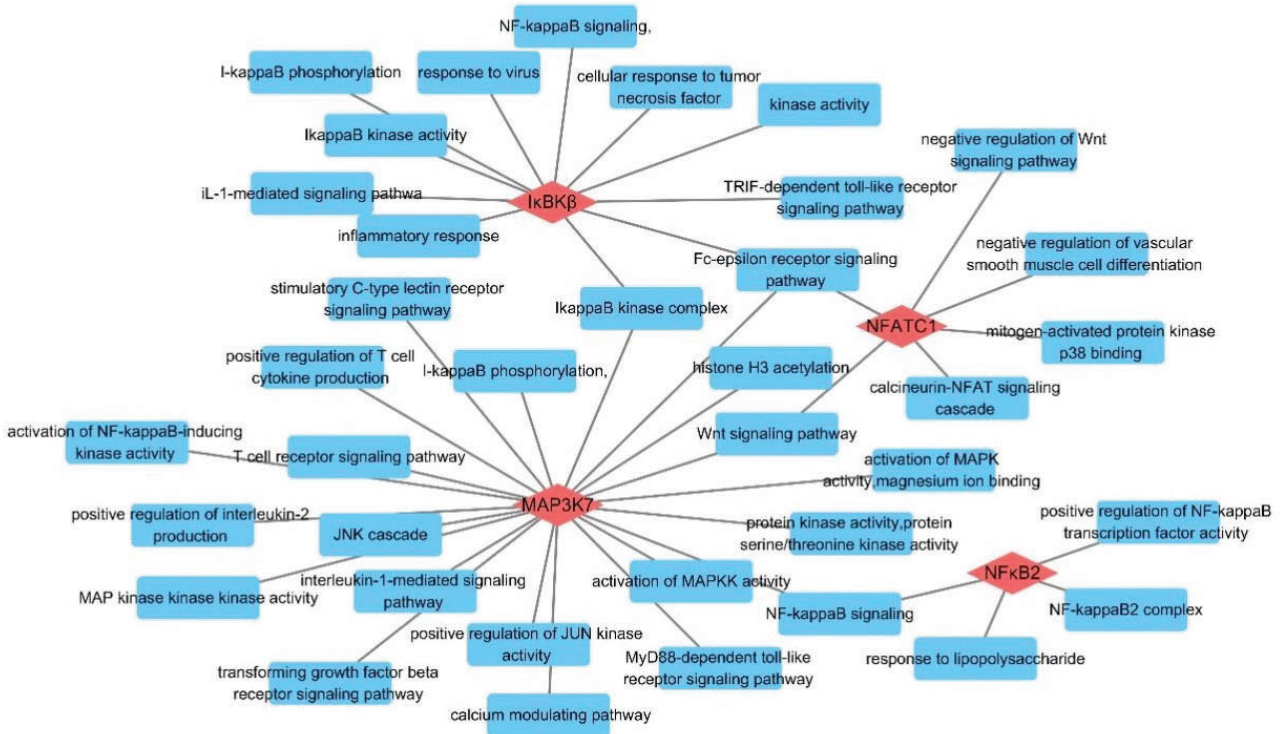


图 4 共有基因 GO 功能网络图

Fig.4 GO functional Network of common genes in MAPK and Osteoclast differentiation signaling pathways

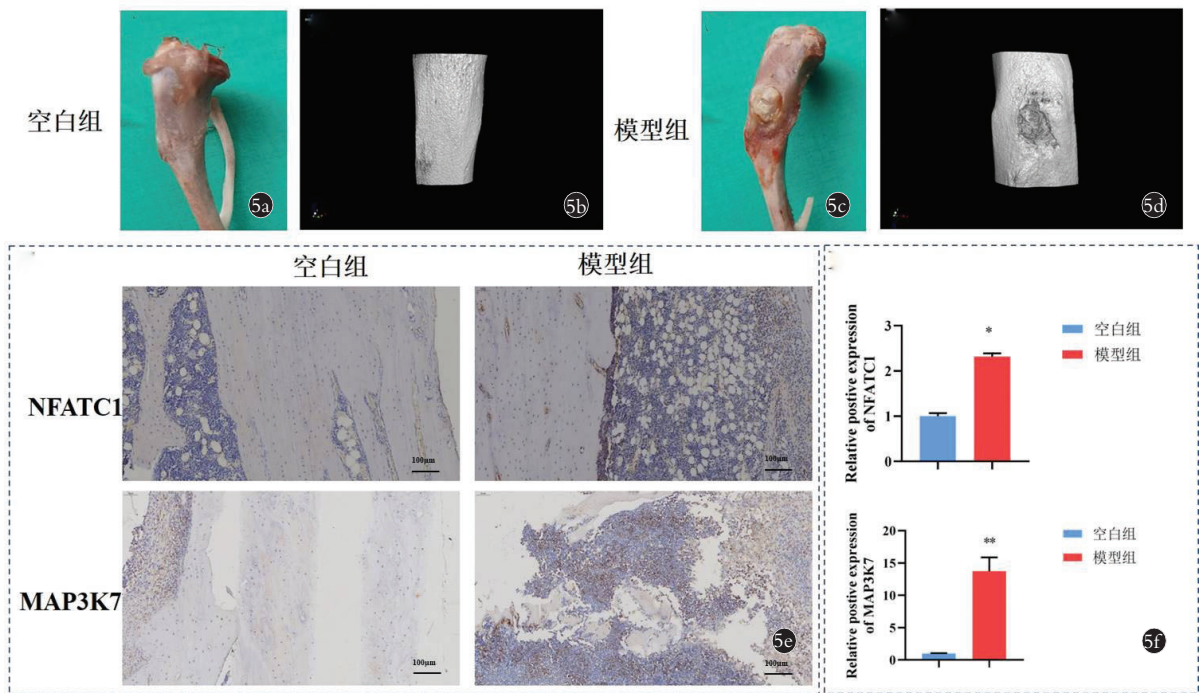


图 5 慢性骨髓炎动物模型验证及差异基因 NFATC1、MAP3K7 在免疫组化验证 5a. 空白组动物胫骨平台外管观察图 5b. 空白组动物胫骨 Micro-CT 三维重建图 5c. 模型组动物胫骨平台外管观察图 5d. 模型组动物胫骨 Micro-CT 三维重建图 5e. NFATC1、MAP3K7 在慢性骨髓炎动物模型的免疫组化结果(HE×100) 5f. NFATC1、MAP3K7 阳性表达相对表达量,与空白组比较, * $P<0.01$, ** $P<0.001$

Fig.5 Validation of animal models of chronic osteomyelitis and different genes expression of NFATC1 and MAP3K7 5a. Observation diagram of the outer tube of the tibial platform of animals in the control group 5b. Micro CT three-dimensional reconstruction diagram of the tibia of animals in the control group 5c. Observation diagram of the outer tube of the tibial platform of animals in the model group 5d. Micro CT three-dimensional reconstruction diagram of the tibia of animals in the model group 5e. Immunohistochemistry results of NFATC1 and MAP3K7 in the animal model of chronic osteomyelitis(HE×100) 5f. Relative positive expressions of NFATC1 and MAP3K7, * $P<0.01$, ** $P<0.001$ Compared with the control groups

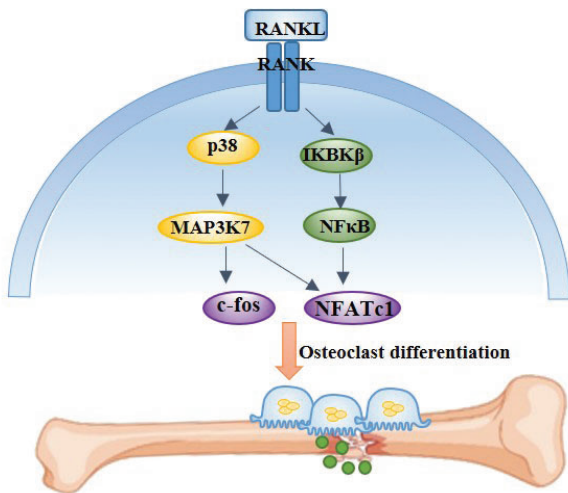


图 6 基于靶点筛选的慢性骨不连机制图

Fig.6 Mechanism diagram of bone nonunion in chronic osteomyelitis based on the screened target genes

断和治疗的潜在靶点。此外,本研究还利用免疫组化学方法,对慢性骨髓炎大鼠模型中 NFATC1、MAP3K7 两个靶标进行检测,结果提示上述 2 个指标在模型动物的骨髓以及损伤骨组织周围高表达,可作为慢性骨髓炎模型的靶标。然而,上述基因以及作用机制在慢性骨髓炎骨不连中的具体调控机制值得在今后的研究中作进一步探讨。

本研究尚存在不足之处,由于临床样本差异较大,基于相关性分析结果,剔除部分样本,以保证后续组间差异基因筛选的可行性;此外,由于病灶骨组织样本 RNA 浓度偏低,本研究选用的样本数有限,后续可在本研究的基础上加大样本量,并进行临床样本的验证实验。本研究预测分析的基因可能在慢性骨髓炎以及感染性骨不连的致病机制中起了重要作用,有可能成为新的防治骨不连的靶点,同时也为临床诊断和治疗提供了可靠的实验依据。

参考文献

[1] MORENO-MATEO F,PEREA S H,ONEL K B. Chronic recurrent multifocal osteomyelitis:diagnosis and treatment[J]. Curr Opin Pediatr,2021,33(1):90-96.
 [2] BIRT M C,ANDERSON D W,TOBY E B,et al. Osteomyelitis:Recent advances in pathophysiology and therapeutic strategies[J]. J Orthop,2016,14(1):45-52.
 [3] 黄凯,林炳远,任海勇,等. 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌感染的四肢创伤性骨髓炎的手术治疗[J].中国骨伤,2021,34(6):550-553.
 HUANG K,LIN B Y,REN H Y,et al. Surgical treatment of traumatic osteomyelitis of extremities with MRSA infection[J]. China J

Orthop Traumatol,2021,34(6):550-553.Chinese.
 [4] KRISHNAN A G,BISWAS R,MENON D,et al. Biodegradable nanocomposite fibrous scaffold mediated local delivery of vancomycin for the treatment of MRSA infected experimental osteomyelitis[J]. Biomater Sci,2020,8(9):2653-2665.
 [5] MALI P. Humanizing transcriptome engineering[J]. Cell,2019,178(1):8-9.
 [6] ROYCHOWDHURY S,CHINNAIYAN A M. Translating cancer genomes and transcriptomes for precision oncology[J]. CA Cancer J Clin,2016,66(1):75-88.
 [7] 冯娜,宋文霞,邵立平,等. 骨肉瘤与尤文肉瘤关键基因 CDC5L 及其生物学功能的生物信息学分析[J]. 中国骨伤,2022,35(3):276-280.
 FENG N,SONG W X,SHAO L P,et al. Bioinformatics-based identification of key genes CDC5L and related pathways in osteosarcoma and Ewing's sarcoma[J]. China J Orthop Traumatol,2022,35(3):276-280. Chinese.
 [8] 杨羽晨,杨佩佩,黄碧莹,等. 丝裂原活化蛋白激酶信号通路介导的自噬可调节破骨细胞的增殖分化和功能[J]. 中国组织工程研究,2021,25(26):4192-4197.
 YANG Y C,YANG P P,HUANG B Y,et al. Autophagy regulates osteoclast proliferation,differentiation and function through mitogen-activated protein kinase signaling pathway[J]. Chin J Tissue Eng Res,2021,25(26):4192-4197. Chinese.
 [9] SHEN X J,KONG S,YANG Q,et al. PCAT-1 promotes cell growth by sponging miR-129 via MAP3K7/NF-κB pathway in multiple myeloma[J]. J Cell Mol Med,2020,24(6):3492-3503.
 [10] KIM J M,LIN C J,STAVRE Z,et al. Osteoblast-osteoclast communication and bone homeostasis[J]. Cells,2020,9(9):2073.
 [11] MBALAVIELE G,NOVACK D V,SCHETT G,et al. Inflammatory osteolysis:a conspiracy against bone[J]. J Clin Invest,2017,127(6):2030-2039.
 [12] HUSAIN A,JEFFRIES M A. Epigenetics and bone remodeling[J]. Curr Osteoporos Rep,2017,15(5):450-458.
 [13] YEUNG Y T,AZIZ F,GUERRERO-CASTILLA A,et al. Signaling pathways in inflammation and anti-inflammatory therapies[J]. Curr Pharm Des,2018,24(14):1449-1484.
 [14] FUNAKUBO N,XU X H,KUKITA T,et al. Pmpa1 induced by RANKL-p38 MAPK pathway has a novel role in osteoclastogenesis[J]. J Cell Physiol,2018,233(4):3105-3118.
 [15] JIMI E,TAKAKURA N,HIURA F,et al. The role of NF-κB in physiological bone development and inflammatory bone diseases: is NF-κB inhibition "killing two birds with one stone"[J]. Cells,2019,8(12):1636.
 [16] 洪一波,姜宏,王建伟,等. 芒柄花素抑制 RANKL 诱导破骨细胞分化的实验研究[J]. 中国骨伤,2020,33(1):64-70.
 HONG Y B,JIANG H,WANG J W,et al. Experimental study on the inhibition of Formononetin on the differentiation of osteoclasts induced by RANKL[J]. China J Orthop Traumatol,2020,33(1):64-70. Chinese.

(收稿日期:2023-04-17 本文编辑:王玉蔓)