

基于生物信息学筛选骨关节炎关键基因与信号通路

艾芯¹, 谢羽婕², 罗希², 张驰²
(西南医科大学, 1. 护理学院; 2. 附属医学院康复系, 四川 泸州 646000)

【摘要】目的: 基于生物信息学挖掘骨关节炎(OA)的关键基因和通路, 并利用体外软骨细胞模型进行验证。**方法:** 本研究基于 GEO 数据库中的 GSE269735 数据集, 运用加权基因共表达网络分析(WGCNA)识别关键基因模块, 结合差异表达基因(DEGs)分析筛选候选基因。对 DEGs 与 WGCNA 关键基因模块的共同基因进行 GO 和 KEGG 通路分析, 通过 STRING 数据库和 Cytoscape 软件识别 DEGs 中的关键基因。为验证筛选结果的稳健性, 选用 GSE2204879 数据集进行交叉验证, 并以 CSF-1 为候选基因, 构建质粒在 OA 软骨细胞中进行转染干扰实验。最终通过 Western blot 检测 CSF-1 在细胞水平的表达变化, 并评估其对细胞功能的影响, 验证其在 OA 中的潜在作用。**结果:** WGCNA 分析识别出多个与 OA 表型密切相关的模块, 与 DEGs 共同筛选出关键基因。GO 与 KEGG 分析显示, 主要生物过程涉及细胞因子活性、趋化因子活性、胶原结合等。关键基因包括 CCL20、CSF-1、CXCL11、CXCL3、CXCL5、CXCR4。在 GSE2204879 数据集中, CSF-1 和 CXCR4 仍表现出一致的表达趋势。细胞水平方面, CSF 和 CXCR4 在 OA 模型细胞中表达增加。进一步构建 CSF-1 敲低质粒并转染 OA 软骨细胞, 结果显示, CSF-1 敲低伴随 CXCR4 的表达水平下降, 并降低了细胞中 MMP3 和 MMP13 的表达水平, 增加了 Col2a1 的蛋白表达水平, 提示 CSF-1 可能通过调控 CXCR4 参与 OA 炎症反应与基质降解过程。**结论:** 本研究基于生物信息学与细胞实验相结合的方法, 筛选出多个与 OA 密切相关的关键基因。其中 CSF-1 和 CXCR4 在 OA 中呈高表达, 表明 CSF-1 可能通过调控 CXCR4 表达, 参与 OA 炎症反应和基质降解过程。CSF-1 可能是 OA 的关键致病因子和潜在治疗靶点。

【关键词】 骨关节炎; 基因表达数据库; 加权基因共表达网络; 软骨细胞
【中图分类号】 R684.3 **【文献标志码】** A

Screening of key genes and signaling pathways in osteoarthritis based on bioinformatics

AI Xin¹, XIE Yu-jie², LUO Xi², ZHANG Chi²
(1. School of Nursing, Southwest Medical University; 2. Department of Rehabilitation, Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000, Sichuan, China)

【Abstract】Objective: To mine key genes and pathways of osteoarthritis (OA) based on bioinformatics and validate them using an in vitro chondrocyte model. **Methods:** This study was based on the GSE269735 dataset from the GEO database, using Weighted Gene Co-expression Network Analysis (WGCNA) to identify key gene modules, combined with differential expression gene (DEGs) analysis to screen candidate genes. GO and KEGG pathway analyses were performed on the common genes between DEGs and WGCNA key gene modules, with STRING database and Cytoscape software used to identify key genes in DEGs. To validate the robustness of the screening results, the GSE2204879 dataset was used for cross-validation, and a plasmid was constructed with CSF-1 as the candidate gene for transfection interference experiments in OA chondrocytes. Finally, the expression changes of CSF-1 at the cellular level were detected by Western blot, and its effects on cellular function were evaluated to verify its potential role in OA. **Results:** WGCNA analysis identified multiple modules closely related to OA phenotypes, and key genes were co-screened with DEGs. GO and KEGG analysis showed that the main biological processes involved cytokine activity, chemokine activity, collagen binding, etc. Key genes included CCL20, CSF-1, CXCL11, CXCL3, CXCL5, CXCR4. In the GSE2204879 dataset, CSF-1 and CXCR4 still showed a consistent expression trend. At the cellular level, CSF and CXCR4 were upregulated in OA model cells. Further, a CSF-1 knockdown plasmid was constructed and transfected into OA chondrocytes, and the results showed that CSF-1 knockdown suppressed CXCR4 expression, reduced the expression levels of MMP3 and MMP13 in the cells, and increased the protein expression level of Col2a1, suggested that CSF-1

may participate in OA inflammatory response and matrix degradation process by regulating CXCR4. **Conclusion:** This study, combining bioinformatics and cellular experiments, has screened out multiple key genes closely related to OA. Among them, CSF-1 and CXCR4 show high expression in OA. The experiments indicate that CSF-1 may participate in OA inflammatory response and matrix degradation process by regulating CXCR4 expression. In summary, CSF-1 may be a key pathogenic factor and potential therapeutic target for OA.

【Key words】 Osteoarthritis; Gene expression database; Weighted gene co-expression network; Chondrocytes

骨关节炎(osteoarthritis, OA)是一种以关节软骨退变、滑膜炎及骨赘形成为特征的慢性退行性疾病,是中老年人群致残的主要原因之一^[1]。其病程缓慢但不可逆,不仅严重影响患者的活动能力与生活质量,还给社会带来严重的经济负担^[2]。尽管目前临床干预手段包括药物缓解、物理治疗及关节置换等^[3],但仍缺乏针对疾病本质机制的早期诊断标志物及有效靶向治疗手段。OA 的发生发展过程受多种因素调控,包括机械刺激、细胞因子、炎症通路及细胞外基质的动态变化等^[4-6]。近年来,随着转录组高通量测序技术的快速发展,系统生物学方法被广泛应用于 OA 相关基因网络的挖掘,为揭示其潜在的分子机制提供了新思路。其中,加权基因共表达网络分析(weighted gene co-expression network analysis, WGCNA)可基于基因表达谱构建协同表达模块,并结合表型数据识别关键调控基因,在 OA 研究中具有广泛应用前景。同时,差异表达基因(differentially expressed genes, DEGs)分析作为传统的筛选手段,能够捕捉在病理状态下显著变化的功能基因。通过将 WGCNA 与 DEG 筛选结果交叉分析,进一步进行功能富集与蛋白互作网络(protein-protein interaction, PPI)构建,有助于从全局视角定位 OA 中的核心调控因子。因此,本研究基于 GEO 数据库中的 GSE269735 数据集,综合运用 WGCNA 与 DEG 分析方法,筛选与 OA 密切相关的关键基因,并通过 GO/KEGG 功能注释及蛋白互作网络分析,识别潜在调控靶点。最后结合软骨细胞炎症模型,通过蛋白水平验证候选基因的表达变化,以期 OA 的分子机制研究及靶向治疗提供理论依据与实践基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物与细胞 本实验设计经西南医科大学动物研究委员会批准(批准号:20251203-001),所使用的动物均获得了合法的使用许可,许可证编号为 SYXK(川)2023-0017。所有动物饲养与处置均符合西南医科大学实验动物伦理委员会相关规定。取大鼠膝关节软骨组织消化获得软骨细胞,采用 DMEM/F12 培养基于 37℃、5% CO₂ 恒温培养箱中培养,传至第 3 代细胞用于后续实验。

1.1.2 主要试剂与仪器 DMEM/F12 培养基(Gibco 批号:6124050),胎牛血清(Viva Cell 批号:2408213),0.25%胰蛋白酶, PBS 缓冲液(Solarbio 批号:P1022);II 型胶原酶(Gibco 批号:17101015);甲苯胺蓝染色液(solarbio 批号:G3660);重组鼠白介素 1 β (Abcam 批号:GR3384878-2);Col2a1(abcam 批号:ab188570)、GAPDH(proteintech 批号:60004-1-Ig)、CXCR4(proteintech 批号:60042-1-Ig)、CSF-1(sigma 批号:SAB2109050),MMP3(proteintech 批号:17873-1-AP);MMP13(proteintech 批号:83188-4-RR)山羊抗小鼠/兔 IgG 复合物(中杉金桥, PV-9000)

1.2 方法

1.2.1 芯片数据处理 从 GEO 数据库中选择与骨关节炎有关的 GSE269735 作为研究数据集。共有 8 例样本,其中 4 例对照组,4 例 OA 组。利用 R 软件(Rstudio V4.4.2)中的“GEOquery”包下载表达数据及平台注释信息。随后对芯片数据进行质量检验,去除注释信息不完整的探针以及重复的基因。对数据进行标准化处理,并通过计算样本之间的相关性生成样本的层次聚类图,用于评估样本间的相似性。

1.2.2 软阈值选择与邻接矩阵构建 使用 WGCNA 包中的 pickSoftThreshold 函数,根据相关系数 $P > 0.9$ 的标准,确定合适的软阈值。该阈值确保网络具备尺度无关性,且能精确反映基因之间的关系。基于选定的阈值计算邻接矩阵,将基因之间的共表达关系进行加权计算,以生成共表达网络。

1.2.3 拓扑重叠矩阵(topological overlap matrix, TOM)与模块识别 将邻接矩阵通过拓扑重叠矩阵(TOM)进行转换,用以计算不同基因的拓扑相似性。随后使用动态剪切树算法,识别共表达模块,确保模块内部的基因具有高度的共表达。随后,计算各基因模块与表型的相关性。筛选出与表型关联最强的模块,作为关键基因模块

1.2.4 筛选的基因的差异表达基因(differentially expressed genes, DEG)分析 使用 limma 包进行线性模型拟合,基于 OA 患者样本和正常对照样本,筛选出差异表达基因(DEG)。设定 $|\log_2FC| > 1.5$, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义的筛选标准,使

用 log2FC 和 P 值来判断基因的上调或下调,绘制出差异常基因的火山图,利用韦恩图与 WGCNA 中的关键基因模块挑选出显著基因用于后续分析。

1.2.5 GO 和 KEGG 分析与 PPI 网络的构建 通过 R 中的 clusterProfiler 包,对 DEG 基因进行 GO 和 KEGG 富集分析。筛选出显著富集的 GO 条目和 KEGG 通路($P<0.05$)。将筛选出的 DEG 基因导入 STRING 数据库中绘制蛋白-蛋白互作 (protein-protein interaction, PPI) 网络。将得出的网络导入 Cytoscape 软件中使用 Mcode 插件计算进一步识别关键子网络。

1.2.6 蛋白互作网络构建及关键基因筛选 通过 STRING 数据库(<https://string-db.org/>)构建 PPI 网络,最低互作分数设定为 0.4。PPI 网络结果导入 Cytoscape(v3.9.1)软件,使用 Mcode 筛选联系紧密的基因。

1.2.7 软骨细胞提取 取 1 周龄 SD 大鼠颈椎脱臼处死,75%乙醇浸泡 5 min 消毒后,在无菌条件下剥离膝关节软骨,剪碎为约 1 mm³ 小块。PBS 冲洗 2~3 次后加入 0.25%胰蛋白酶,37℃消化 6~8 h,弃上清后换 0.25% II 型胶原酶继续孵育过夜。次日离心收集细胞,以含 10%胎牛血清的 DMEM/F12 培养基重悬,接种于培养瓶,37℃、5% CO₂ 培养,隔日换液。待细胞融合达 70%~80%传代,实验取第 3 代细胞,以 2×10⁵ 个/孔密度接种 6 孔板备用。

1.2.8 软骨细胞鉴定 细胞形态通过倒置显微镜观察并拍照,为检测细胞合成的硫酸化糖胺聚糖,使用甲苯胺蓝染色。细胞用 PBS 洗涤后以 4%多聚甲醛固定 10 min,加入 0.1%甲苯胺蓝染液染色 30 min,洗净多余染液后,于显微镜下观察。此外,对软骨细胞进行 Col2a1 免疫荧光染色,将细胞接种于爬片上,PBS 洗涤后以 4%多聚甲醛固定 10 min,随后用 0.2% Triton X-100 透化 10 min,并用 5% BSA 封闭 1 h。之后孵育一抗于 4℃过夜,再孵育 Alexa Fluor 488 标记的二抗(绿色),DAPI 用于核染色(蓝色)。最终在荧光显微镜下观察并成像。

1.2.9 骨关节炎模型建立 通过 IL-1 β (10 ng/mL)刺激软骨细胞 24 h 建立 OA 炎症模拟模型,用于验证关键基因在 OA 环境下的表达变化。

1.2.10 蛋白表达检测 细胞经收集后以 12 000 r/min 离心 30 min,取上清液提取总蛋白。采用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度,确保样品加载量一致。等量蛋白样品经 SDS-PAGE 凝胶电泳分离后转移至 PVDF 膜上。膜经 5%脱脂奶粉封闭 1 h,随后加入一抗(稀释比例 1:1 000)于 4℃条件下孵育过夜。次日用 TBST 缓冲液洗膜 3 次,每次

10 min;接着加入 HRP 标记的二抗(稀释比例 1:10 000),室温孵育 1 h 后再次用 TBST 洗膜 3 次。最后采用化学发光法进行显影,图像采集与分析使用 ImageJ 软件完成。

1.2.11 质粒转染方法 CSF-1 转染质粒购买于森灵公司,将软骨细胞接种于 6 孔板中(2×10⁵ 个/孔),培养至 70%~80%融合度后进行转染。实验分为三组:对照组(NC)、空载质粒阴性对照组(Sh-NC)和 CSF-1 基因敲低组(Sh-CSF)。使用 Lipofectamine 3000 转染试剂按照说明书操作,转染体系为每孔加入 2.5 μ g 质粒,置于无血清培养基中孵育 8 h 后更换为完全培养基。于转染后 72 h 收集细胞,用于 Western blot 实验。

1.3 统计学分析

采用 GraphPad Prism 9.0 或 SPSS 26.0 软件进行统计分析。所有实验数据以($\bar{x}\pm s$)表示;两组间比较采用独立样本 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),非正态数据以 [$M(P_{25}, P_{75})$]表示并采用 Kruskal-Wallis H 检验。所有检验均为双侧检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 芯片数据预处理

对 GSE269735 芯片数据进行质量检验,去除注释信息不完整的探针以及重复的基因。经标准化处理与过滤后,筛选出表达变异程度最高的前 25%基因用于 WGCNA 分析,并通过计算样本之间的相关性生成样本的层次聚类图(图 1A),样本分组与聚类趋势基本一致(图 1B)。

2.2 WGCNA 构建与模块识别

为构建符合无尺度网络特性的共表达网络,通过软阈值筛选($\beta=3$)获得最优构建条件(图 1C)。根据 TOM 矩阵的聚类结果共识别出 10 个基因模块,颜色深浅代表 Pearson 相关系数大小,括号内为相关性数值与 P 值(图 1D)。

2.3 模块与 OA 表型的相关性分析

将模块特征基因(ME)与 OA/Normal 表型进行 Pearson 相关性分析,发现蓝色模块(blue)与 OA 表型正相关($\text{cor}=0.96, P<1\text{e-}200$),为后续分析的重点模块(图 2A)。

2.4 核心基因的筛选

通过 R 软件的“limma”包对上述筛选出的关键基因进行差异分析($|\log_2\text{FC}|>1, P<0.05$),共有 14 643 个基因,其中上调基因 282 个,下调基因 144 个(图 2B)。利用韦恩图挑选出与蓝色模块中相同的关键基因 369 个进行后续分析(图 2C)。

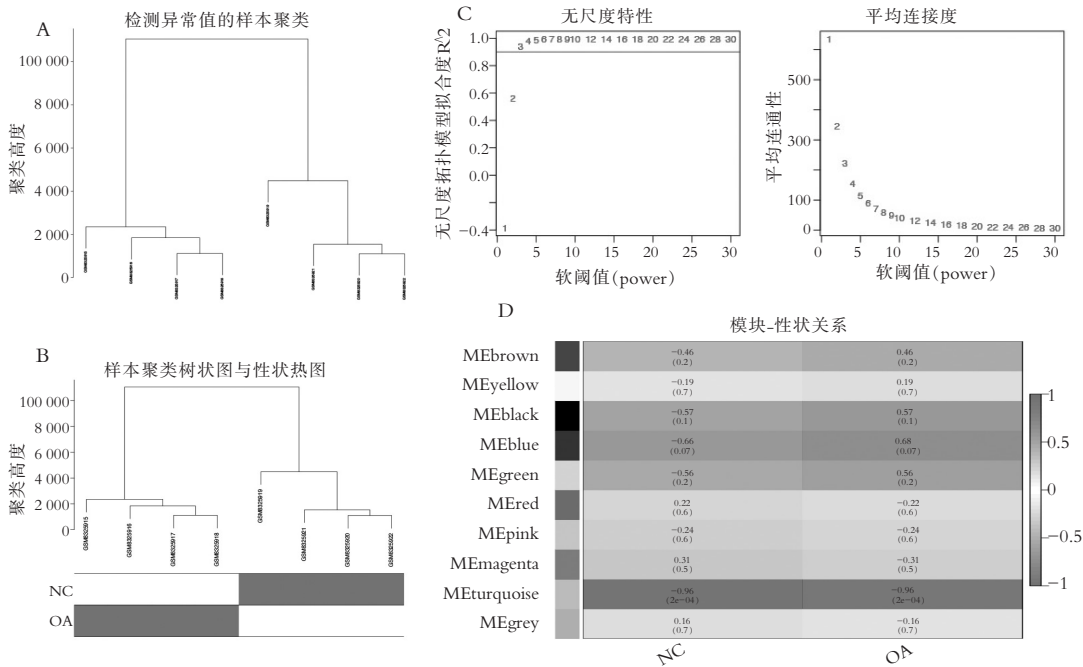


图 1 WGCNA 分析结果

A. 样本聚类图用于检测离群样本;B. 样本聚类与性状热图;C. 软阈值筛选图;D. 模块与表型的相关性热图。

2.5 核心基因富集分析

GO 功能富集分析中包括生物过程 (biological process, BP)、细胞组分 (cellular component, CC) 和分子功能 (molecular function, MF), 每个条目的富集程度以 Enrichment Score 表示。在 BP 类条目中, 显著富集于对脂多糖应答、细胞因子介导的信号通路、细菌来源分子应答等炎症相关过程, 提示这些基因可能参与 OA 软骨的免疫激活与感染应答; 在 CC 类条目中, 基因主要定位于内质网腔、血小板 α 颗粒、胶原含量细胞外基质等结构域, 说明其在软骨结构成分及胞外基质降解中的作用; 在 MF 类条目中, 富集于细胞因子活性、趋化因子活性、胶原结合等功能, 表明该模块基因可能通过调节细胞因子与胶原相关通路参与 OA 的炎症与组织重塑过程 (图 2D)。

KEGG 通路分析显示, 富集于炎症和免疫相关通路, 如细胞因子-受体相互作用、肿瘤坏死因子信号通路、白细胞介素-17 信号通路; 关键基因如 CSF-1、IL1B、TNF 等在多个通路中呈现高表达 (图 2E-F)。

2.6 PPI 网络构建

将 DEGs 基因导入 STRING 数据库, 构建 DEG 基因网络的 PPI 网络, 随后将 PPI 网络导入到 Cytoscape 软件中 (图 3A), 利用 MCODE 聚类分析进一步识别关键子网络 (图 3B), 筛选出以 CXCL1、

CCL20、CXCL11 为核心的免疫调控子模块, 显示这些基因在趋化因子信号通路中具有强耦合关系 (图 3C)。在 GSE269735 数据集中对候选枢纽基因表达水平进行比较, 骨关节炎组 (OA) 与正常组 (NC) 软骨细胞样本中 8 个筛选出的关键基因的表达量情况比较。结果显示, CCL20、CSF-1、CXCL11、CXCL3、CXCL5、CXCR4 在 OA 组中上调 ($P < 0.05$), 其中 CSF-1 和 CXCR4 的表达水平差异有统计学意义 ($P < 0.001$)。提示其在 OA 发病中的重要作用。相比之下, CSF2 在 OA 组中虽有升高趋势, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$, 图 3D)。CSF-1 和 CXCR4 在 GSE220487 数据集中表达量也增加 (图 3E)。这些结果与 WGCNA 筛选结果及功能富集分析高度一致, 进一步支持了该等关键基因在 OA 炎症反应和细胞间信号调控中的潜在机制价值。

2.7 软骨细胞鉴定与关节炎模型

通过倒置显微镜观察, 细胞呈多角形贴壁生长, 排列均匀, 状态良好 (图 4A)。甲苯胺蓝染色结果显示, 细胞外基质中存在明显的紫蓝色染色区域, 提示细胞具备糖胺聚糖的合成能力 (图 4B)。免疫荧光结果显示, 目标蛋白主要定位于细胞质中, 表现为绿色荧光信号, 细胞核经 DAPI 染色呈蓝色 (图 4C)。结果表明, II 型胶原在在细胞中表达丰富, 为软骨细胞。

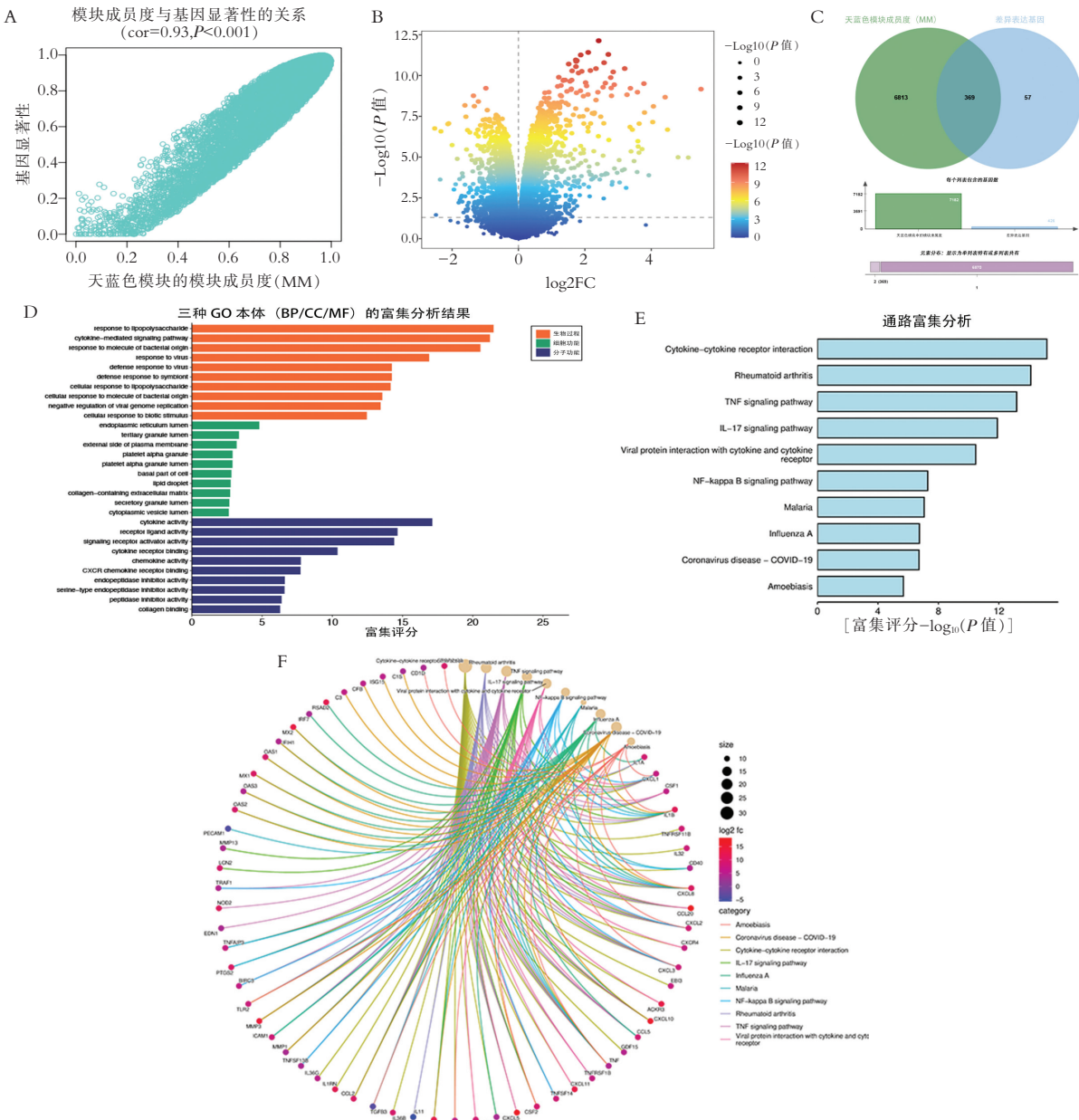
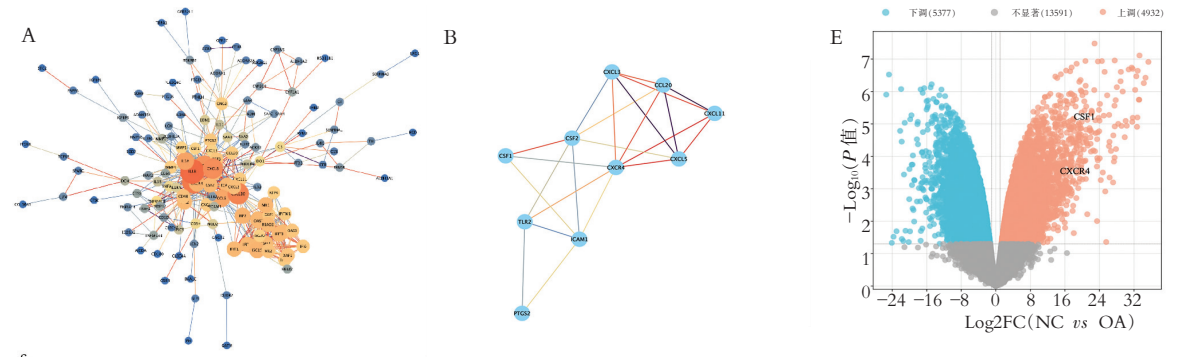


图 2 关键基因的差异表达与功能富集分析

A. 模块特征基因聚类热图;B. 火山图;C. 蓝色模块与 DEGs 交叉韦恩图;D. 关键基因 GO 富集分析;E. 关键基因 KEGG 富集分析;F. 关键基因的富集分析 cnet 图。



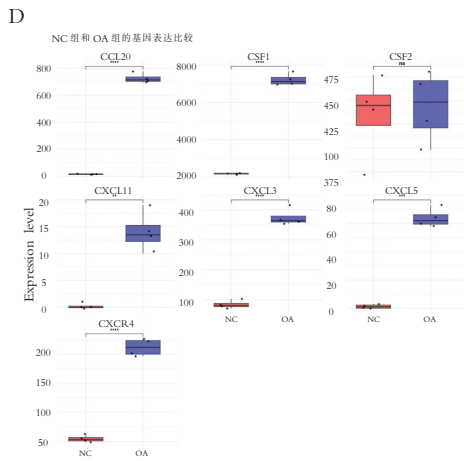
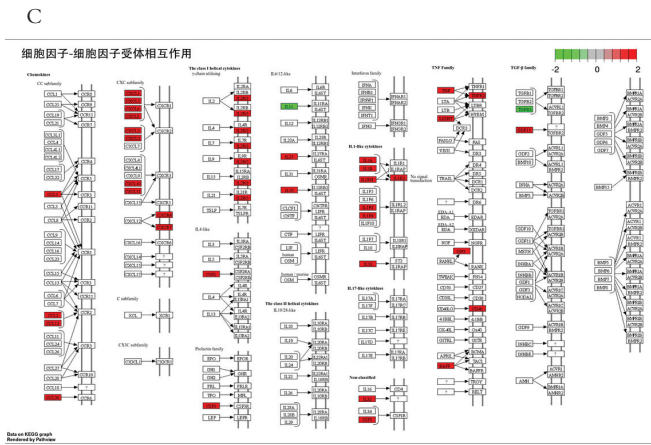


图 3 骨关节炎相关关键基因的 PPI 网络及表达验证

A. 蛋白-蛋白互作网络;B. MCODE 筛选得到的高密度子网络;C. KEGG 通路图注释;D. 基因表达量验证;E. GSE220487 的火山图。

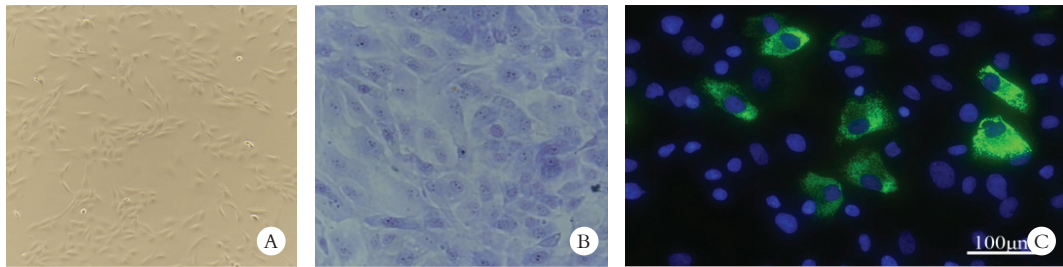


图 4 软骨细胞的形态学观察与表型鉴定

A. 显微镜下观察细胞形态;B. 甲苯胺蓝染色结果;C. 免疫荧光染色结果。比例尺:100 μm 。

2.8 骨关节炎模型细胞中的表达与验证

利用免疫印记(WB)检测 CXCR4 与 CSF-1 在正常软骨细胞(NC 组)与骨关节炎细胞(OA 组)中的蛋白表达水平。结果显示,与 NC 组相比,OA 组中 CXCR4 与 CSF-1 的表达水平均升高(图 5A)。热图分析(图 5B)与灰度值定量结果(图 5C)一致, CXCR4 与 CSF-1 在 OA 组中均表现出上调趋势 ($P<0.01$)。以上结果提示, CXCR4 与 CSF-1 可能参与 OA 的发生发展过程,具有潜在的诊断或干预价值。

2.9 CSF-1 影响 ECM 的合成与降解

为探究 CSF-1 对 CXCR 表达的调控作用,首先通过质粒转染敲低 OA 软骨细胞中 CSF-1 表达,并观察转染效率(图 6A-B),随后采用 WB 检验 CXCR4 与 CSF-1 蛋白在各组间的表达变化(图 6C)。结果显示,与 NC 组相比, Sh-NC 组表达水平无明显差异($P>0.05$),而 Sh-CSF 组中 CXCR4 及 CSF-1 表达水平均下降($P<0.05$)。与热图及灰度值定量结果(图 6D-E)一致。提示, CSF-1 敲低可有效下调 CXCR4 的表达。进一步探究 CSF-1 在 ECM 中的作用,利用 WB 检测 ECM 合成与代谢的重要蛋白

表达水平。结果显示,与 Sh-NC 组相比, Col2a1 在 Sh-CSF 组中表达水平升高($P<0.05$),而 MMP13 与 MMP3 的表达水平均下降(图 6F)。热图分析(图 6G-I)结果进一步验证上述变化趋势。这些结果提示敲低 CSF-1 可促进 ECM 主要结构蛋白 Col2a1 的合成,并抑制 MMPs 介导的基质降解过程。

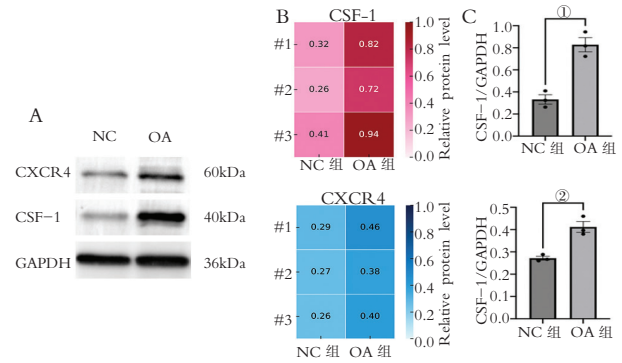


图 5 骨关节炎模型软骨细胞中 CSF-1 和 CXCR4 的表达变化

A. 两组 CXCR4 和 CSF 的蛋白印迹图;B. 3 组独立实验中 CSF 与 CXCR4 的相对表达热图;C. CXCR4 与 CSF 的灰度值定量柱状图,① $P<0.05$;② $P<0.01$ 。

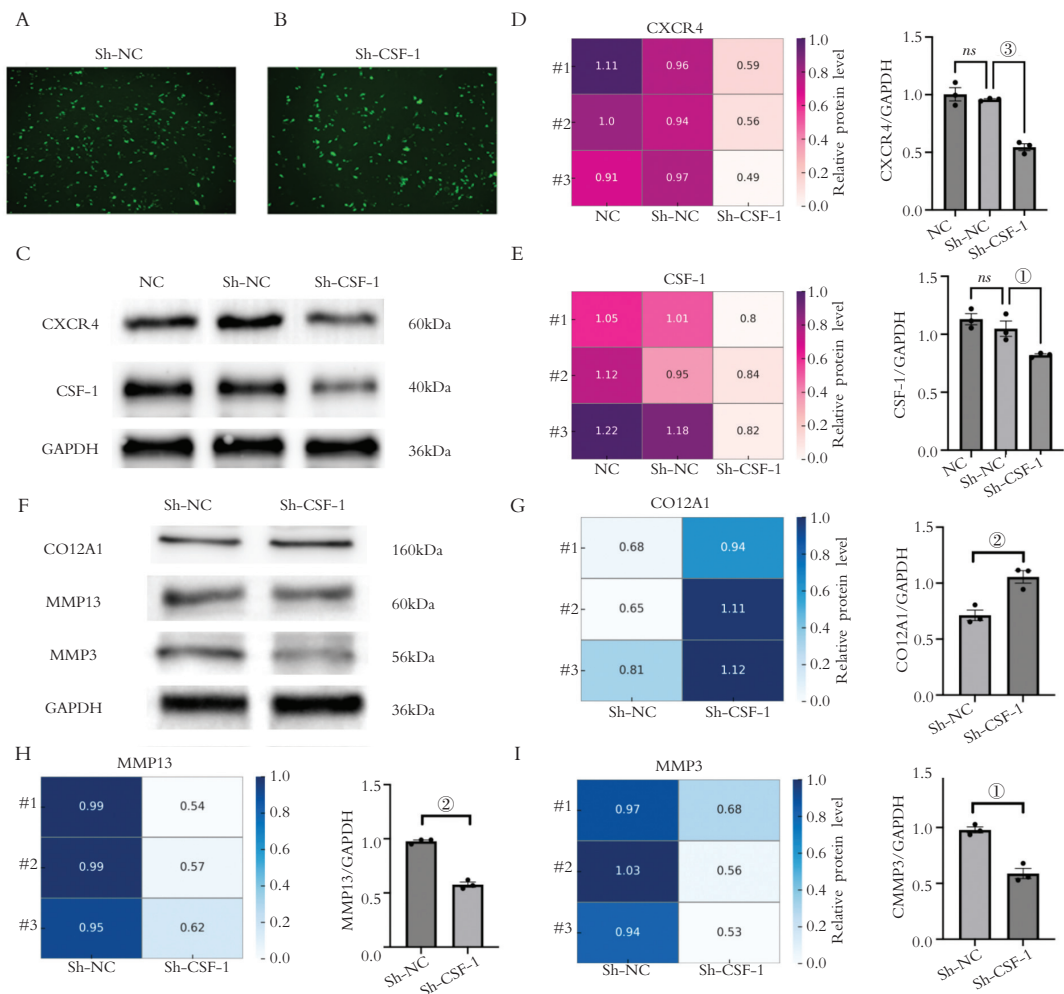


图 6 CSF-1 敲低对 CXCR4 及 ECM 相关蛋白表达的影响

A-B. 荧光显微镜观察 sh-CSF 转染效率;C. WB 检测 NC、Sh-NC 及 Sh-CSF 组中 CXCR4 和 CSF 的表达;D-E. 对应的 CXCR4 和 CSF 灰度热图及定量分析;F. WB 检测 Sh-NC 与 Sh-CSF 组中 Col2a1、MMP13、MMP3 表达;G-I. 各蛋白热图与灰度定量分析。
① $P<0.05$;② $P<0.01$;③ $P<0.001$ 。

3 讨论

骨关节炎是一种以软骨退变和滑膜炎为核心特征的慢性退行性疾病,已成为中老年人群致残的主要原因之一。其发病机制复杂,涉及多种炎症因子、趋化因子及细胞外基质调控信号^[7]。尽管目前临床上已有部分对症治疗手段,但缺乏早期诊断标志物和明确的分子干预靶点,严重限制了疾病的早期干预和精准治疗^[8]。因此,系统挖掘 OA 相关的调控因子并进行功能验证,具有重要的理论意义与应用前景。

本研究通过对 GEO 数据库 GSE269735 的表达数据进行综合分析,联合使用 WGCNA 与差异表达分析,系统识别出多个与 OA 表型密切相关的基因模块及差异表达基因。通过 GO 与 KEGG 功能富集分析发现,这些关键基因主要参与“细胞因子活性”“趋化因子活性”“胶原结合”等生物过程,提示免疫炎症与 ECM 代谢紊乱在 OA 发病中可能发挥重要作用。

进一步结合蛋白互作网络分析,本研究识别出

连接度较高的 6 个核心基因:CCL20、CSF-1、CXCL11、CXCL3、CXCL5、CXCR4。这些基因在网络中形成紧密互作,且大多属于趋化因子及其受体家族成员,可能参与 OA 相关的炎症激活、免疫细胞浸润和组织破坏过程^[9-10]。

在 OA 病理过程中,软骨细胞可分泌多种趋化因子(如 CCL20、CXCL5),可以吸引 T 细胞、单核细胞和中性粒细胞等免疫细胞浸润滑膜,从而形成局部慢性炎症环境^[11]。CXCL11、CXCL3 等趋化因子已被证实 OA 患者的血清和滑液中升高,促进炎症级联反应的持续活化^[12]。既往研究^[13-15]多集中于 CSF-1 或 CXCR4 的单独作用,CXCR4 作为经典的 G 蛋白偶联趋化因子受体,其配体 CXCL12 也称为基质细胞衍生因子 1(SDF-1)在 OA 滑膜组织中表达增强,巨噬细胞和内皮细胞的趋化和活化,诱导滑膜血管新生和炎症因子释放。此外,CXCR4/CXCL12 轴的激活可增强 MMPs、IL-6、TNF- α 等介质表达,从而加速软骨基质降解与滑膜增生^[16-18]。

CSF-1 则是 OA 炎症微环境中的另一关键因子,主要由滑膜成纤维细胞和滑膜巨噬细胞分泌,通

过与其受体 CSF-1R 结合, 不仅可驱动巨噬细胞的增殖、分化和活化, 还可诱导其持续释放 IL-1 β 、TNF- α 等炎症因子, 造成滑膜持续激活状态^[19-20]。

虽然 CXCR4 与 CSF-1 在炎症相关疾病、肿瘤转移及免疫调控中的作用已有大量研究报道, 但是目前关于二者协同机制仍知之甚少。不同的疾病中, CSF-1 与 CXCR4 之间的趋势不尽相同, 在动脉粥样硬化中 CSF-1 能促进 CCL2 的表达, 从而抑制 CXCR4 进而影响巨噬细胞的增殖与分化^[21]。而在前列腺癌中 CSF-1 能刺激分泌更多的 CXCL12, 激活 CXCR4, 促进癌细胞在化疗反应中的存活率^[22]。课题组发现 CSF-1 与 CXCR4 之间的关联呈多样性, 在不同的疾病当中 CSF-1 调控 CXCR4 的表达方式存在差异。基于上述结果, 本研究组提出假设, 在 OA 的病理过程中 CSF-1 能否通过激活滑膜巨噬细胞, 诱导其产生多种趋化因子(如 CXCL5、CCL20), 这些趋化因子与 CXCR4 协同募集免疫细胞, 形成滑膜局部的慢性炎症微环境, 进一步促进血管新生、MMPs 表达与软骨基质降解。这种“免疫放大-组织破坏”闭环有助于解释 OA 慢性进展的特征。在细胞实验中, CXCR4 与 CSF-1 在 IL-1 β 诱导的 OA 模型软骨细胞中表达水平均升高, 进一步印证了其在 OA 炎症环境中的激活状态。进一步构建并转染 CSF-1 敲低质粒后发现, CXCR4 的表达明显下调, 同时 MMP3 和 MMP13 表达降低, 而 Col2a1 水平上调。这些结果提示, CSF-1 不仅可能通过炎症因子间接与 CXCR4 协同, 还可能直接正向调控 CXCR4 的表达, 从而参与 OA 炎症反应与基质降解过程。

综上, 本研究通过生物信息学与实验手段联合, 识别并验证了 CSF-1 与 CXCR4 在 OA 中的潜在作用, 为揭示 OA 的炎症机制与寻找新的干预靶点提供了理论依据。未来可围绕其上下游通路开展功能研究, 为 OA 的早期诊断及精准治疗提供新的突破口。

参考文献

- [1] Dequeker J, Luyten FP. The history of osteoarthritis-osteoarthritis[J]. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 2008, 67(1): 5-10.
- [2] Cross M, Smith E, Hoy D, *et al.* The global burden of hip and knee osteoarthritis: estimates from the global burden of disease 2010 study[J]. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 2014, 73(7): 1323-1330.
- [3] 刘佳. 超声引导下隐神经脉冲射频联合关节腔内注射透明质酸钠治疗膝骨性关节炎的效果观察[J]. *罕少疾病杂志*, 2025, 32(7): 141-143.
- [4] Hunter DJ, Bierma-Zeinstra S. Osteoarthritis[J]. *The Lancet*, 2019, 393(10182): 1745-1759.
- [5] Griffin TM, Guilak F. The role of mechanical loading in the onset and progression of osteoarthritis[J]. *Exercise and Sport Sciences Reviews*, 2005, 33(4): 195-200.
- [6] 高静, 王敏, 冯玫. 炎症因子预测骨关节炎患者科学运动疗效的

研究进展[J]. *中华风湿病学杂志*, 2024, 28(7): 512-516.

- [7] Ridley AJL, Ou Y, Karlsson R, *et al.* Chemokines form complex signals during inflammation and disease that can be decoded by extracellular matrix proteoglycans [J]. *Science Signaling*, 2023, 16(810): eadf2537.
- [8] Wilken F, Buschner P, Benignus C, *et al.* Pharmacotherapeutic treatment of osteoarthritis-does the pill against already exist? a narrative review[J]. *Journal of Personalized Medicine*, 2023, 13(7): 1087.
- [9] Zhou C, Gao Y, Ding P, *et al.* The role of CXCL family members in different diseases[J]. *Cell Death Discovery*, 2023, 9(1): 212.
- [10] 黄鹏飞, 赵俊杰, 张兆坤, 等. 骨关节炎发病相关细胞因子的研究现状[J]. *中国矫形外科杂志*, 2025, 33(1): 52-57.
- [11] Katayama H. Rheumatoid arthritis: Development after the emergence of a chemokine for neutrophils in the synovium [J]. *BioEssays*, 2021, 43(10): e2100119.
- [12] Yang P, Tan J, Yuan Z, *et al.* Expression profile of cytokines and chemokines in osteoarthritis patients: Proinflammatory roles for CXCL8 and CXCL11 to chondrocytes [J]. *International Immunopharmacology*, 2016, 40: 16-23.
- [13] Jo DY, Rafii S, Hamada T, *et al.* Chemotaxis of primitive hematopoietic cells in response to stromal cell-derived factor-1[J]. *Journal of Clinical Investigation*, 2000, 105(1): 101-111.
- [14] Chen Y, Lin S, Sun Y, *et al.* Attenuation of subchondral bone abnormal changes in osteoarthritis by inhibition of SDF-1 signaling[J]. *Osteoarthritis and Cartilage*, 2017, 25(6): 986-994.
- [15] Wei F, Moore DC, Wei L, *et al.* Attenuation of osteoarthritis via blockade of the SDF-1/CXCR4 signaling pathway [J]. *Arthritis Research & Therapy*, 2012, 14(4): R177.
- [16] Kanbe K, Takagishi K, Chen Q. Stimulation of matrix metalloprotease 3 release from human chondrocytes by the interaction of stromal cell-derived factor 1 and CXCR4 chemokine receptor 4 [J]. *Arthritis and Rheumatism*, 2002, 46(1): 130-137.
- [17] Lin C, Liu L, Zeng C, *et al.* Activation of mTORC1 in subchondral bone preosteoblasts promotes osteoarthritis by stimulating bone sclerosis and secretion of CXCL12 [J]. *Bone Research*, 2019, 7: 5.
- [18] Lu W, Shi J, Zhang J, *et al.* CXCL12/CXCR4 axis regulates aggrecanase activation and cartilage degradation in a post-traumatic osteoarthritis rat model [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2016, 17(10): 1522.
- [19] Bosch VDMH, Blom AB, Schelbergen RF, *et al.* Alarmin S100A9 induces proinflammatory and catabolic effects predominantly in the M1 macrophages of human osteoarthritic synovium[J]. *The Journal of Rheumatology*, 2016, 43(10): 1874-1884.
- [20] Lee KM, Prasad V, Achuthan A, *et al.* Targeting GM-CSF for collagenase-induced osteoarthritis pain and disease in mice [J]. *Osteoarthritis and Cartilage*, 2020, 28(4): 486-491.
- [21] Irvine KM, Andrews MR, Fernandez-Rojo MA, *et al.* Colony-stimulating factor-1 (CSF-1) delivers a proatherogenic signal to human macrophages [J]. *Journal of Leukocyte Biology*, 2009, 85(2): 278-288.
- [22] Guan W, Li F, Zhao Z, *et al.* Tumor-associated macrophage promotes the survival of cancer cells upon docetaxel chemotherapy via the CSF1/CSF1R-CXCL12/CXCR4 axis in castration-resistant prostate cancer[J]. *Genes*, 2021, 12(5): 773.

(收稿日期: 2025-06-13

修回日期: 2025-09-30)