

## 论著·基础研究

## 烟酰胺代谢相关基因与骨关节炎的关系探索

邓青松<sup>1,2,3</sup>, 张长青<sup>1,2,3</sup>, 陶诗聪<sup>1,2</sup>

1. 上海交通大学医学院附属第六人民医院骨科, 上海 200233; 2. 上海交通大学医学院附属第六人民医院临床医学院, 上海 200233; 3. 上海交通大学医学院附属第六人民医院上海市四肢显微外科研究所, 上海 200233

**[摘要]** **目的**·利用生物信息学方法探索骨关节炎与烟酰胺代谢相关基因之间的关系, 找到具有诊断价值和治疗潜力的关键基因。**方法**·以“Osteoarthritis”为检索词, 在 GEO 数据库中获取 GSE12021、GSE55235 和 GSE55457 数据集, 将 GSE55457 作为验证集。去除 GSE12021 和 GSE55235 数据集的批次效应后, 得到标准化的合并数据集, 将其作为训练集, 并在训练集中筛选出差异表达基因 (differentially expressed genes, DEGs)。在 GeneCards 数据库和 MSigDB 数据库中获取所有烟酰胺代谢相关基因 (nicotinamide metabolism-related genes, NMRGs)。将 DEGs 与 NMRGs 取交集, 得到烟酰胺代谢相关差异表达基因 (nicotinamide metabolism-related differentially expressed genes, NMRDEGs)。对训练集进行基因集富集分析 (gene set enrichment analysis, GSEA), 对 NMRDEGs 进行基因本体 (Gene Ontology, GO)、京都基因与基因组百科全书 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) 分析。通过 LASSO (least absolute shrinkage and selection operator) 和支持向量机 (support vector machine, SVM) 分析筛选出 NMRDEGs 关键基因, 构建骨关节炎诊断模型, 并用验证集 GSE55457 进行验证。通过单样本基因集富集分析 (single sample gene set enrichment analysis, ssGSEA) 分析免疫细胞的浸润类型。通过 DGIdb 数据库、ENCORI 数据库和 CHIPBase 数据库对关键基因的 mRNA 进行相互作用网络和药物小分子预测。通过干扰小 RNA (small interfering RNA, siRNA) 敲降软骨细胞内 NMRDEGs 关键基因, 用实时荧光定量聚合酶链反应 (real-time fluorogenic quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR) 检测关键基因敲降对软骨形成相关基因表达的影响。**结果**·发现了 *NAMPT*、*TIPARP* 等 7 个 NMRDEGs。GO 和 KEGG 分析富集到核因子  $\kappa$ B 信号通路和正向调节白细胞介素-1 介导的信号通路等。GSEA 富集到缺氧诱导因子-1 转录因子通路 (Hif1 Tfp pathway) 和多配体蛋白聚糖 1 (syndecan 1) 通路等信号通路。LASSO 分析和 SVM 分析共同筛选得到 *NPAS2*、*TIPARP* 和 *NAMPT* 关键基因并构建了骨关节炎诊断模型, 验证集检验提示诊断模型诊断效果具有高准确度。ssGSEA 免疫浸润分析的结果显示, 巨噬细胞等 15 种免疫细胞存在显著差异 (均  $P < 0.05$ )。找到了 7 个针对关键基因的潜在药物小分子, 19 种与关键基因相互作用且上游基因与下游基因数量之和大于 10 的 miRNA, 19 种与关键基因结合且上游基因与下游基因数量之和大于 7 的转录因子, 27 个聚类数  $> 19$  的 RNA 结合蛋白。RT-qPCR 结果显示, 关键基因敲降会降低软骨形成相关基因的表达。**结论**·*NPAS2*、*TIPARP* 和 *NAMPT* 为烟酰胺代谢相关的关键基因, 可据此构建骨关节炎诊断模型。

**[关键词]** 骨关节炎; 烟酰胺代谢; 生物信息学; 诊断模型; 列线图**[DOI]** 10.3969/j.issn.1674-8115.2024.02.001 **[中图分类号]** R684.3; R318.04 **[文献标志码]** A

## Exploration of the relationship between nicotinamide metabolism-related genes and osteoarthritis

DENG Qingsong<sup>1,2,3</sup>, ZHANG Changqing<sup>1,2,3</sup>, TAO Shicong<sup>1,2</sup>

1. Department of Orthopedic Surgery, Shanghai Sixth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200233, China; 2. Clinical Medical College of Shanghai Sixth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine,

**[基金项目]** 国家自然科学基金 (81802226, 81871834, 82072530, 82372566); 上海市浦江人才计划 (2019PJD038); 上海市“医苑新星”青年医学人才培养资助计划; 上海交通大学医学院“双百人”项目 (20220017); 上海市第六人民医院优秀人才培养项目 (ynyq202101)。**[作者简介]** 邓青松 (1998—), 男, 硕士生; 电子邮箱: dqs1229@163.com。**[通信作者]** 陶诗聪, 电子邮箱: sctao@shsmu.edu.cn。**[Funding Information]** National Natural Science Foundation of China (81802226, 81871834, 82072530 and 82372566); Shanghai Pujiang Program (2019PJD038); Shanghai “Rising Stars of Medical Talent” Youth Development Program (Youth Medical Talents-Specialist Program); “Two-hundred Talents” Program of Shanghai Jiao Tong University School of Medicine (20220017); Shanghai Sixth People's Hospital Excellent Young Scientist Development Program (ynyq202101)。**[Corresponding Author]** TAO Shicong, E-mail: sctao@shsmu.edu.cn.

Shanghai 200233, China; 3. Institute of Microsurgery on Extremities, Shanghai Sixth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200233, China

**[Abstract]** **Objective** To explore the relationship between osteoarthritis and nicotinamide metabolism-related genes using bioinformatics analysis, and identify key genes with diagnostic value and therapeutic potential. **Methods** By using "Osteoarthritis" as a search term, GSE12021, GSE55235, and GSE55457 were obtained from the GEO database, with GSE55457 being used as the validation set. After removing batch effects from the GSE12021 and GSE55235 datasets, the standardized combined dataset was obtained and used as the training dataset. Differentially expressed genes (DEGs) were identified from the training dataset. All nicotinamide metabolism-related genes (NMRGs) were obtained from the GeneCards and MSigDB databases. The intersection of DEGs and NMRGs was taken to obtain nicotinamide metabolism-related differentially expressed genes (NMRDEGs). Gene set enrichment analysis (GSEA) was performed on the training dataset, while gene ontology (GO) and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) analysis were performed on NMRDEGs. Key genes were selected by using least absolute shrinkage and selection operator (LASSO) and support vector machine (SVM) analysis in NMRDEGs to build an osteoarthritis diagnosis model which was validated by using the GSE55457 dataset. Single sample gene set enrichment analysis (ssGSEA) was used to analyze the immune cell infiltration type. Interactions networks and drug molecule predictions were obtained for these key genes' mRNA with the DGIdb, ENCORI, and CHIPBase databases. siRNA was used to knock down the key genes in chondrocytes, and then real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) was used to detect the expression of chondrogenesis-related genes. **Results** Seven NMRDEGs, including *NAMPT*, *TIPARP*, were discovered. GO and KEGG analysis enriched some signaling pathways, such as nuclear factor- $\kappa$ B signaling pathway and positive regulation of interleukin-1-mediated signaling pathway. GSEA enriched pathways such as Hif1 Tfbpathway and syndecan 1 pathway. Key genes *NPAS2*, *TIPARP*, and *NAMPT* were identified through LASSO and SVM analysis, and used to construct an osteoarthritis diagnostic model. The validated results showed that the diagnostic model had high accuracy. Immune infiltration analysis results obtained by ssGSEA showed significant differences (all  $P < 0.05$ ) in 15 types of immune cells, including macrophages. Seven potential small molecules targeting key genes were identified, along with 19 miRNAs with the sum of upstream and downstream  $>10$ , 19 transcription factors with upstream and downstream  $>7$ , and 27 RNA binding proteins with clusterNum  $>19$ . The results of RT-qPCR showed that knocking down key genes reduced the expression of chondrogenesis-related genes. **Conclusion** Through bioinformatics analysis, key genes related to nicotinamide metabolism, *NPAS2*, *TIPARP*, and *NAMPT*, are discovered, and an osteoarthritis diagnostic model is constructed.

**[Key words]** osteoarthritis; nicotinamide metabolism; bioinformatics; diagnostic model; nomogram

骨关节炎 (osteoarthritis, OA) 是一种常见的关节软骨退行性疾病, 临床表现为关节疼痛、肿胀、活动困难, 甚至导致残疾。随着老龄化和肥胖人数不断增加, OA 的患病率也稳步上升<sup>[1]</sup>, 目前已影响全球 5 亿多人口, 给个人和社会都带来了沉重负担<sup>[2]</sup>。长期以来, OA 的临床治疗侧重于改善关节疼痛症状。近年来, OA 的防治策略已转向早期预防, 在关节发生大规模破坏前阻止或延缓 OA 的进展, 因此迫切需要了解和识别 OA 的潜在生物标志物和治疗靶点。

烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (nicotinamide adenine dinucleotide,  $NAD^+$ ) 及其衍生物烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate,  $NADP^+$ ) 在哺乳动物体内是常见的辅酶, 是许多细胞内过程的重要辅助因子, 参与了多种生理功能, 特别是能量代谢和氧化还原平衡<sup>[3]</sup>。在将烟酰胺转换为  $NAD^+$  的过程中, 烟酰胺磷酸核糖基转移酶 (nicotinamide phosphoribosyltransferase, NAMPT) 是限速酶, 催化烟酰胺形成烟酰胺单核苷酸 (nicotinamide mononucleotide, NMN), 然后

通过烟酰胺单核苷酸腺苷转移酶将 NMN 转化为  $NAD^+$ <sup>[4]</sup>。 $NAMPT/NAD^+$  的代谢在许多疾病的病理生理过程中发挥重要作用。例如, 全身性 NAMPT 和脂肪细胞特异性 NAMPT 可以调节肥胖发展的过程; NAMPT 参与了 2 型糖尿病的发病机制和糖尿病并发症的发展过程, NMN 和烟酰胺核糖在改善  $\beta$  细胞功能和细胞稳态、葡萄糖代谢和应激反应方面可能发挥作用;  $NAD^+/NADH$  或  $NADP^+/NADPH$  的不平衡会破坏细胞稳态, 导致衰老和一些退行性疾病等<sup>[5-6]</sup>。

目前研究表明,  $NAMPT/NAD^+$  在 OA 进展的分解代谢中可能扮演重要角色<sup>[7-8]</sup>; 但关于烟酰胺代谢在 OA 疾病中作用的研究较少。明确烟酰胺代谢在 OA 中的作用, 对 OA 的治疗和预防都具有重要意义。基于此, 本研究通过生物信息学方法结合 OA 相关 GEO 数据集和烟酰胺代谢相关基因, 对烟酰胺代谢在 OA 进展中的分子机制进行多层次、多方面、高效且直观的阐述, 以期明确 OA 进展中烟酰胺代谢的作用机制, 为 OA 的预防、早期诊断、治疗和药物研发提供新的思路 and 理论支持。

## 1 资料与方法

### 1.1 数据下载

通过“GEOquery” R包<sup>[9]</sup>从GEO数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)下载OA相关数据集GSE12021<sup>[10]</sup>、GSE55235<sup>[11]</sup>和GSE55457<sup>[11]</sup>,将GSE55457作为验证集。这些数据集中的样本均来自人类的滑膜。GSE55235和GSE55457的芯片注释平台为GPL96;而GSE12021芯片平台有GPL96和GPL97,仅选择GPL96平台注释。数据集GSE12021包含10例OA样本和9例对照样本,数据集GSE55235包含10例OA样本和10例对照样本,数据集GSE55457包含10例OA样本和10例对照样本。

在GeneCards数据库<sup>[12]</sup>中以“Nicotinamide Metabolism”作为搜索关键词收集30个烟酰胺代谢相关基因(nicotinamide metabolism-related genes, NMRGs)。在MSigDB数据库<sup>[13]</sup>以关键词“Nicotinamide Metabolism”搜索,未得到相关结果;遂以“Nicotinamide”为关键词,挑选出所有NMRGs。将MSigDB与GeneCards中得到的基因取并集,得到155个NMRGs。

用R包sva<sup>[14]</sup>对数据集GSE12021和GSE55235进行去批次处理后得到合并后的GEO数据集,并将其作为训练集,其中包含了20例OA样本和19例对照样本。最后,通过R包limma<sup>[15]</sup>对训练集和验证集进行注释探针的标准化和归一化处理。

### 1.2 烟酰胺代谢相关差异表达基因

根据训练集的样本分组情况,用R包limma<sup>[15]</sup>对OA组和对照组中的基因进行差异分析。设定 $|\log FC| > 1$ ,其中logFC为 $\log_2$ (Fold Change)的简称,且调整后P值(adj.P) < 0.05为差异表达基因(differentially expressed genes, DEGs)的阈值。将训练集的DEGs与NMRGs取交集,得到烟酰胺代谢相关差异表达基因(nicotinamide metabolism-related differentially expressed genes, NMRDEGs),差异分析结果通过R包ggplot2绘制火山图。

### 1.3 基因本体和通路富集分析

用R包clusterProfiler<sup>[16]</sup>对NMRDEGs进行基因本体(Gene Ontology, GO)和京都基因与基因组百

科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)注释分析,条目筛选标准为adj.P < 0.1且错误发现率(false discovery rate, FDR;  $q$ 值) < 0.25, adj.P校正方法为Benjamini-Hochberg。用Cytoscape对分析结果进行可视化展示。

### 1.4 基于对照分组的基因集富集分析

用R包clusterProfiler根据logFC值对训练集所有基因进行基因集富集分析(gene set enrichment analysis, GSEA)。GSEA分析中所使用的参数如下:种子为2023,计算次数为1 000,每个基因集最少含有的基因数为10,最多含有的基因数为500。在MSigDB数据库<sup>[17]</sup>中获取c2.all.v7.5.1.symbols.gmt基因集进行GSEA分析,筛选标准为adj.P < 0.05且FDR值 < 0.25。

### 1.5 OA诊断模型的构建

为得到NMRDEGs的诊断模型,用glmnet包<sup>[18]</sup>、参数family="binomial"和十折交叉验证执行LASSO(least absolute shrinkage and selection operator)回归<sup>[19]</sup>,并运行1 000个周期以防止过度拟合。riskScore = Coefficient(key gene<sub>*i*</sub>) × mRNA Expression(key gene<sub>*i*</sub>)。通过支持向量机(support vector machine, SVM)算法构建SVM模型,并基于准确率最高和错误率最低的基因数量筛选NMRDEGs。之后再选取LASSO和SVM分析共同筛选得到的关键基因用于后续分析。

对关键基因进行Logistic回归分析并构建Logistic回归模型,根据Logistic回归分析结果用R包rms构建列线图<sup>[20]</sup>。用决策曲线分析(decision curve analysis, DCA)图评价Logistics回归模型的准确性和分辨力,并用R包ggDCA<sup>[21]</sup>绘制DCA图对Logistic回归模型的效果进行评估。用R包pROC绘制Logistic回归模型的受试者操作特征(receiver operating characteristic, ROC)曲线并计算ROC曲线下的面积(area under the curve, AUC)。最后,对关键基因进行功能相似性分析并绘制箱线图。

### 1.6 基于诊断模型评分分组的GSEA分析

通过GSEA分析训练集关键基因诊断模型高低风险组间全部基因的表达和参与的生物学过程、影响的细胞组分以及分子功能之间的联系。GSEA筛选标准为adj.P < 0.05且FDR值 < 0.25。



1.7 单样本基因集富集分析

用单样本基因集富集分析 (single sample gene set enrichment analysis, ssGSEA) 算法<sup>[22]</sup> 量化 28 种免疫细胞在训练集中浸润的相对丰度。

1.8 mRNA 相互作用网络和药物小分子预测

用 DGIdb 数据库<sup>[23]</sup> 预测与关键基因 (mRNA) 相互作用的潜在药物或小分子化合物, 用 Cytoscape 可视化 mRNA-drugs 相互作用网络。用 ENCORI 数据库<sup>[24]</sup> 预测与基因相互作用的 miRNA 和 RNA 结合蛋白 (RNA binding protein, RBP), 以至少 3 个网站中均有作用为筛选标准, 并绘制 mRNA-miRNA、mRNA-RBP 相互作用网络。通过 CHIPBase 数据库 (Version 3.0)<sup>[25]</sup> 查找与关键基因结合的转录因子 (transcription factor) 并用 Cytoscape 可视化 mRNA-TF 相互作用网络。

表 1 siRNA 序列

Tab 1 Sequences for siRNA

siRNA	Sense (5'→3')	Antisense (5'→3')
siNPAS2	CAAAGGAAUUUCCAACUUAUGTT	CAUAAGUUGGAAAUUCCUUUGTT
siNAMPT	GCAGGACUUGCUCUAAUUAATTT	UUUAAUUAGAGCAAGUCCUGCTT
siTIPARP	CCAAGAGAACGGAAUUGAAAUTT	AUUUCAAUUCCGUUCUCUUGGTT

表 2 RT-qPCR 引物序列

Tab 2 Primer sequences for RT-qPCR

Primer	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')
β-actin	CCTCTATGCCAACACAGT	AGCCACCAATCCACACAG
ACAN	TGGAGACAAGGATGAGTTTCC	GGCGAAGCAGTACACATCATA
SOX9	AACACCTTGAGCCTTAAACG	GATTTCATCTCCTTTGCTTGC

1.10 统计学分析

利用 R 软件 4.2.0 进行数据处理与分析, 定量数据以  $\bar{x} \pm s$  形式表示。2 组间比较采用 *t* 检验或 Wilcoxon 秩和检验。通过 Spearman 相关性分析计算不同分子之间的相关系数。 $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 烟酰胺代谢相关差异表达基因分析

去除了 OA 数据集 GSE12021 和 GSE55235 的批次效应, 获得合并后的 GEO 数据集, 将其作为训练集, 并通过主成分分析 (principal component analysis, PCA) 图比较批次效应去除前后的数据集, 结果显示

1.9 体外细胞实验和实时荧光定量 PCR 检测

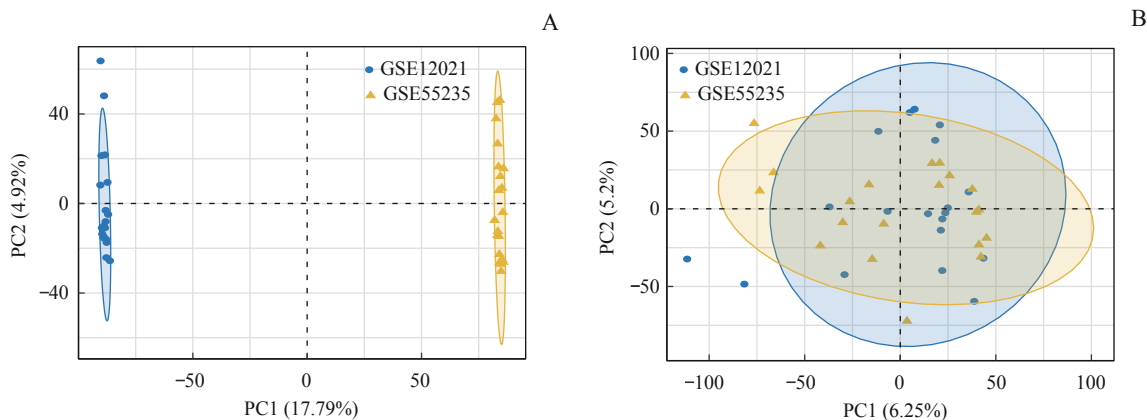
将人软骨细胞 (C28/I2, 德国默克) 按照  $2 \times 10^5$  个/孔的密度接种在 6 孔板中, 按照 EZ Trans RNA 转染试剂 (货号 AC04L051, 中国李记生物) 的说明书分别转染针对关键基因的干扰小 RNA (small interfering RNA, siRNA) (中国和元生物)。siRNA 序列详见表 1。用 TRIzol (美国赛默飞) 提取转染后软骨细胞的 RNA, 按照反转录试剂盒说明书 (货号 11141ES, 中国翌圣生物) 和实时荧光定量聚合酶链反应 (real-time fluorogenic quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR) 说明书 (货号 11204ES, 中国翌圣生物) 检测软骨形成相关基因聚集蛋白聚糖 (aggrecan, *ACAN*) 和 Y 染色体性别决定区-盒转录因子 9 (sex-determining region of Y chromosome-box transcription factor 9, *SOX9*) 的表达。引物序列详见表 2。

基本消除了训练集中样本的批次效应 (图 1)。

对 OA 组与对照组之间基因表达值的差异进行分析, 得到 DEGs 387 个 (图 2A)。将 DEGs 和 NMRGs 取交集 (图 2B), 得到 7 个 NMRDEGs (*TIPARP*、*CDKN1A*、*NPAS2*、*NAMPT*、*IL1R1*、*PTGS2* 和 *HSD11B2*)。分析并比较 NMRDEGs 在训练集和验证集中的表达差异, 结果显示 7 个 NMRDEGs 在训练集和验证集的 OA 组与正常组之间差异显著 (均  $P < 0.05$ ), 表达趋势一致 (图 2C、D)。

2.2 GO 和 KEGG 富集分析

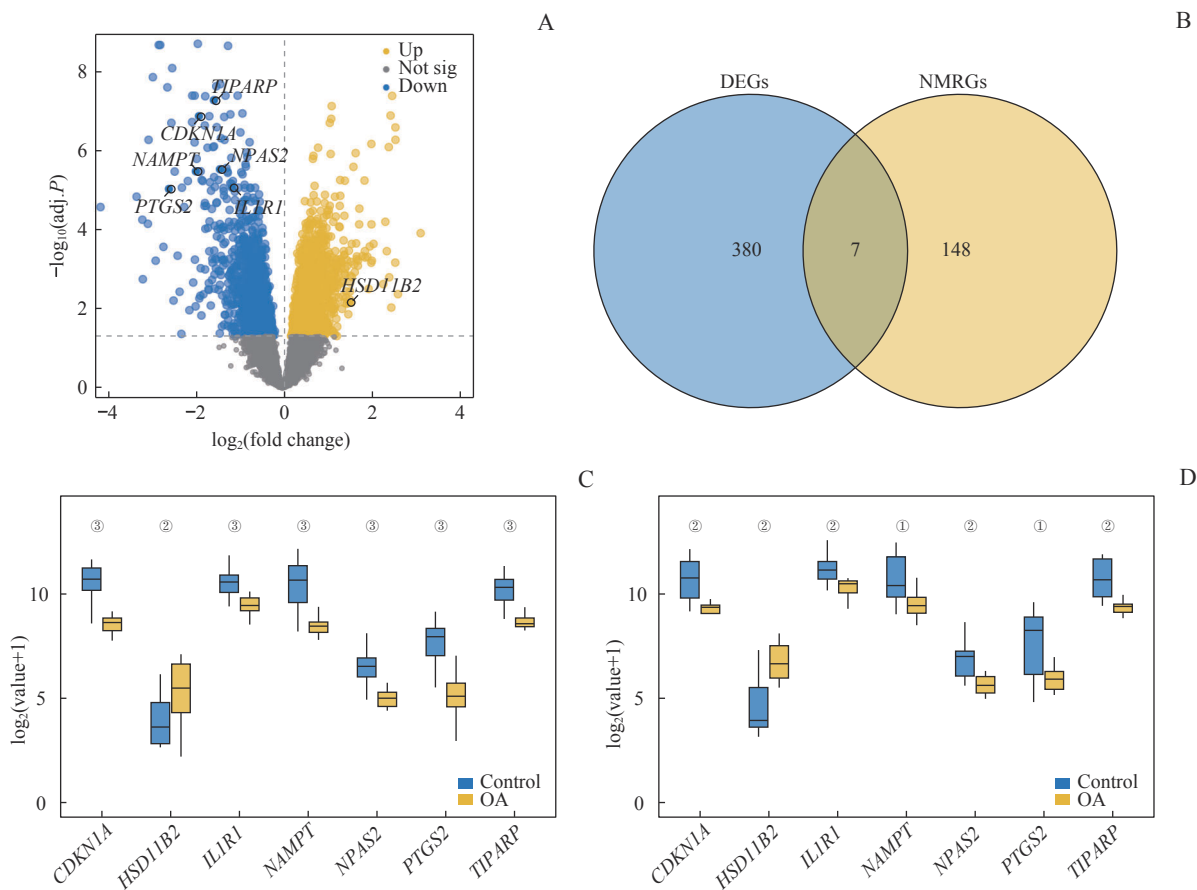
对 7 个 NMRDEGs 进行 GO 和 KEGG 富集分析, 并将结果根据包含分子数量和 logFC 大小绘制成网络



**Note:** A. PCA plot of the merged datasets before batch effect removal. B. PCA plot of the merged dataset after batch effect removal.

图1 去除批次效应和主成分分析

Fig 1 Batch effect removal and PCA



**Note:** A. Volcano plot of DEGs analysis in the OA group and the control group in the training dataset. B. Venn diagram of DEGs and NMRGs in the training dataset. C. Group comparison chart of NMRDEGs in the training dataset. D. Group comparison chart of NMRDEGs in the validation set GSE55457. <sup>①</sup> $P < 0.05$ , <sup>②</sup> $P < 0.01$ , <sup>③</sup> $P = 0.000$ , comparison between the control group and the OA group.

图2 DEGs分析

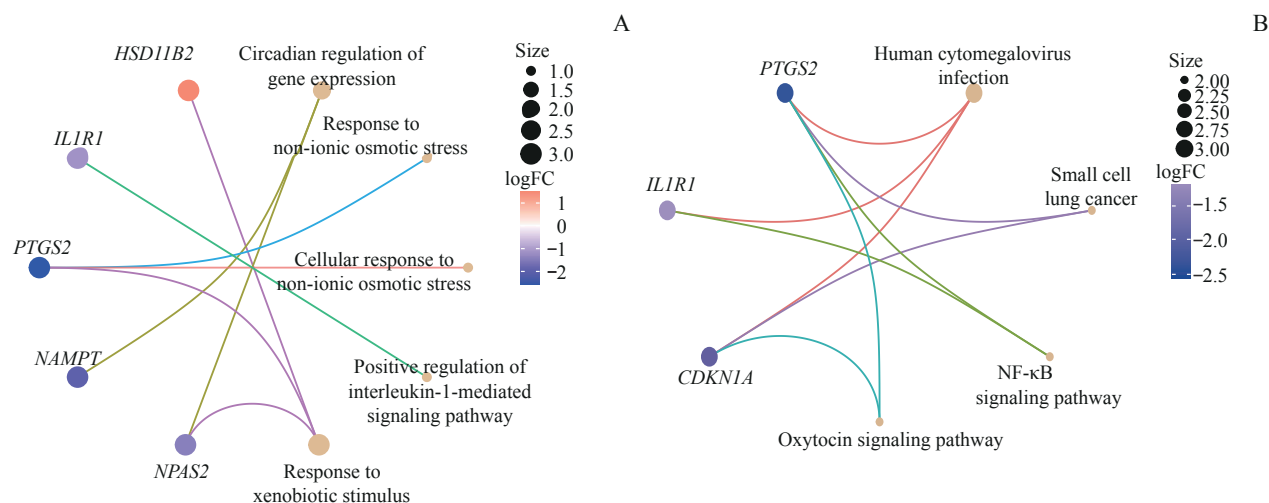
Fig 2 DEGs expression analysis

图 (图3)。结果显示, 7个NMRDEGs富集到了以下信号通路: 正向调节白细胞介素-1介导的信号通路 (positive regulation of interleukin-1-mediated signaling pathway)、对异种生物刺激的反应 (response to

xenobiotic stimulus)、基因表达的昼夜节律调控 (circadian regulation of gene expression)、对非离子渗透压力的反应 (response to non-ionic osmotic stress)、细胞对非离子渗透压力的反应 (cellular response to

non-ionic osmotic stress)、核因子  $\kappa$ B 信号通路 (nuclear factor- $\kappa$ B signaling pathway, NF- $\kappa$ B signaling pathway)、人类巨细胞病毒感染 (human

cytomegalovirus infection)、小细胞肺癌 (small cell lung cancer)、催产素信号通路 (oxytocin signaling pathway)。



**Note:** A. The results of GO enrichment analysis combined with difference analysis results of NMRDEGs logFC network diagram display. B. The pathway KEGG enrichment analysis results of NMRDEGs combined with the difference analysis results of logFC network diagram display.

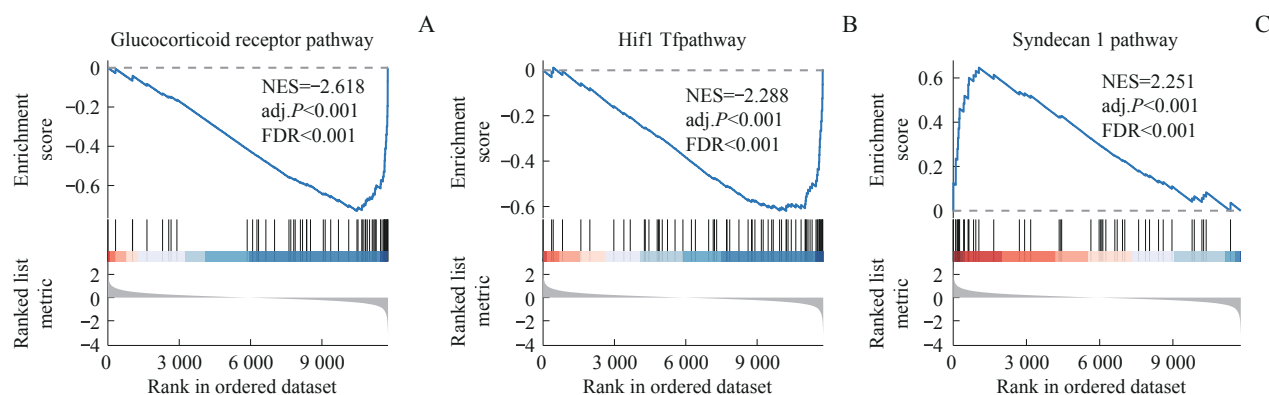
**图3** NMRDEGs的GO和KEGG富集分析

**Fig 3** GO and KEGG enrichment analysis for NMRDEGs

### 2.3 基于疾病对照分组的GSEA分析

为了确定不同组中所有基因的表达差异对OA在训练集中的影响,通过基因GSEA研究了训练集中所有基因的表达与涉及的生物相关功能和信号通路。结果显示,训练集中的糖皮质激素受体通路

(glucocorticoid receptor pathway) (图4A)、缺氧诱导因子-1 (hypoxia inducible factor 1, HIF-1) 转录因子通路 (HIF-1 transcriptional factor pathway, Hif1 Tfp pathway) (图4B) 和多配体蛋白聚糖1通路 (syndecan 1 pathway) (图4C) 得到显著富集。



**Note:** A. Glucocorticoid receptor pathway. B. Hif1 Tfp pathway. C. Syndecan 1 pathway. NES—normalized enrichment score; FDR—false discovery rate.

**图4** 训练集的GSEA分析

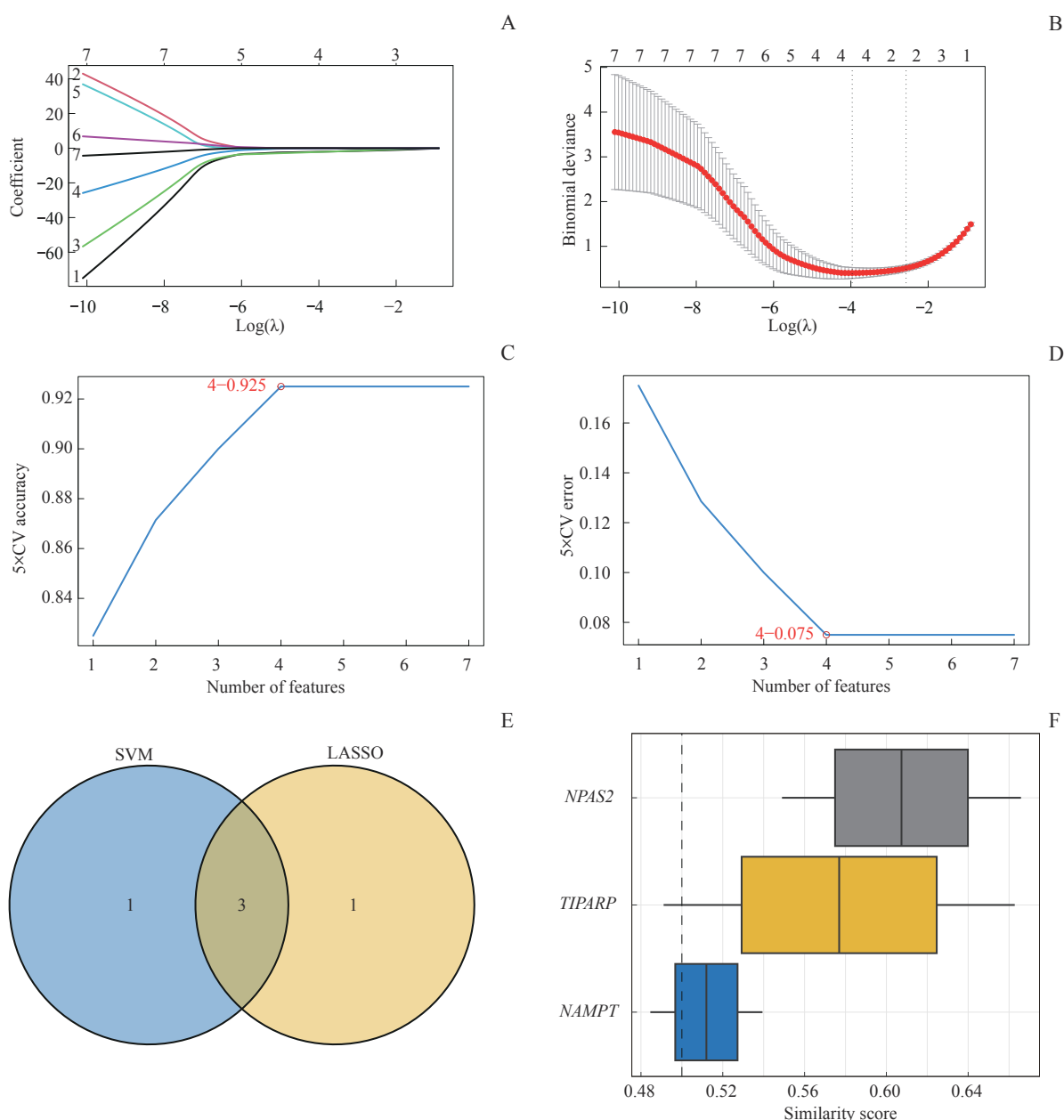
**Fig 4** GSEA for training dataset

### 2.4 OA诊断模型的构建

为了明确这7个NMRDEGs在OA诊断中的价值,采用LASSO回归分析构建NMRDEGs的OA诊断模型,选用最简单模型中对应的4个基因 (*TIPARP*、*NPAS2*、*NAMPT* 和 *HSD11B2*) 用于后续分析 (图5A、B)。随后,基于7个NMRDEGs和SVM算法构

建了SVM模型,选择具有最高准确度 (图5C) 和最低错误率 (图5D) 的基因数量。结果表明,当基因数量为4个时 (*NPAS2*、*IL1R1*、*TIPARP*、*NAMPT*), SVM模型具有最高准确度和最低错误率。对2种算法得到的基因进行交集运算,得到3个基因 (*NPAS2*、*TIPARP*、*NAMPT*), 将其定义为关键基因 (图5E)

并进行了功能相似性分析 (图 5F)。分析结果提示, 基因 *NPAS2* 的功能相似性评分最高, 随后依次是 *TIPARP* 和 *NAMPT*。



**Note:** A. LASSO regressor trajectories for NMRDEGs. B. LASSO regression diagnostic model diagram. C. The number of genes with the highest accuracy rate obtained by the SVM algorithm. D. The number of genes with the lowest error rate obtained by the SVM algorithm. E. Venn diagram of the intersection of SVM and LASSO models. F. Boxplot of functional similarity analysis of key genes.

**图5 LASSO模型与SVM模型的交集**

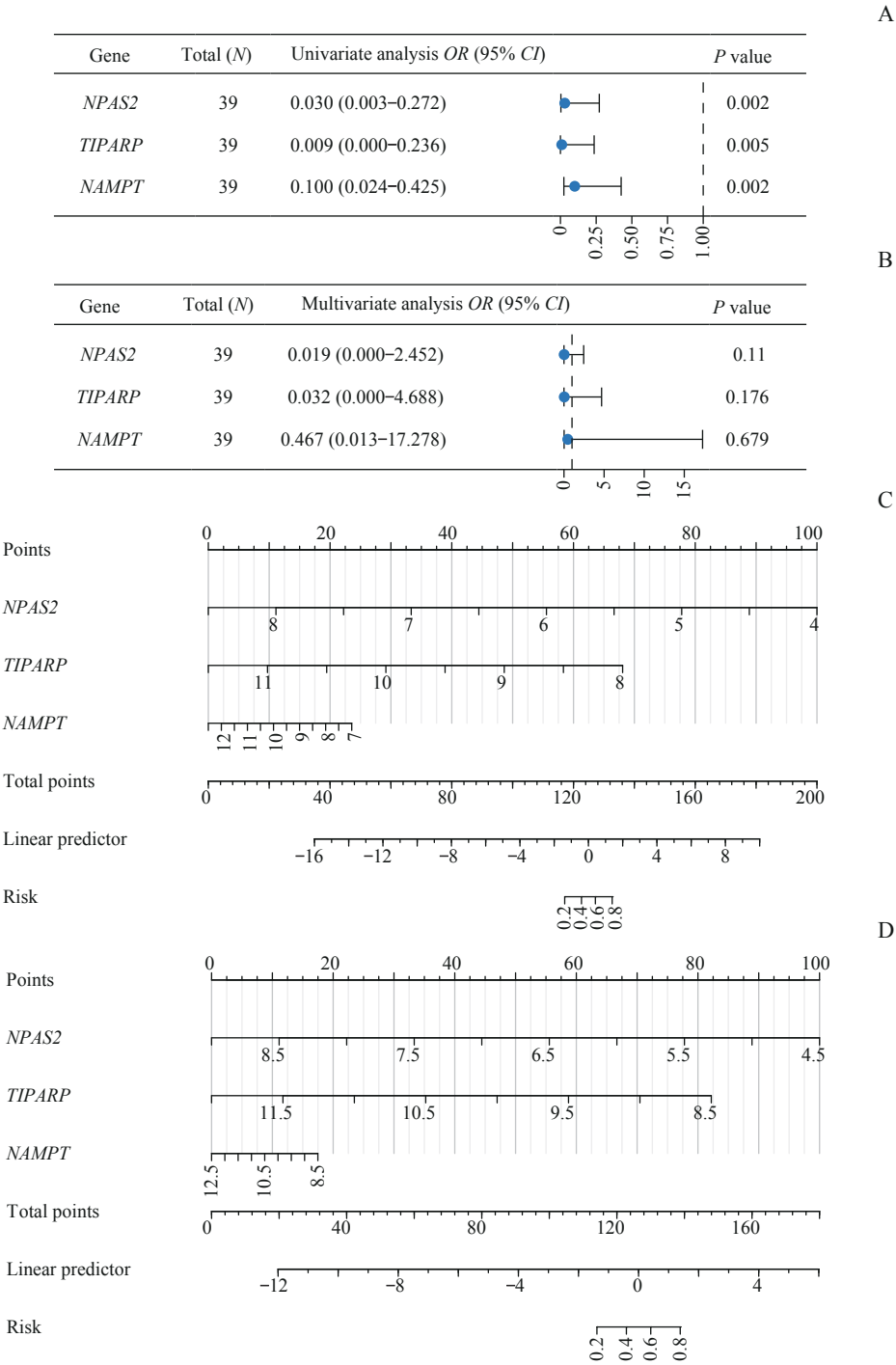
**Fig 5** Intersection of LASSO and SVM models

对训练集关键基因进行了单因素 Logistic 回归分析和多因素 Logistic 回归分析, 构建 Logistic 回归模型并绘制森林图 (图 6A、B)。计算预测值评分公式:  $\text{riskScore} = \text{NPAS2} \times (-3.949) + \text{TIPARP} \times (-3.457) + \text{NAMPT} \times (-0.761)$ 。为判断模型的诊断能力, 对训练集和验证集上的关键基因进行列线图分析, 并绘制 Logistic 预测模型的列线图 (图 6C、D)。用 Logistic

预测值的 Logistic 回归模型分别对训练集和验证集进行预后校准曲线 (calibration) 分析并绘制校准曲线图 (图 7A、B), 结果显示训练集和验证集的拟合曲线与预测曲线都存在较高的重合度, 表明 Logistic 诊断模型的诊断效果良好。接着用 DCA 图评估了训练集 (图 7C) 和验证集 (图 7D) 中 Logistic 预测值的回归模型在诊断中的作用, 结果显示模型的预测曲线

能稳定高于All线和None线，显示预测模型效果好。此外，为了分析关键基因 (*NPAS2*、*TIPARP*、*NAMPT*) 在训练集和验证集中Logistic回归模型的线性预测值 (linear predictors) 的诊断价值，使用3个关键基因的线性预测值与Logistic回归模型相结合，绘制训练集和验证集的ROC曲线。ROC曲线的结果

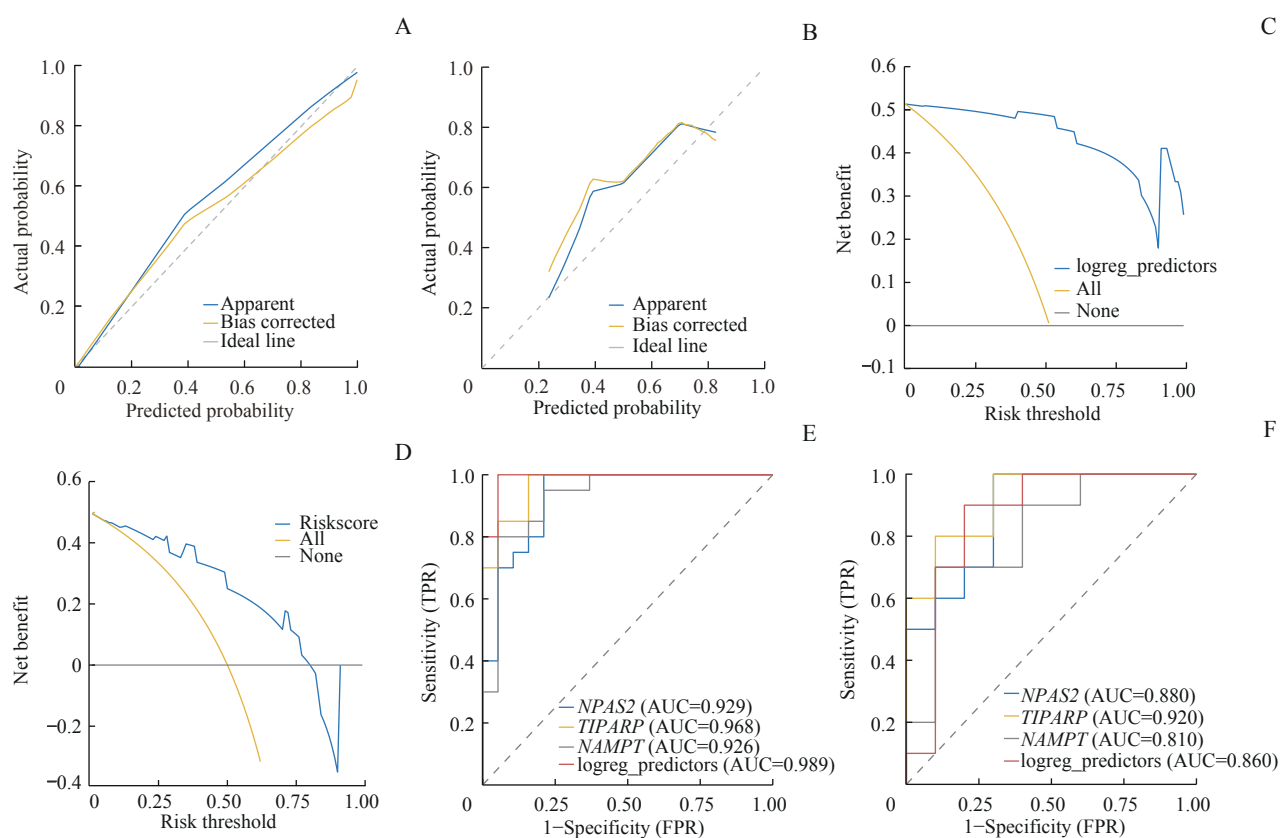
表明，在训练集中 (图 7E)，基因 *NPAS2*、*TIPARP* 和 *NAMPT* 的诊断效果具有高准确度 ( $AUC>0.9$ )，而Logistic线性预测值的诊断效果最佳 ( $AUC=0.989$ )。在验证集中 (图 7F)，基因 *TIPARP* 具有高准确度 ( $AUC>0.9$ )，基因 *NPAS2*、*NAMPT* 和Logistic模型具有一定准确度 ( $0.7<AUC<0.9$ )。



**Note:** A. The key genes are included in the forest plot of the single factor Logistic regression model. B. The key genes are included in the forest plot of the multi-factor Logistic regression model. C. The nomogram of the key genes and Logistic predictive scoring model in the training dataset. D. The nomogram of the key genes and Logistic predictive value scoring model in the validation set GSE55457.

图 6 OA 的诊断模型构建  
Fig 6 Diagnostic model of OA





**Note:** A. Calibration plot of the Logistic model in the training dataset. B. Calibration plot of the Logistic model in the validation set GSE55457. C. DCA plot of the Logistic model in the training dataset. D. DCA plot of the Logistic model in the validation set GSE55457. E. The ROC curve of the Logistic model in the training dataset. F. The ROC curve of the Logistic model in the validation set GSE55457. FPR—false positive rate.

图7 OA诊断模型的验证分析

Fig 7 Validation analysis of OA diagnostic model

## 2.5 基于诊断模型得分分组的GSEA分析

为了确定训练集高风险组和低风险组的 Logistic 诊断模型差异对 OA 样本中所有基因和生物过程表达的影响,通过 GSEA 分析了训练集中 OA 样本的基因表达和生物过程的关系。结果显示,高风险组和低风险组中的基因在化学渗透偶联的呼吸电子传递 ATP 合成和通过解偶联蛋白产生热量 (respiratory electron transport ATP synthesis by chemiosmotic coupling and heat production by uncoupling proteins) (图 8A)、干扰素  $\alpha/\beta$  信号转导 (interferon  $\alpha/\beta$  signaling) (图 8B)、糖酵解和糖原异生 (glycolysis and gluconeogenesis) (图 8C) 等通路中显著富集。

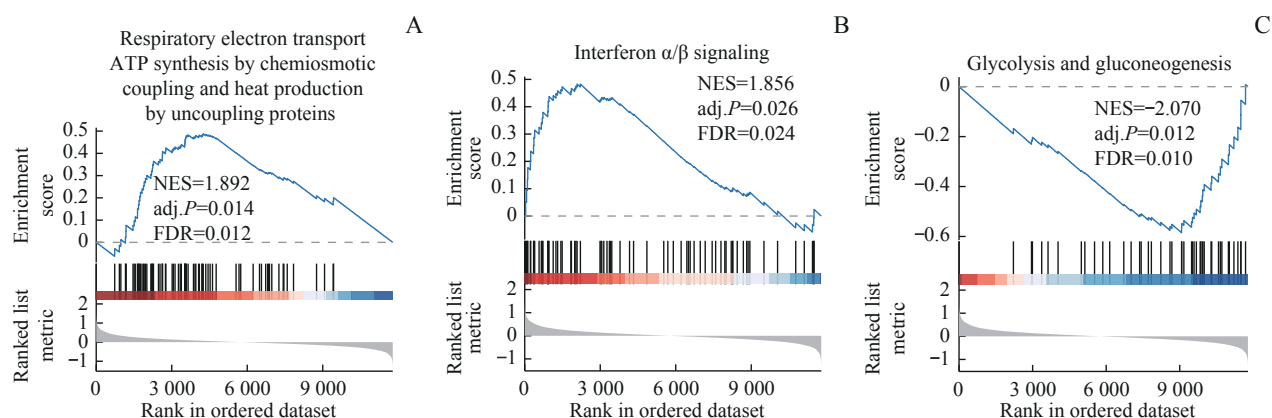
## 2.6 ssGSEA 免疫浸润分析

为了探究 OA 组和对照组在训练集中免疫浸润的差异,使用 ssGSEA 算法计算对照组和 OA 组样本中 28 种免疫细胞浸润丰度,然后用 Mann-Whitney U

检验分析其在不同组中的丰度差异。图 9 表明,在训练集中,15 种免疫细胞类型的浸润丰度存在显著差异 (均  $P < 0.05$ ),分别为 2 型辅助性 T 细胞 (type 2 T cells, Th2 细胞)、Th1 细胞、滤泡辅助 T 细胞、调节性 T 细胞 (regulatory T cells, Tregs)、自然杀伤细胞 (natural killer cells, NK 细胞)、髓源性抑制细胞 (myeloid-derived suppressor cells, MDSCs)、巨噬细胞、未成熟树突状细胞、未成熟 B 细胞、 $\gamma\delta$ T 细胞、嗜酸性粒细胞、效应记忆 CD4T 细胞、中央记忆 CD4T 细胞、活化 CD8T 细胞和活化 B 细胞。

## 2.7 药物小分子预测与 mRNA 相互作用网络

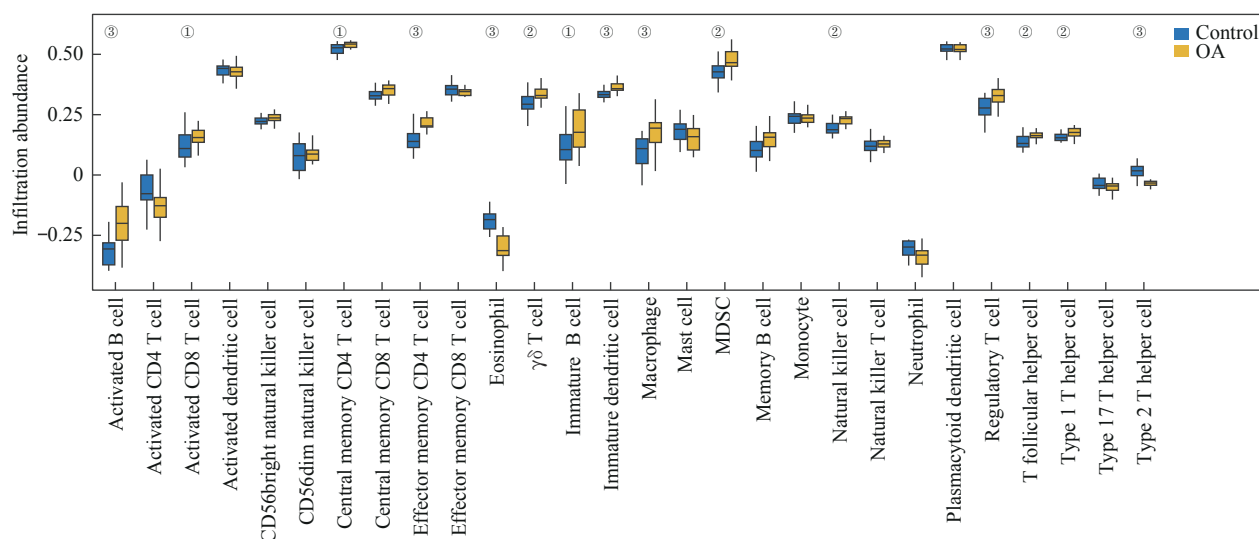
使用 DGIdb 数据库预测与关键基因 (NPAS2、TIPARP、NAMPT) 相互作用的潜在药物或小分子化合物,筛选出 reference count > 2 的小分子药物,找到 7 个潜在药物小分子 (图 10A);用 ENCORI 数据库中的 mRNA-miRNA 数据预测与关键基因相互作用的



**Note:** A. Respiratory electron transport ATP synthesis by chemiosmotic coupling and heat production by uncoupling proteins. B. Interferon  $\alpha/\beta$  signaling. C. Glycolysis and gluconeogenesis.

**图8** 基于高低风险分层的GSEA

**Fig 8** GSEA based on high-low risk stratification



**Note:** Group comparison chart showing the differences in immune infiltration between the OA group and the control group in the training dataset. ① $P<0.05$ , ② $P<0.01$ , ③ $P=0.000$ .

**图9** 训练集的ssGSEA算法免疫浸润分析

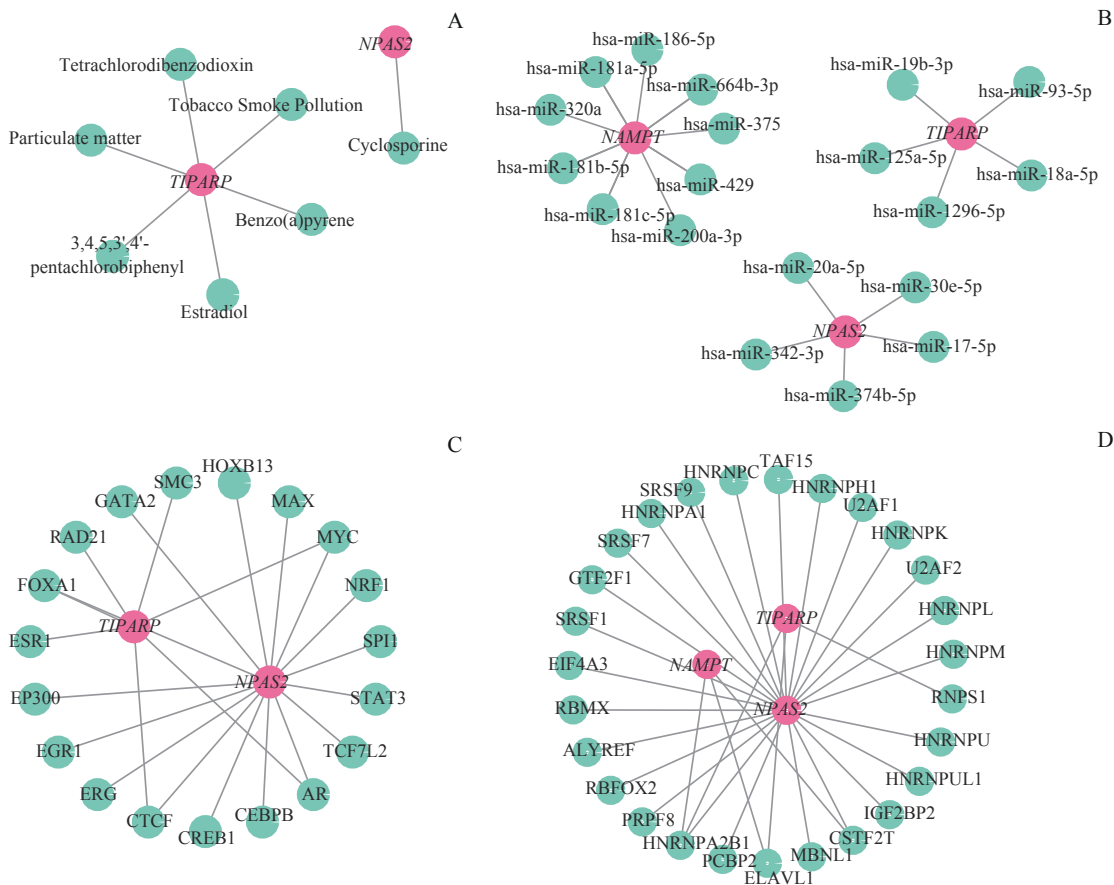
**Fig 9** Training dataset immune infiltration analysis by ssGSEA algorithm

miRNA, 筛选出其上游基因与下游基因数量之和大于10的miRNA, 有19种(图10B)。此外还通过ChIPBase3.0数据库查找与关键基因结合的转录因子, 筛选出上游基因与下游基因数量之和大于7的19种转录因子(图10C); 通过ENCORI数据库中的mRNA-RBP筛选出与关键基因相互作用的RBP, 得到27个聚类数大于19的RBP(图10D)。

## 2.8 体外细胞关键基因表达验证

对3个关键基因(*NPAS2*、*TIPARP*、*NAMPT*)

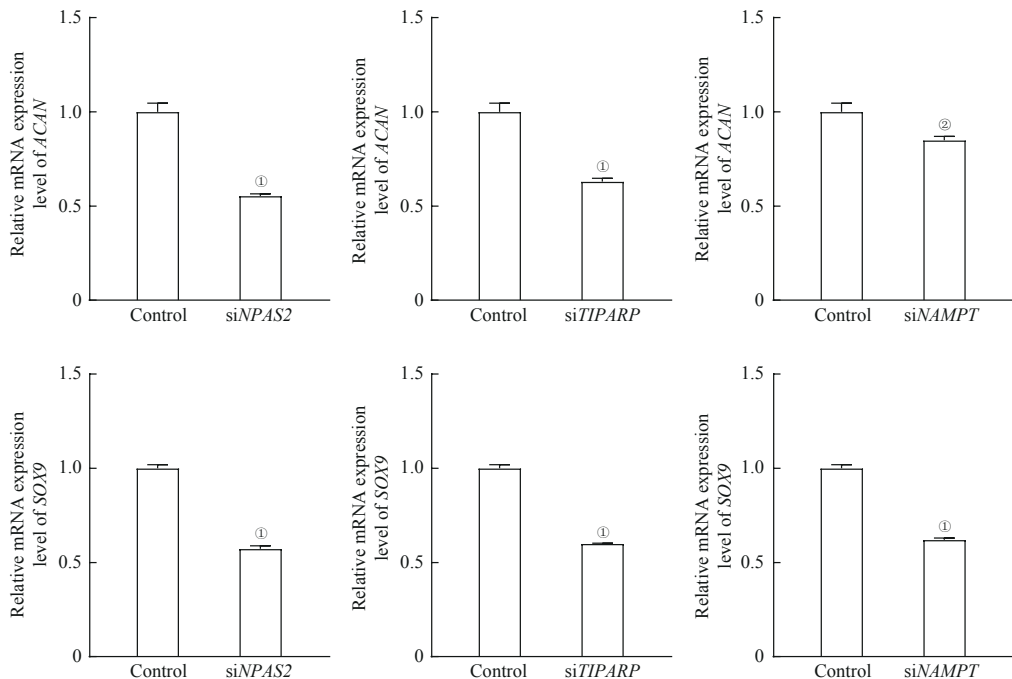
在软骨细胞中的作用进行验证。对软骨细胞分别转染针对3个关键基因的siRNA(*siNPAS2*、*siTIPARP*、*siNAMPT*), 敲降软骨细胞中*NPAS2*、*TIPARP*和*NAMPT*的表达, 然后通过RT-qPCR检测关键基因敲降后对软骨形成相关基因*ACAN*和*SOX9*的影响。实验结果显示敲降3个关键基因的表达抑制软骨形成相关基因*ACAN*和*SOX9*的表达(图11), 与生物信息学分析结果一致, 提示*NPAS2*、*TIPARP*和*NAMPT*在OA中有重要作用。



**Note:** A. mRNA-drug interaction network between key genes and small molecules. B. mRNA-miRNA interaction network of key genes and miRNA. C. mRNA-TF interaction network of key genes and transcription factors. D. The mRNA-RBP interaction network of key genes and RBP.

图 10 mRNA 相互作用网络与药物预测

Fig 10 mRNA interactome network and drug prediction



**Note:** ① $P=0.000$ , ② $P<0.01$ , compared with the control group.

图 11 关键基因敲降后软骨形成相关基因 *ACAN* 和 *SOX9* 的 mRNA 表达水平

Fig 11 The relative mRNA expression of *ACAN* and *SOX9* after knocking down key genes

### 3 讨论

NAD<sup>+</sup>是参与细胞氧化还原反应的必需辅酶,其合成可以通过从头合成途径、Preiss-Handler途径和补救途径,而在哺乳动物中主要是通过补救途径合成<sup>[6]</sup>。在NAD<sup>+</sup>的补救合成过程中,NAMPT的功能非常重要,是该过程中的限速酶,可以通过影响NAD<sup>+</sup>的生物合成影响NAD依赖性酶的功能,参与调节细胞能量代谢。NAMPT有2种不同的形式:细胞内NAMPT(iNAMPT)和细胞外NAMPT(eNAMPT)。iNAMPT存在于细胞质和细胞核中,而eNAMPT由脂肪细胞和免疫细胞等分泌到细胞外<sup>[5]</sup>。eNAMPT除了酶促功能外,还具有细胞因子样活性,有促炎作用,能够激活细胞外信号调节核因子NF- $\kappa$ B活化,以及细胞因子如肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)- $\alpha$ 、白细胞介素(interleukin, IL)-6、IL-1 $\beta$ 等的产生<sup>[26]</sup>。NAMPT/NAD<sup>+</sup>信号转导的促炎作用在关节炎模型中得到了验证,类风湿关节炎和OA中均有NAMPT过度表达<sup>[27]</sup>。研究发现,在OA患者血浆和滑膜液以及小鼠炎症滑膜组织中,NAMPT表达升高<sup>[8]</sup>。在IL-1 $\beta$ 刺激后,软骨细胞产生的eNAMPT能够增强基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)的表达,介导软骨细胞的促降解和促炎症表型<sup>[7]</sup>;eNAMPT还能促进促炎细胞因子的分泌,调节破骨细胞、单核细胞、巨噬细胞等几种关节炎相关细胞的分化,加快OA的进程<sup>[4,28]</sup>。本研究也显示,NAMPT作为OA诊断模型的关键基因之一,在OA的发病及进展中有重要作用。

除了NAMPT,关键基因NPAS2和TIPARP在OA中发挥的作用也同样重要。神经元PAS结构域蛋白2(neuronal PAS domain protein 2, NPAS2)是一种调节哺乳动物昼夜节律的转录因子,能够通过与脑和肌肉ARNT样蛋白1(brain and muscle arnt-like protein 1, BMAL1)形成二聚体参与昼夜节律的调节<sup>[29]</sup>。研究表明,以NAD(H)和NADP(H)为代表的细胞还原氧化状态调节CLOCK/BMAL1和NPAS2/BMAL1的转录活性,NAD还原形式能够提高NPAS2的DNA结合活性,而氧化形式降低了NPAS2的DNA结合活性<sup>[30]</sup>。TCCD诱导的多聚腺苷二磷酸核糖聚合酶(TCDD inducible poly-ADP-ribose polymerase, TIPARP)是一种单ADP-核糖基转移酶,是PARP家族成员,受芳烃受体(aryl hydrocarbon receptor,

AHR)调控,其详细功能及其在调节转录中的作用尚不清楚。有研究表明,TIPARP是HIF-1的靶标,充当缺氧信号转导的负反馈调节剂,能够以ADP-核糖基化依赖性方式形成球形核体并募集HIF-1 $\alpha$ 和E3泛素连接酶HUWE1,导致HIF-1 $\alpha$ 的泛素化和降解<sup>[31]</sup>。此外研究<sup>[32]</sup>发现,OA中的TIPARP表达显著降低。

在本研究筛选出的另外4个NMRDEGs中,IL-1受体1型(interleukin 1 receptor type 1, IL1R1)是炎症因子IL-1 $\beta$ 发挥作用的重要受体,在OA的炎症进展和疼痛中发挥重要作用<sup>[33]</sup>。11- $\beta$ 羟基类固醇脱氢酶2(11- $\beta$  hydroxysteroid dehydrogenase 2, HSD11B2)是一种负责将皮质醇转化为非活性形式可的松的微粒体酶复合物,能够调节皮质醇水平。前列腺素内过氧化物合酶2(prostaglandin-endoperoxide synthase 2, PTGS2),又称环氧酶2(cyclooxygenase-2, COX-2),参与前列腺素的形成。在OA中,PTGS2、MMP1、MMP3、MMP9等一些分解代谢因子在HIF-2 $\alpha$ 的调节下介导了软骨破坏<sup>[34]</sup>。同时PTGS2的表达也受到NADPH的调控,NADPH能够通过抑制上游基因NF- $\kappa$ B,抑制PTGS2的表达<sup>[35]</sup>。CDKN1A又名p21,是细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂,能够阻滞细胞周期,同时细胞内p21常作为细胞衰老的生物标志物。在OA患者的软骨细胞中p21的转录和蛋白表达水平显著提高,进而诱导衰老软骨细胞分泌大量的衰老相关分泌表型,进一步加重OA<sup>[36]</sup>。

在GSEA数据分析中,本研究富集到了糖皮质激素受体通路、缺氧诱导因子-1转录因子通路和多配体蛋白聚糖1通路。在人体中,糖皮质激素(glucocorticoids, GCs)是一类天然激素,在炎症方面有重要作用。糖皮质激素受体(glucocorticoid receptor, GR)是GCs的作用主要受体,当GR结合GCs后,GR构象发生变化,相关蛋白解离,GR转运到细胞核中,在细胞核中与靶基因启动子中的糖皮质激素受体反应元件(glucocorticoid responsive elements, GREs)结合,与正性GREs结合时导致基因上调,与负性GREs结合时导致基因下调。也正是由于GR信号作用的复杂性,导致了GCs用于治疗OA时会带来一些不良反应,进而也催生了一些GR选择性激动剂,如Mapracorat<sup>[37]</sup>。此外,GR还能与其他转录因子结合。如巨噬细胞通过toll样受体识别病原体从而触发NF- $\kappa$ B和激活蛋白-1(activator



protein-1, AP-1) 效应转录因子的激活, 促进一些促炎基因的表达; 而 GR 能够与 NF- $\kappa$ B 和 AP-1 相互作用, 抑制这些基因的转录<sup>[38-39]</sup>。然而在 OA 中, 软骨细胞的 GR 水平下降, 不仅减轻了对炎症因子生成的抑制, 而且降低了对金属蛋白酶和其他细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 破坏酶合成的控制, 加快了软骨细胞的衰老和软骨降解<sup>[40-41]</sup>。HIF-1 $\alpha$  是公认的维持正常软骨细胞功能的保护因素, 能够维持无氧糖酵解、诱导适当的自噬和抑制关节软骨的 ECM 降解来促进软骨稳态, 稳定关节软骨表型和维持软骨细胞活力<sup>[42-43]</sup>。此外, HIF-1 $\alpha$  能够正向调节 SOX9、ACAN 的表达, 同时抑制 COL10A1 和 MMP13 的表达, 以促进软骨细胞分化和基质合成<sup>[44-45]</sup>。研究<sup>[46-47]</sup>发现, 软骨细胞中 HIF-1 $\alpha$  的水平与 OA 的严重程度呈负相关, OA 中 HIF-1 $\alpha$  的降解增加导致了软骨稳态失衡; 同时, 增加的 HIF-2 $\alpha$  诱导软骨细胞中分解代谢因子的表达, 促进软骨细胞凋亡, 加剧炎症反应, 从而加速了 OA 的软骨变性。Syndecan1 是一种跨膜细胞表面的蛋白聚糖, 能够与细胞外基质分子、生长因子和细胞因子相互作用, 还与 MMP 共同维持 ECM 的稳态平衡, 参与组织重塑或病理变化<sup>[48]</sup>。研究发现在 OA 中, syndecan1 的表达是增加的。类似于 syndecan1 在创面修复中扮演的角色, 在 OA 早期, 软骨细胞存在类似于组织修复的改变, 增加了 syndecan1、II a 型胶原和 SOX9 的产生; 但不同于创面修复, 这种改变在 OA 中无法逆转 OA 的进程<sup>[49-50]</sup>。

近年来, 机器学习结合生物信息学方法在疾病诊断和严重程度的判断中得到了越来越多的应用。ZHANG 等<sup>[51]</sup>对多个 GEO 数据库的 OA 相关基因进行了综合分析得到 DEGs, 并通过 Cytoscape 中的 cytoHubba 分析 DEGs 蛋白相互作用网络中节点的度中心性 (degree)、边缘渗透组件 (edge percolated component, EPC) 和紧密中心性 (closeness), 筛选出 8 个 OA 潜在的诊断标志物 (*POSTN*, *MMP2*, *CTSG*, *ELANE*, *COL3A1*, *MPO*, *COL1A1* 和 *COL1A2*), 然后通过 SVM 算法建立了 OA 预测的诊断模型。HAN 等<sup>[52]</sup>通过 Cytoscape 中的 cytoHubba 计算差异基因蛋白相互作用网络中的度中心性、最大邻域组件 (maximum neighborhood component, MNC)、紧密中心性和最大团中心性 (maximal clique centrality, MCC) 选取关键基因, 并通过 SVM

算法构建诊断模型。在本研究中, 我们通过对 7 个 NMRDEGs 构建 LASSO 和 SVM 诊断模型, 并对 2 种算法得到的基因取交集得到 3 个关键基因, 然后对关键基因进行了单因素 Logistic 回归分析和多因素 Logistic 回归分析, 构建了 OA 诊断模型, 结果显示构建的诊断模型的诊断效果良好。

ssGSEA 免疫浸润分析提示巨噬细胞、NK 细胞、Th1 细胞和 Tregs 等在 OA 的进展过程中发挥了重要作用。巨噬细胞是一种参与先天免疫的细胞, 在接受到不同的刺激后会极化为不同的亚型, 根据其作用效果将其大致分为促炎型 (M1) 和抑炎型 (M2)。巨噬细胞在  $\gamma$  干扰素 (interferon- $\gamma$ , IFN- $\gamma$ )、TNF- $\alpha$ 、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (granulocyte-macrophage colony stimulating factor, GM-CSF) 和脂多糖的诱导下可以极化为 M1 型, 并产生一些促炎细胞因子 (如 IL-6、IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$ ) 以及多种组织降解酶, 加重软骨和骨骼的破坏。M2 型巨噬细胞能够产生抗炎细胞因子 IL-10、转化生长因子 (transforming growth factor, TGF)- $\beta$  和 IL-1 受体拮抗剂, 缓解炎症, 抑制软骨细胞凋亡, 促进软骨修复。NK 细胞是一种先天细胞毒性免疫细胞, 能够杀死病毒感染、异常或转化的细胞。有研究提示 NK 细胞可能也参与了 OA 的进展过程。研究<sup>[53-54]</sup>发现在 OA 患者的滑液中主要是 CD56<sup>+</sup>/CD16<sup>-</sup> NK 细胞, 这种 NK 细胞主要表达促炎因子颗粒酶 A, 可能与 OA 患者滑液中增加的促炎细胞因子相关。然而, NK 细胞在 OA 中的作用尚不清楚, 是否可以通过调控 NK 细胞更好地抑制 OA 进展, 还有待进一步研究。与健康个体的滑膜相比, OA 患者的滑膜含有更多的炎症免疫细胞, 如 Th1 细胞和 Tregs<sup>[55-56]</sup>。在 IL-12 的刺激下, 幼稚 CD4 T 细胞分化为 Th1 细胞, 产生 IL-2、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、淋巴毒素和 GM-CSF<sup>[57-58]</sup>。目前研究表明, Th1 细胞在 OA 患者的外周血中不会发生显著变化, 而在 OA 患者的滑液中 Th1 细胞增加, 滑膜中能够找到 Th1 细胞; 说明 Th1 细胞在 OA 患者的滑液和滑膜中蓄积, 在 OA 的发病机制中发挥作用<sup>[56, 59-60]</sup>。Tregs 是一种抗炎调节 T 细胞, 在 OA 的复杂炎症级联反应中起重要作用, 能够分泌 IL-10 和 TGF- $\beta$  等抗炎细胞因子, 抑制炎症免疫细胞, 如 M1 巨噬细胞和 Th1 细胞。在 OA 中, Tregs 反应性降低导致 IL-10 释放减少, 加快关节炎进展<sup>[61]</sup>。

与关键基因相互作用的潜在药物或小分子化合物



的预测结果中包括雌激素和环孢素。环孢素是钙调磷酸酶抑制剂的一种,可以通过靶向作用于T细胞,抑制TNF- $\alpha$ 、IFN等一些细胞因子的分泌,发挥免疫调节作用<sup>[62]</sup>。目前,环孢素在类风湿性关节炎中的治疗主要用于氨甲蝶呤等一些一线治疗药物耐药或不耐受的患者,在全身性幼年特发性关节炎的治疗中也有应用,但用于OA治疗却鲜有报道<sup>[63-64]</sup>。雌激素对软骨代谢的影响已被广泛研究,但雌激素在调节关节代谢稳态中的作用复杂。一方面雌激素可以增强软骨细胞糖胺聚糖的合成,抑制软骨细胞中COX-2的表达,保护细胞免受氧化损伤。另一方面,在全身缺乏雌激素的情况下,局部应用雌激素不能阻止软骨退化,在一些小关节中软骨表达较高的雌激素受体加重绝经后妇女OA的症状<sup>[65-67]</sup>。因此,雌激素在OA治疗中的作用有待进一步研究。

综上所述,本研究通过生物信息学方法发现了烟酰胺代谢与OA存在密切联系,发现了可能参与OA发病及进展的3个关键基因NPAS2、TIPARP和NAMPT,并构建了OA的关键基因诊断模型,对关键基因有相互作用的潜在药物和小分子化合物、

miRNA、转录因子和RBP进行了预测。此外,还对关键基因进行了实验验证。虽然烟酰胺代谢相关基因在OA发病中具体作用机制还未阐明,但通过此次分析能够更快、更有效地找到与疾病相关联的作用分子,对后续烟酰胺代谢相关基因与OA关系的基础研究具有一定的参考价值。

#### 利益冲突声明/Conflict of Interests

所有作者声明不存在利益冲突。

All authors disclose no relevant conflict of interests.

#### 作者贡献/Authors' Contributions

邓青松负责数据分析和论文撰写,张长青负责论文的审阅,陶诗聪负责课题设计及论文修改。所有作者均阅读并同意了最终稿件的提交。

DENG Qingsong was responsible for data analysis and paper writing. ZHANG Changqing was responsible for paper review. TAO Shicong was responsible for experimental design and paper editing. All authors have read the final manuscript and agreed to the submission.

- Received: 2023-08-07
- Accepted: 2023-11-30
- Published online: 2024-02-28

#### 参 · 考 · 文 · 献

- [1] HUNTER D J, BIERMA-ZEINSTRAS S. Osteoarthritis[J]. Lancet, 2019, 393(10182): 1745-1759.
- [2] YAO Q, WU X H, TAO C, et al. Osteoarthritis: pathogenic signaling pathways and therapeutic targets[J]. Signal Transduct Target Ther, 2023, 8(1): 56.
- [3] REVOLLO J R, GRIMM A A, IMAI S. The NAD biosynthesis pathway mediated by nicotinamide phosphoribosyltransferase regulates Sir2 activity in mammalian cells[J]. J Biol Chem, 2004, 279(49): 50754-50763.
- [4] TRAVELLI C, COLOMBO G, MOLA S, et al. NAMPT: A pleiotropic modulator of monocytes and macrophages[J]. Pharmacol Res, 2018, 135: 25-36.
- [5] GARTEN A, SCHUSTER S, PENKE M, et al. Physiological and pathophysiological roles of NAMPT and NAD metabolism[J]. Nat Rev Endocrinol, 2015, 11(9): 535-546.
- [6] JOHNSON S, IMAI S. NAD<sup>+</sup> biosynthesis, aging, and disease[J]. F1000Res, 2018, 7: 132.
- [7] YANG S, RYU J H, OH H, et al. NAMPT (visfatin), a direct target of hypoxia-inducible factor-2 $\alpha$ , is an essential catabolic regulator of osteoarthritis[J]. Ann Rheum Dis, 2015, 74(3): 595-602.
- [8] PRESLE N, POTTIE P, DUMOND H, et al. Differential distribution of adipokines between serum and synovial fluid in patients with osteoarthritis. Contribution of joint tissues to their articular production[J]. Osteoarthritis Cartilage, 2006, 14(7): 690-695.
- [9] DAVIS S, MELTZER P S. GEOquery: a bridge between the Gene Expression Omnibus (GEO) and BioConductor[J]. Bioinformatics, 2007, 23(14): 1846-1847.
- [10] HUBER R, HUMMERT C, GAUSMANN U, et al. Identification of intra-group, inter-individual, and gene-specific variances in mRNA expression profiles in the rheumatoid arthritis synovial membrane[J]. Arthritis Res Ther, 2008, 10(4): R98.
- [11] WOETZEL D, HUBER R, KUPFER P, et al. Identification of rheumatoid arthritis and osteoarthritis patients by transcriptome-based rule set generation[J]. Arthritis Res Ther, 2014, 16(2): R84.
- [12] STELZER G, ROSEN N, PLASCHKES I, et al. The GeneCards suite: from gene data mining to disease genome sequence analyses[J]. Curr Protoc Bioinformatics, 2016, 54: 1.30.1-1.30.33.
- [13] LIBERZON A, BIRGER C, THORVALDSDÓTTIR H, et al. The Molecular Signatures Database (MSigDB) hallmark gene set collection[J]. Cell Syst, 2015, 1(6): 417-425.
- [14] LEEK J T, JOHNSON W E, PARKER H S, et al. The sva package for removing batch effects and other unwanted variation in high-throughput experiments[J]. Bioinformatics, 2012, 28(6): 882-883.
- [15] RITCHIE M E, PHIPSON B, WU D, et al. Limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies[J]. Nucleic Acids Res, 2015, 43(7): e47.
- [16] YU G, WANG L G, HAN Y, et al. clusterProfiler: an R package for comparing biological themes among gene clusters[J]. OMICS, 2012, 16(5): 284-287.
- [17] LIBERZON A, SUBRAMANIAN A, PINCHBACK R, et al. Molecular signatures database (MSigDB) 3.0[J]. Bioinformatics, 2011, 27(12): 1739-1740.
- [18] YANG L, QU Q, HAO Z, et al. Powerful identification of large quantitative trait loci using genome-wide R/glmnet-based regression[J]. J Hered, 2022, 113(4): 472-478.
- [19] NARALA S, LI S Q, KLIMAS N K, et al. Application of least absolute shrinkage and selection operator logistic regression for the histopathological comparison of chondrodermatitis nodularis helices

- and hyperplastic actinic keratosis[J]. *J Cutan Pathol*, 2021, 48(6): 739-744.
- [20] PARK S Y. Nomogram: an analogue tool to deliver digital knowledge[J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2018, 155(4): 1793.
- [21] SUN L, PANG Y, WANG X, et al. Ablation of gut microbiota alleviates obesity-induced hepatic steatosis and glucose intolerance by modulating bile acid metabolism in hamsters[J]. *Acta Pharm Sin B*, 2019, 9(4): 702-710.
- [22] XIAO B, LIU L, LI A, et al. Identification and verification of immune-related gene prognostic signature based on ssGSEA for osteosarcoma[J]. *Front Oncol*, 2020, 10: 607622.
- [23] FRESHOUR S L, KIWALA S, COTTO K C, et al. Integration of the Drug-Gene Interaction Database (DGIdb 4.0) with open crowdsourcing efforts[J]. *Nucleic Acids Res*, 2021, 49(D1): D1144-D1151.
- [24] LI J H, LIU S, ZHOU H, et al. starBase v2.0: decoding miRNA-ceRNA, miRNA-ncRNA and protein-RNA interaction networks from large-scale CLIP-Seq data[J]. *Nucleic Acids Res*, 2014, 42(D1): D92-D97.
- [25] ZHOU K R, LIU S, SUN W J, et al. ChIPBase v2.0: decoding transcriptional regulatory networks of non-coding RNAs and protein-coding genes from ChIP-seq data[J]. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45(D1): D43-D50.
- [26] NAVAS L E, CARNERO A. NAD<sup>+</sup> metabolism, stemness, the immune response, and cancer[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2021, 6(1): 2.
- [27] WANG Q H, LI Y, DOU D Y, et al. Nicotinamide mononucleotide-elicited NAMPT signaling activation aggravated adjuvant-induced arthritis in rats by affecting peripheral immune cells differentiation[J]. *Int Immunopharmacol*, 2021, 98: 107856.
- [28] NOWELL M, EVANS L, WILLIAMS A. PBEF/NAMPT/visfatin: a promising drug target for treating rheumatoid arthritis? [J]. *Future Med Chem*, 2012, 4(6): 751-769.
- [29] DIOUM E M, RUTTER J, TUCKERMAN J R, et al. NPAS2: a gas-responsive transcription factor[J]. *Science*, 2002, 298(5602): 2385-2387.
- [30] BECKER-KRAIL D D, PAREKH P K, KETCHESIN K D, et al. Circadian transcription factor NPAS2 and the NAD<sup>+</sup>-dependent deacetylase SIRT1 interact in the mouse nucleus accumbens and regulate reward[J]. *Eur J Neurosci*, 2022, 55(3): 675-693.
- [31] ZHANG L, CAO J, DONG L, et al. TipARP forms nuclear condensates to degrade HIF-1 $\alpha$  and suppress tumorigenesis[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2020, 117(24): 13447-13456.
- [32] SWAHN H, OLMER M, LOTZ M K. RNA-binding proteins that are highly expressed and enriched in healthy cartilage but suppressed in osteoarthritis[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2023, 11: 1208315.
- [33] WYATT L A, NWOSU L N, WILSON D, et al. Molecular expression patterns in the synovium and their association with advanced symptomatic knee osteoarthritis[J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2019, 27(4): 667-675.
- [34] YANG S, KIM J, RYU J H, et al. Hypoxia-inducible factor-2 $\alpha$  is a catabolic regulator of osteoarthritic cartilage destruction[J]. *Nat Med*, 2010, 16(6): 687-693.
- [35] QIN Y Y, LI M, FENG X, et al. Combined NADPH and the NOX inhibitor apocynin provides greater anti-inflammatory and neuroprotective effects in a mouse model of stroke[J]. *Free Radic Biol Med*, 2017, 104: 333-345.
- [36] CORYELL P R, DIEKMAN B O, LOESER R F. Mechanisms and therapeutic implications of cellular senescence in osteoarthritis[J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2021, 17(1): 47-57.
- [37] SAVVIDOU O, MILONAKI M, GOUMENOS S, et al. Glucocorticoid signaling and osteoarthritis[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2019, 480: 153-166.
- [38] SACTA M A, THARMALINGAM B, COPPO M, et al. Gene-specific mechanisms direct glucocorticoid-receptor-driven repression of inflammatory response genes in macrophages[J]. *Elife*, 2018, 7: e34864.
- [39] MIHAILIDOU C, PANAGIOTOU C, KIARIS H, et al. Crosstalk between C/EBP homologous protein (CHOP) and glucocorticoid receptor in lung cancer[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2016, 436: 211-223.
- [40] DIBATTISTA J A, MARTEL-PELLETIER J, ANTAKLY T, et al. Reduced expression of glucocorticoid receptor levels in human osteoarthritic chondrocytes. Role in the suppression of metalloproteinase synthesis[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 1993, 76(5): 1128-1134.
- [41] PELLETIER J P, DIBATTISTA J A, RANGER P, et al. Modulation of the expression of glucocorticoid receptors in synovial fibroblasts and chondrocytes by prostaglandins and NSAIDs[J]. *Am J Ther*, 1996, 3(2): 115-119.
- [42] ZHANG F J, LUO W, LEI G H. Role of HIF-1 $\alpha$  and HIF-2 $\alpha$  in osteoarthritis[J]. *Joint Bone Spine*, 2015, 82(3): 144-147.
- [43] HU S L, ZHANG C W, NI L B, et al. Stabilization of HIF-1 $\alpha$  alleviates osteoarthritis via enhancing mitophagy[J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(6): 481.
- [44] OKADA K, MORI D, MAKII Y, et al. Hypoxia-inducible factor-1  $\alpha$  maintains mouse articular cartilage through suppression of NF- $\kappa$ B signaling[J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 5425.
- [45] BOUAZIZ W, SIGAUX J, MODROWSKI D, et al. Interaction of HIF1 $\alpha$  and  $\beta$ -catenin inhibits matrix metalloproteinase 13 expression and prevents cartilage damage in mice[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113(19): 5453-5458.
- [46] ZHANG H, WANG L, CUI J, et al. Maintaining hypoxia environment of subchondral bone alleviates osteoarthritis progression[J]. *Sci Adv*, 2023, 9(14): eabo7868.
- [47] ZHANG X A, KONG H. Mechanism of HIFs in osteoarthritis[J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1168799.
- [48] PATTERSON A M, CARTWRIGHT A, DAVID G, et al. Differential expression of syndecans and glypicans in chronically inflamed synovium[J]. *Ann Rheum Dis*, 2008, 67(5): 592-601.
- [49] KAUFMAN J, CARIC D, VUKOJEVIC K. Expression pattern of Syndecan-1 and HSP-70 in hip tissue of patients with osteoarthritis[J]. *J Orthop*, 2019, 17: 134-138.
- [50] SALMINEN-MANKONEN H, SÄÄMÄNEN A M, JALKANEN M, et al. Syndecan-1 expression is upregulated in degenerating articular cartilage in a transgenic mouse model for osteoarthritis[J]. *Scand J Rheumatol*, 2005, 34(6): 469-474.
- [51] ZHANG Y Q, YANG Y, WANG C Z, et al. Identification of diagnostic biomarkers of osteoarthritis based on multi-chip integrated analysis and machine learning[J]. *DNA Cell Biol*, 2020, 39(12): 2245-2256.
- [52] HAN Y, WU J, GONG Z, et al. Identification and development of a novel 5-gene diagnostic model based on immune infiltration analysis of osteoarthritis[J]. *J Transl Med*, 2021, 19(1): 522.
- [53] JAIME P, GARCÍA-GUERRERO N, ESTELLA R, et al. CD56<sup>+</sup>/CD16<sup>-</sup> natural killer cells expressing the inflammatory protease granzyme A are enriched in synovial fluid from patients with osteoarthritis[J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2017, 25(10): 1708-1718.
- [54] WANG H, ZENG Y, ZHANG M, et al. CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup> natural killer cells are shifted toward an IFN- $\gamma$ -promoting phenotype with reduced regulatory capacity in osteoarthritis[J]. *Hum Immunol*, 2019, 80(10): 871-877.
- [55] MORADI B, SCHNATZER P, HAGMANN S, et al. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>highCD127<sup>low</sup> regulatory T cells are enriched in rheumatoid arthritis and osteoarthritis joints: analysis of frequency and phenotype in synovial membrane, synovial fluid and peripheral blood[J]. *Arthritis Res Ther*, 2014, 16(2): R97.
- [56] LI Y S, LUO W, ZHU S A, et al. T cells in osteoarthritis: alterations and beyond[J]. *Front Immunol*, 2017, 8: 356.
- [57] CHEN K, KOLLS J K. T cell-mediated host immune defenses in the lung[J]. *Annu Rev Immunol*, 2013, 31: 605-633.
- [58] REN W K, LIU G, CHEN S, et al. Melatonin signaling in T cells: functions and applications[J]. *J Pineal Res*, 2017, 62(3): e12394.
- [59] ZHANG L, LI Y G, LI Y H, et al. Increased frequencies of Th22 cells as well as Th17 cells in the peripheral blood of patients with

- ankylosing spondylitis and rheumatoid arthritis[J]. PLoS One, 2012, 7(4): e31000.
- [60] DOLHAIN R J E M, van der HEIDEN A N, TER HAAR N T, et al. Shift toward T lymphocytes with a T helper 1 cytokine-secretion profile in the joints of patients with rheumatoid arthritis[J]. Arthritis Rheum, 1996, 39(12): 1961-1969.
- [61] NEES T A, ZHANG J A, PLATZER H, et al. Infiltration profile of regulatory T cells in osteoarthritis-related pain and disability[J]. Biomedicine, 2022, 10(9): 2111.
- [62] KELLY P A, BURCKART G J, VENKATARAMANAN R. Tacrolimus: a new immunosuppressive agent[J]. Am J Health Syst Pharm, 1995, 52(14): 1521-1535.
- [63] KITAHARA K, KAWAI S. Cyclosporine and tacrolimus for the treatment of rheumatoid arthritis[J]. Curr Opin Rheumatol, 2007, 19(3): 238-245.
- [64] BAGRI N K. Cyclosporine for systemic onset juvenile idiopathic arthritis: current stand and future directions[J]. Indian J Pediatr, 2019, 86(7): 576-577.
- [65] MANEIX L, BEAUCHEF G, SERVENT A, et al. 17 $\beta$ -oestradiol up-regulates the expression of a functional UDP-glucose dehydrogenase in articular chondrocytes: comparison with effects of cytokines and growth factors[J]. Rheumatology (Oxford), 2008, 47(3): 281-288.
- [66] CLAASSEN H, SCHÜNKE M, KURZ B. Estradiol protects cultured articular chondrocytes from oxygen-radical-induced damage[J]. Cell Tissue Res, 2005, 319(3): 439-445.
- [67] PANG H W, CHEN S H, KLYNE D M, et al. Low back pain and osteoarthritis pain: a perspective of estrogen[J]. Bone Res, 2023, 11(1): 42.

[本文编辑] 吴 洋

## 学术快讯

### 上海交通大学医学院-国家热带病研究中心全球健康学院殷堃课题组研发时空双维度分隔的一步法RPA-CRISPR检测平台

2024年2月15日,上海交通大学医学院-国家热带病研究中心全球健康学院殷堃课题组在国际期刊 *Chemical Engineering Journal* 发表题目为 *Spatiotemporal dual-dimensional separation enables ultra-simple one-pot CRISPR-based molecular diagnostics* 的研究论文。该研究构建了一种基于时空双维度分隔的一步法重组酶聚合酶扩增 (recombinase polymerase amplification, RPA) -成簇的规则间隔的短回文重复 (clustered regularly interspaced short palindromic repeat, CRISPR) 病原体快速检测平台。该平台通过设计物理屏障装置,实现两分隔体系自发动态融合,解决气溶胶污染及体系不兼容问题。该平台被用于沙门菌检测,表现出良好的特异度及灵敏度,为开发理想病原体检测方法提供了技术支撑。