

·数字中医药·

本文引用: 宋世雷, 陈跃平. 骨质疏松症铜死亡基因的免疫浸润分析及潜在中药预测[J]. 湖南中医药大学学报, 2024, 44(6): 1100-1109.

骨质疏松症铜死亡基因的免疫浸润分析及潜在中药预测

宋世雷¹, 陈跃平^{2*}

1. 广西中医药大学, 广西 南宁 530200; 2. 广西中医药大学附属瑞康医院, 广西 南宁 530011

[摘要] **目的** 通过分析铜死亡基因在骨质疏松症(osteoporosis, OP)免疫浸润中的作用, 探索与 OP 相关的免疫细胞、免疫功能、生物标志物和潜在治疗中药。**方法** 从 GEO 数据库检索下载 OP 数据集, 对其进行标准化处理和消除批次效应后合并。提取数据集中铜死亡的相关基因后, 进行免疫浸润分析并构建风险模型, 对铜死亡基因进行富集分析和中药预测。**结果** (1)对 GSE13850、GSE56116、GSE56815、GSE230665数据集合并后筛选出 18 个铜死亡基因;(2)树突状细胞、B 细胞、CD8⁺T 细胞等在细胞浸润中占比较高, 免疫细胞功能主要表现为抗原呈递共抑制、I 型干扰素反应、II 型干扰素反应等;(3)与健康对照组相比, 巨噬细胞与未成熟树突状细胞在 OP 患者组中呈现高表达, 而滤泡辅助性 T 细胞在健康对照组中显著表达;(4)SLC31A1 等 13 个铜死亡基因与 OP 免疫浸润相关, 其中, SLC31A1 最有可能是导致 OP 的风险因子;(5)OP 的进展涉及乙酰辅酶 A 生物合成与代谢等生物过程, 与脂肪酸代谢、三羧酸循环等通路相关;(6)共筛选出鱼鳔胶等 10 味重要中药, 四气多属温、平, 五味多属甘, 归肾、脾经, 功效多为补气、健脾、补肾、活血、行气和止痛。**结论** 铜死亡基因可能通过干预免疫细胞和功能参与 OP 的进展。SLC31A1 等铜死亡基因可能有助于阐释 OP 的发病机制, 并成为潜在的生物学标志物及治疗靶点, 鱼鳔胶等中药可能是防治 OP 潜在分子药物的来源。

[关键词] 铜死亡; 骨质疏松症; 免疫浸润; 单样本基因集富集分析; 中药预测

[中图分类号] R274.9

[文献标志码] A

[文章编号] doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2024.06.025

Immune infiltration analysis of cuproptosis-related genes in osteoporosis and prediction of potential Chinese medicines

SONG ShiLei¹, CHEN Yueping^{2*}

1. Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning, Guangxi 530200, China; 2. Ruikang Hospital of Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning, Guangxi 530011, China

[Abstract] **Objective** To analyze the role of cuproptosis-related genes in immune infiltration of osteoporosis (OP), so as to explore the immune cells, immune function, biomarkers, and potential therapeutic Chinese medicines related to OP. **Methods** The OP datasets were retrieved and downloaded from the GEO database, and they were standardized and merged after eliminating batch effects. After extracting the relevant cuproptosis-related genes from the datasets, the immune infiltration analysis was carried out and the risk model was constructed to perform enrichment analysis on the cuproptosis-related genes and to predict Chinese medicines with potential therapeutic effects. **Results** (1) Eighteen cuproptosis-related genes were screened from the merged datasets of GSE13850, GSE56116, GSE56815, and GSE230665; (2) dendritic cells, B cells, CD8⁺T cells, and other cells accounted for a relatively high proportion in cell infiltration, and immune cell functions mainly manifested as antigen presentation co-suppression,

[收稿日期] 2024-03-03

[基金项目] 国家自然科学基金项目(82360937); 广西中医药大学 A 类“桂派中医药传承创新团队”(2022A004)。

[通信作者] * 陈跃平, 男, 博士, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, E-mail: chen Yueping0007@126.com。

type I interferon response, type II interferon response, and others; (3) compared with the healthy control group, macrophages and immature dendritic cells were highly expressed in the OP group, while follicular helper T cells were significantly expressed in the healthy control group; (4) thirteen cuproptosis-related genes including *SLC31A1* were associated with OP immune infiltration, among which *SLC31A1* was the most likely risk factor for OP; (5) the progress of OP involved biological processes such as acetyl-CoA biosynthesis and metabolism, which were related to fatty acid metabolism, tricarboxylic acid cycle, and other pathways; (6) a total of ten important Chinese medicines, including fish bladder glue, were screened out. Most of them are warm and neutral in property, sweet in flavour, and access the kidney and spleen meridians. And their effects are mostly supplementing qi, strengthening the spleen, tonifying the kidney, circulating blood, moving qi, and alleviating pain. **Conclusion** Cuproptosis-related genes may be involved in the progression of OP by intervening with immune cells and functions. Those such as *SLC31A1* may help elucidate the pathogenesis of OP and become potential biological markers and therapeutic targets. Moreover, Chinese medicines such as fish bladder glue may be the source of potential molecular drugs for OP prevention and treatment.

[**Keywords**] cuproptosis; osteoporosis; immune infiltration; single-sample gene set enrichment analysis; Chinese medicines prediction

骨质疏松症(osteoporosis, OP)作为一种骨科代谢性疾病,病理改变通常表现为骨密度与骨强度的降低,这极大增加了骨折的发生风险。随着医疗卫生的不断改善,人口老龄化日趋加重,OP的患病率逐年升高^[1]。目前认为骨代谢紊乱、免疫系统失衡、激素水平改变、遗传因素等是OP重要的致病因素^[2]。随着对骨免疫的深入研究,研究者发现,B细胞和T细胞等免疫细胞在维持骨骼健康方面发挥重要作用,受T细胞调节的肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)被证明可以加速成骨细胞的凋亡;B细胞产生的破骨细胞分化因子可刺激破骨细胞生成,从而加速骨丢失^[2]。此外,有研究发现,骨相关炎症疾病如类风湿关节炎、骨关节炎、牙周炎等均存在骨丢失,骨代谢失衡导致的骨丢失与免疫细胞具有一定的关联^[3]。因此,通过对OP的免疫浸润机制研究,可以发现致病性的免疫细胞和免疫功能,并寻找方法对其进行消除或抑制,对治疗OP具有重要意义。

铜在生命过程中是一种不可或缺的元素,它作为酶的辅助因子参与线粒体三羧酸循环(tricarboxylic acid cycle, TCA)等多种生理途径。研究发现,铜离子与TCA中的脂酰化成分结合,可导致脂酰化蛋白的异常聚集和铁-硫簇蛋白的丢失,从而引发蛋白负荷应激,最终导致细胞死亡^[4]。同时,铜也参与免疫系统的多种功能,包括调节先天性免疫细胞的激活,影响组织中免疫细胞的分布等^[5]。目前,多个研究发现,铜死亡基因对免疫细胞在组织中的表达具有一定影响,比如对正常膀胱组织与膀胱癌组织的免疫浸润数据分析发现,铜死亡基因的高表达促使T细胞与B细胞等出现高表达^[6];另一项铜

死亡基因对克罗恩病的免疫浸润影响机制研究也得到类似的结果^[7]。上述研究说明铜死亡可能与免疫系统的调控和炎症反应等过程密切相关。目前,铜死亡引起OP的机制研究虽并不完善,但结合铜死亡基因对免疫细胞的影响以及免疫细胞对骨代谢的影响,可得出铜死亡基因可能通过介导免疫细胞从而对骨代谢平衡产生影响。深入了解铜死亡在免疫浸润中的作用机制,有助于揭示细胞死亡与免疫调节之间的相互关系,为OP的治疗提供新的思路。因此,本研究旨在通过生物信息学方法,深入研究铜死亡基因在OP免疫浸润中的作用。

本研究通过对OP铜死亡基因的筛选,将筛选出的铜死亡基因与免疫细胞及功能之间进行相关分析,同时,分析铜死亡基因与免疫浸润之间的相关性。此外,通过构建风险预测模型,筛选出关键基因并对其进行富集分析和中药预测。通过解析铜死亡基因的潜在功能和与其相互作用的免疫浸润网络,分析中药治疗OP的生物标志物与药物靶点,为中医治疗OP提供理论依据。

1 资料与方法

1.1 相关软件及数据库信息

本次研究使用的软件及数据库的相关信息如下。GEO数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>); Perl语言5.38.0;R语言4.3.1;分子特征数据库(<https://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/>);miRBase数据库(<https://www.mirbase.org/>);miRDB数据库(<http://mirdb.org/>);miRWalk数据库(<http://mirwalk.umm.uni-heidelberg.de/>);TargetScan数据库(https://www.targetscan.org/vert_80/);spongeScan数据库(<http://spongescan.rc>).

uff.edu); Coremine Medical 数据库(<https://www.coremine.com/>); Cytoscape 软件 3.10.1。

1.2 OP 原始数据及铜死亡基因获取

以“Osteoporosis”“Gene expression”为关键词,以“Expression profiling by array”“Homo sapiens”“Series”为限定标准,从 GEO 数据库下载 OP 基因表达探针矩阵文件及平台文件。通过对检索结果进一步筛选,最后纳入 4 个数据集,包括 GSE13850、GSE56116、GSE56815 和 GSE230665,共包含 82 例 OP 患者(OP 患者组)与 66 例健康者(健康对照组),数据集分别由 GPL570 平台、GPL4133 平台、GPL570 平台、GPL10332 平台生成。

检索国内、外文献相关网站,如中国知网、中国生物医学文献数据库,Embase、PubMed 等。以“铜死亡”为中文检索词,以“Cuproptosis”为英文检索词,同时追踪纳入研究的参考文献,检索时限均为建库至 2023 年 10 月 30 日。

1.3 数据处理

利用 Perl 语言对下载的 4 个数据集进行标准化处理,获得含有基因名的 OP 矩阵文件,利用 R 语言的“limma”包(版本 3.2)和“SVA”包(版本 3.8)对基因表达水平进行标准化处理,并对合并后的矩阵进行批次校正。根据结果绘制批次校正前和批次校正后的主成分分析(principal components analysis, PCA)图,同时输出合并后的基因表达矩阵,对合并输出后的基因进行铜死亡基因筛选,最终获得铜死亡基因表达矩阵。

1.4 免疫细胞和功能的提取与量化

在分子特征数据库中搜索关键词“Immunity”,下载相关数据文件“gmt”,使用 R 语言中的“GSVA”数据处理包对 4 个数据集进行合并处理分析,使用单样本基因集富集分析(single-sample gene set enrichment analysis, ssGSEA)对合并后的基因表达矩阵进行分析。最后,使用 R 语言的“pheatmap”包绘制热图。

1.5 免疫浸润的相关性分析

为探索不同免疫细胞间的关联以及不同免疫功能间的关联,运用 R 语言中的“corrplot”数据处理包进行相关性分析,并联合 ssGSEA 得出的结果,最终获得免疫细胞间以及免疫功能间的相关性信息。

1.6 免疫浸润的差异性分析

为比较 OP 患者组和健康对照组中免疫细胞以及免疫功能的差异,将样本的分组信息与 ssGSEA 表达矩阵结果进行整合。随后,运用 R 语言的“gg-

pubr”包进行秩和检验,并以箱线图的形式展示结果,以便筛选出在两组之间存在显著差异的免疫细胞和免疫功能。

1.7 铜死亡基因与免疫浸润及免疫功能的相关性分析

将“1.4”获得的 ssGSEA 表达矩阵与筛选出的铜死亡基因进行整合,并运用 R 语言中的“psych”数据包对两者进行相关性分析,使用 R 语言的“ggcorrplot”包对相关系数进行可视化处理,绘制相关性热图。最后,筛选出与免疫浸润结果具有强相关性的铜死亡基因。

1.8 预测模型的构建与验证

运用铜死亡关键基因表达矩阵中的健康对照组样本和 OP 患者组样本的分组数据构建 Logistic 回归风险模型,得到相关风险评分,以风险评分的中位数作为分割点,高于中位数代表高风险,低于中位数代表低风险。再利用 R 语言的“rms”包,构建风险预测图。并通过校准曲线和受试者工作曲线(receiver operating characteristic, ROC)进行验证,评估模型的准确性。

1.9 GO 与 KEGG 富集分析

运用 R 语言的“clusterProfiler”包对筛选获得的铜死亡关键基因表达矩阵进行基因本体论(gene ontology, GO)与京都基因与基因组数据库(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)富集分析,将获得的结果再利用 R 语言的“ggplot2”包进行可视化处理。

1.10 潜在中药的筛选预测

在 Coremine Medical 数据库中逐个检索关键基因和 GO 富集分析中与免疫浸润相关的生物过程,包括乙酰辅酶 A 生物合成与代谢、核苷二磷酸生物合成、巨噬细胞凋亡过程、白细胞凋亡过程、干细胞分化、白细胞迁移和白细胞介素-1(interleukin-1, IL-1)的产生等,筛选“Traditional Chinese Medicine”模块中的信息,以确定其中具有潜在治疗作用的中药。随后采用秩和检验统计分析,并以 $P < 0.01$ 为筛选条件,筛选对各预测靶标具有生物学效应的前 10 味中药,对中药的四气五味、归经和功效进行统计分析。

2 结果

2.1 铜死亡基因检索结果

通过检索相关文献(4 篇^[3-6])以及相关数据库,共获得 19 个与铜死亡相关的基因,包括 *NFE2L2*、*NLRP3*、*ATP7B*、*ATP7A*、*DLAT*、*PDHA1*、*PDHB*、*MTF1*、

SLC31A1、*FDX1*、*LIAS*、*LIPT1*、*LIPT2*、*DLD*、*GLS*、*CDKN2A*、*DBT*、*GCSH*、*DLST*。

2.2 PCA 分析和铜死亡基因提取

对 4 个数据集的基因表达水平进行标准化处理后,去除数据集间的批次效应并进行合并,输出合并后的数据集。再根据结果绘制批次校正前和批次校正后的 PCA 图(图 1A)。在批次校正前的 PCA 图中,不同批次之间存在明显的分离现象。而在批次校正后,批次之间发生重叠,表明批次校正成功地消除了批次效应。再提取该矩阵中的铜死亡基因,共得到 18 个铜死亡基因组成的表达矩阵(图 1B)。

2.3 免疫细胞和免疫功能的浸润情况

本研究共涉及 29 种免疫细胞和免疫功能的类型,免疫细胞包括活化树突状细胞(activated dendritic cells, aDCs)、B 细胞、CD8⁺T 细胞等;免疫功能则包括抗原呈递共抑制、I 型干扰素反应、II 型干扰素反应等。使用 ssGSEA 算法计算合并后的数据集中免疫细胞及免疫功能在各个样本中的表达水平。详见图 2。

2.4 免疫细胞间、免疫功能间的相关性

本研究通过分析 OP 中免疫细胞间的相关性发现,肿瘤浸润淋巴细胞(tumor infiltrating lymphocytes,

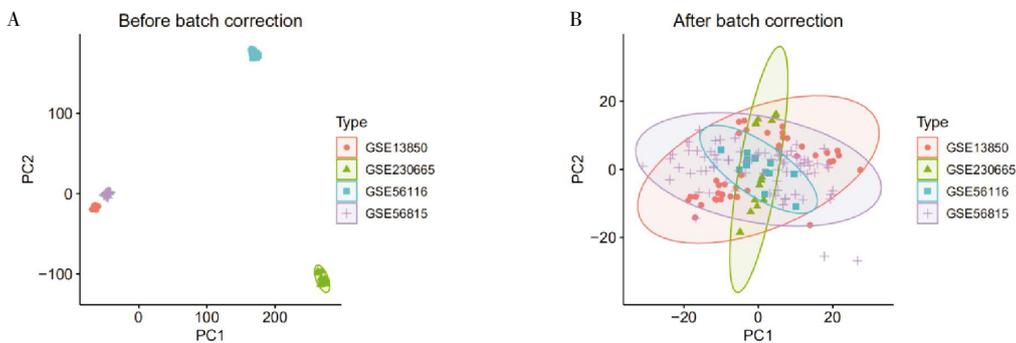


图 1 PCA 图

注:A 代表批次校正前;B 代表批次校正后。

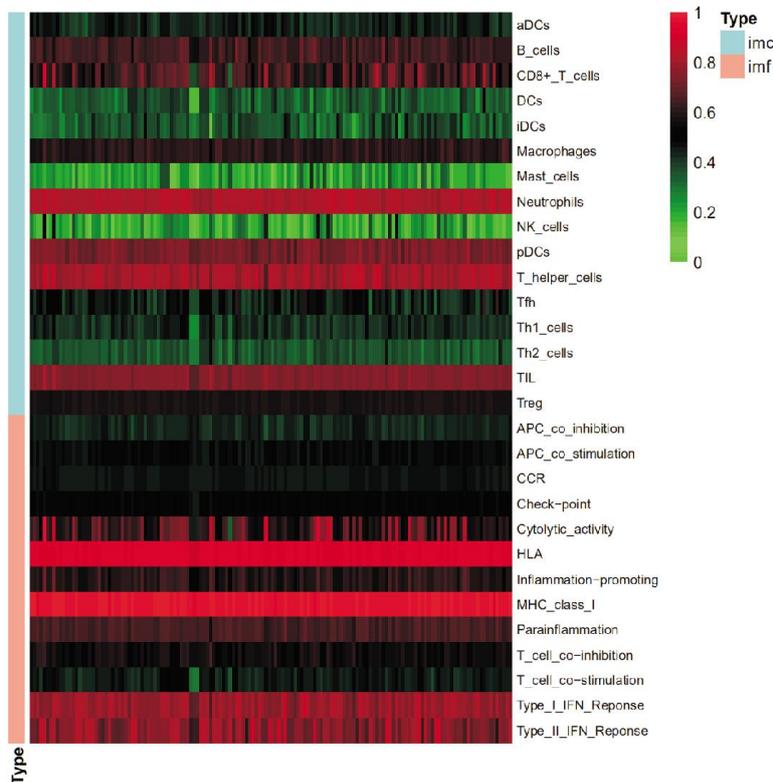


图 2 免疫细胞和免疫功能在各样本中的表达水平

注:纵坐标中的浅蓝色代表免疫细胞、粉红色代表免疫功能;图中的红色代表正相关、绿色代表负相关,颜色越深代表相关性越高。

TIL)与辅助性 T 淋巴细胞呈强正相关性($r=0.77$)、TIL 与 CD8⁺T 细胞呈强正相关性($r=0.67$)。通过分析 OP 中免疫功能间的相关性发现,细胞溶解活性与促进炎症活动呈强正相关性($r=0.78$)、T 细胞共刺激与免疫细胞检查点呈强正相关性($r=0.76$)。详见图 3。

2.5 差异性免疫细胞和免疫功能

对 OP 患者组与健康对照组进行组间免疫细胞差异分析, $P<0.05$ 则代表差异具有显著性。结果显示,未成熟树突状细胞、巨噬细胞在 OP 患者组中显著表达($P<0.01$),而滤泡辅助 T 细胞在健康对照组中显著表达($P<0.01$)。对 OP 患者组与健康对照组

进行组间免疫功能差异分析, $P<0.05$ 则代表差异具有显著性。结果显示,趋化因子受体、组织相容性复合体 I 在 OP 患者组中显著表达($P<0.01$)。详见图 4。

2.6 铜死亡基因与免疫浸润的相关性

对 OP 铜死亡相关基因与免疫浸润结果进行相关性分析,见图 5。结果显示,多个铜死亡基因如 *SLC31A1*、*PDHB*、*PDHA1*、*NFE2L2* 等与多个免疫细胞及功能之间存在显著的相关性。将上述基因作为本次研究的关键基因,用于后续的风险预测模型、KEGG 和 GO 富集分析等。

2.7 预测模型的构建

从构建的风险预测模型中可看出铜死亡基因

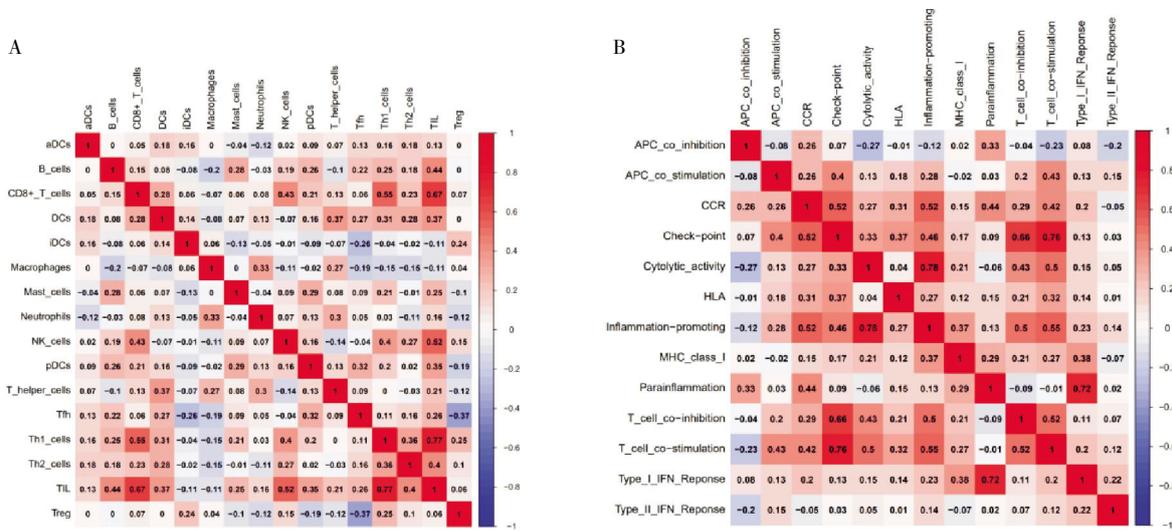


图 3 免疫细胞间、免疫功能间的相关性

注:A.免疫细胞间的相关性热图;B.免疫功能间的相关性热图;红色为正相关、蓝色为负相关,颜色越深代表相关性越强。

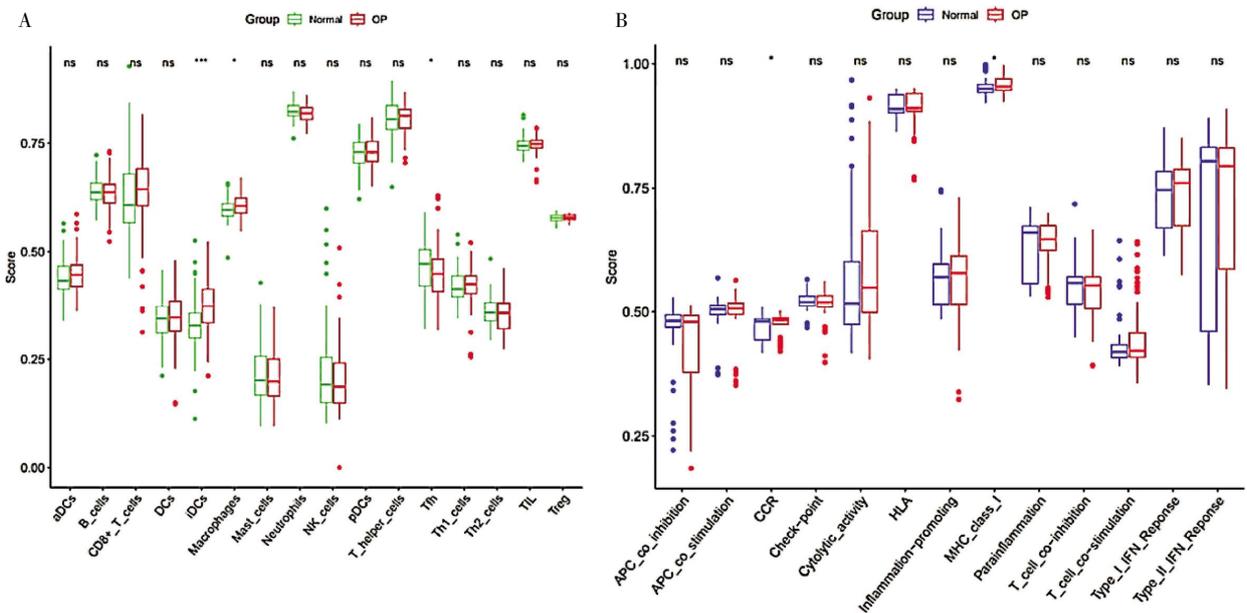


图 4 差异性分析箱线图

注:A.免疫细胞差异性分析箱线图;B.免疫功能差异性分析箱线图;“*”代表 $P<0.05$ ，“***”代表 $P<0.001$ ，“ns”代表差异无统计学意义。

SLC31A1 最有可能是导致 OP 的风险因子。ROC 曲线评估可见 AUC 值为 0.72, 大于 0.6, 说明预测模型的列线图具有较高的准确性, 具有高度的诊断效能。

校正曲线显示, 其与理想曲线拟合较好, 说明预测模型在预测准确性方面表现出了很高的可信度。详见图 6。

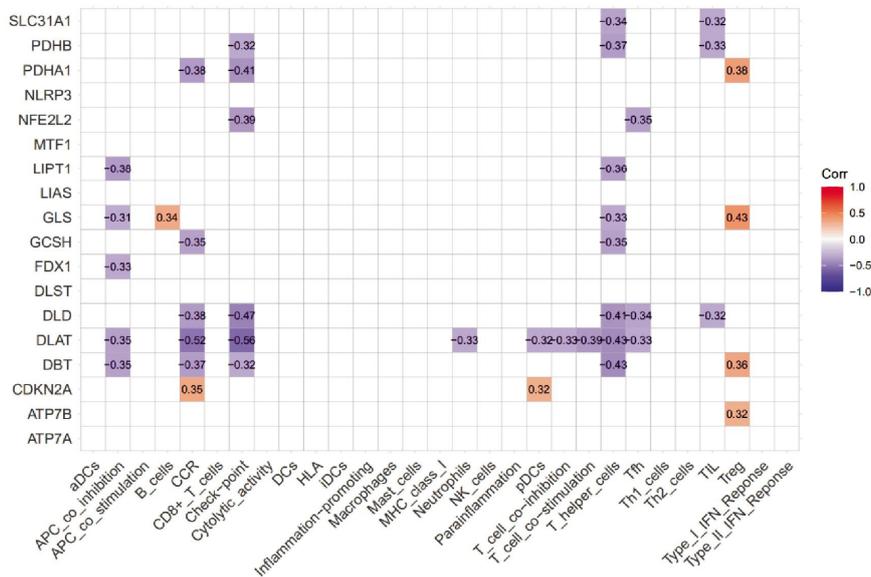


图 5 铜死亡基因与免疫浸润相关性分析热图

注: 橙色代表正相关, 紫色代表负相关。

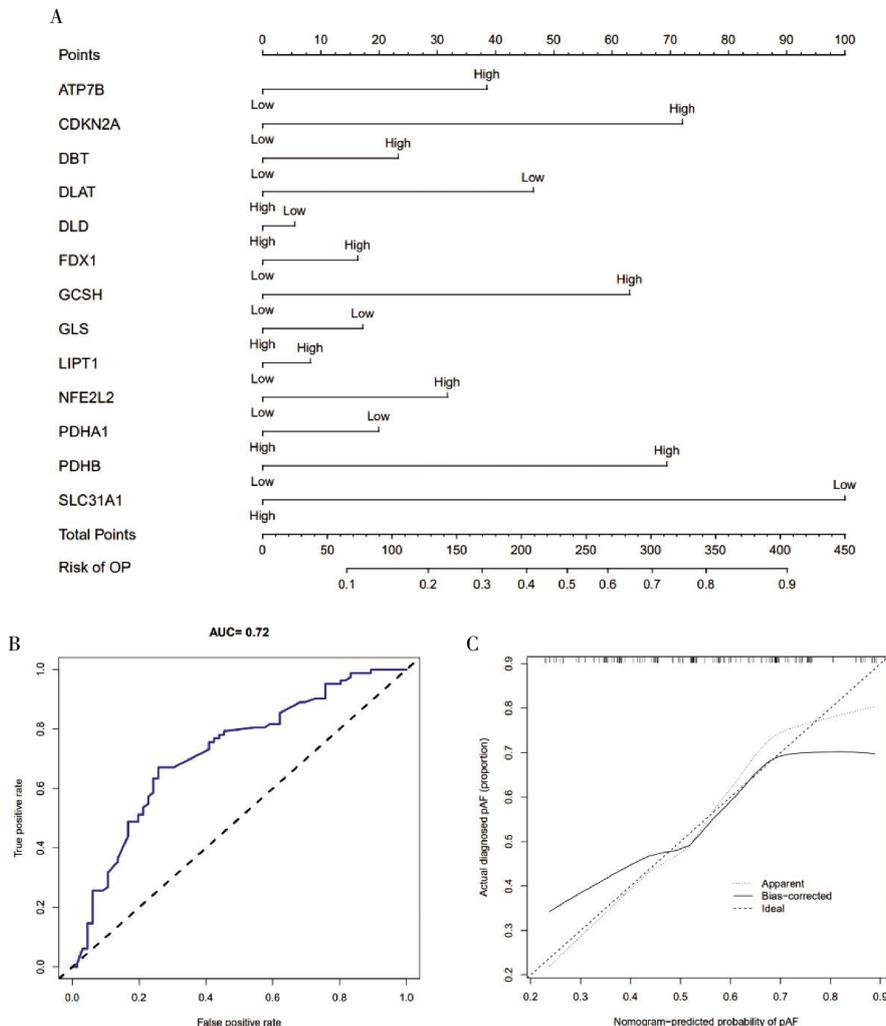


图 6 OP 的预测模型结果图

注: A. 列线图模型; B. 列线图模型的 ROC 曲线; C. 列线图模型的校准曲线。

2.8 GO 与 KEGG 富集分析

对 13 个关键基因进行 GO 和 KEGG 富集分析。GO 富集分析结果表明,关键基因主要富集在乙酰辅酶 A 生物合成与代谢、核苷二磷酸生物合成、巨噬细胞凋亡过程、白细胞凋亡过程、干细胞分化、白细胞迁移和 IL-1 的产生等生物过程中;在细胞成分上,主要有线粒体基质、氧化还原酶复合体和 TCA 酶复合体;分子功能方面,主要在氧化还原酶活性、

过渡金属离子跨膜转运体活性和酰基转移酶活性中发挥作用(图 7)。分析结果显示,在所有生物过程中,巨噬细胞凋亡过程、白细胞凋亡过程、干细胞分化、白细胞迁移和 IL-1 的产生与免疫浸润关系密切。KEGG 富集分析结果表明,OP 的关键基因主要在脂肪酸代谢、TCA、2-酮羧酸代谢和丙酮酸代谢中被激活(图 8)。

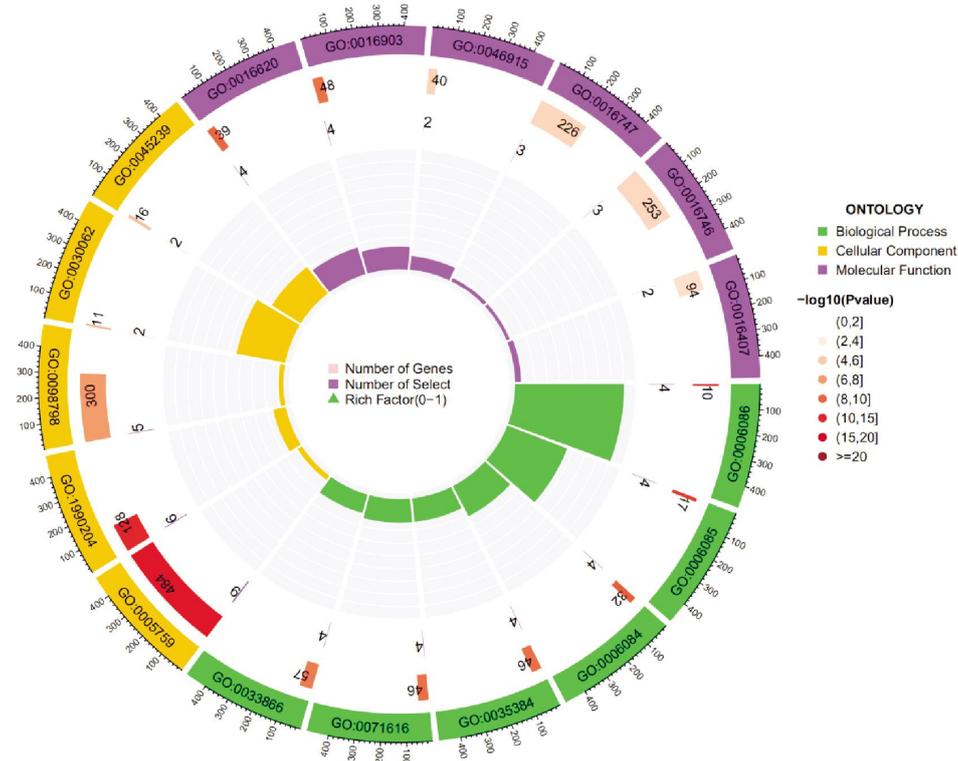


图 7 GO 富集分析结果(前 6 项)

注:绿色代表生物过程,黄色代表细胞成分,紫色代表分子功能。

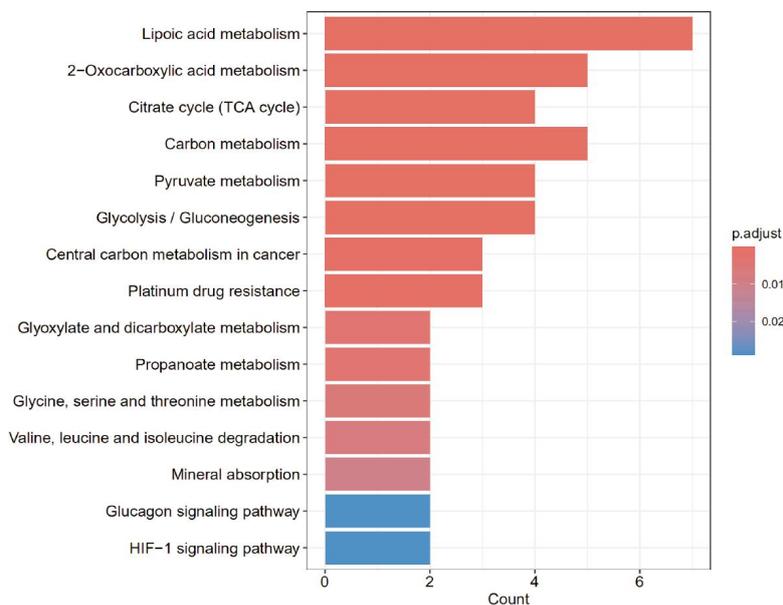


图 8 KEGG 富集分析结果

注:纵坐标代表分子机制,横坐标代表相关性系数;红色为正相关,蓝色为负相关。

2.9 中药预测结果

通过 Coremine Medical 数据库,以 $P<0.01$ 作为筛选标准,对关键基因和免疫浸润相关的生物过程进行中药预测,共得到 156 种中药。为了更好地展示预测结果,将结果导入 Cytoscape 软件,创建可视化网络图。该网络中排名前 10 位的中药为鱼鳔胶、鱼脑石、柴胡、姜黄、郁金、灵芝、人参、甘草、黄芪和

白术(图 9),表明它们是治疗 OP 的主要药物。四气五味、归经与功效分析结果显示,药物四气多属温、平,五味多属甘,归经主要集中在肾、脾经,功效多为补气、健脾、补肾、活血、行气和止痛(图 10)。

3 讨论

OP 为一种全身性代谢性疾病,其主要特征在于

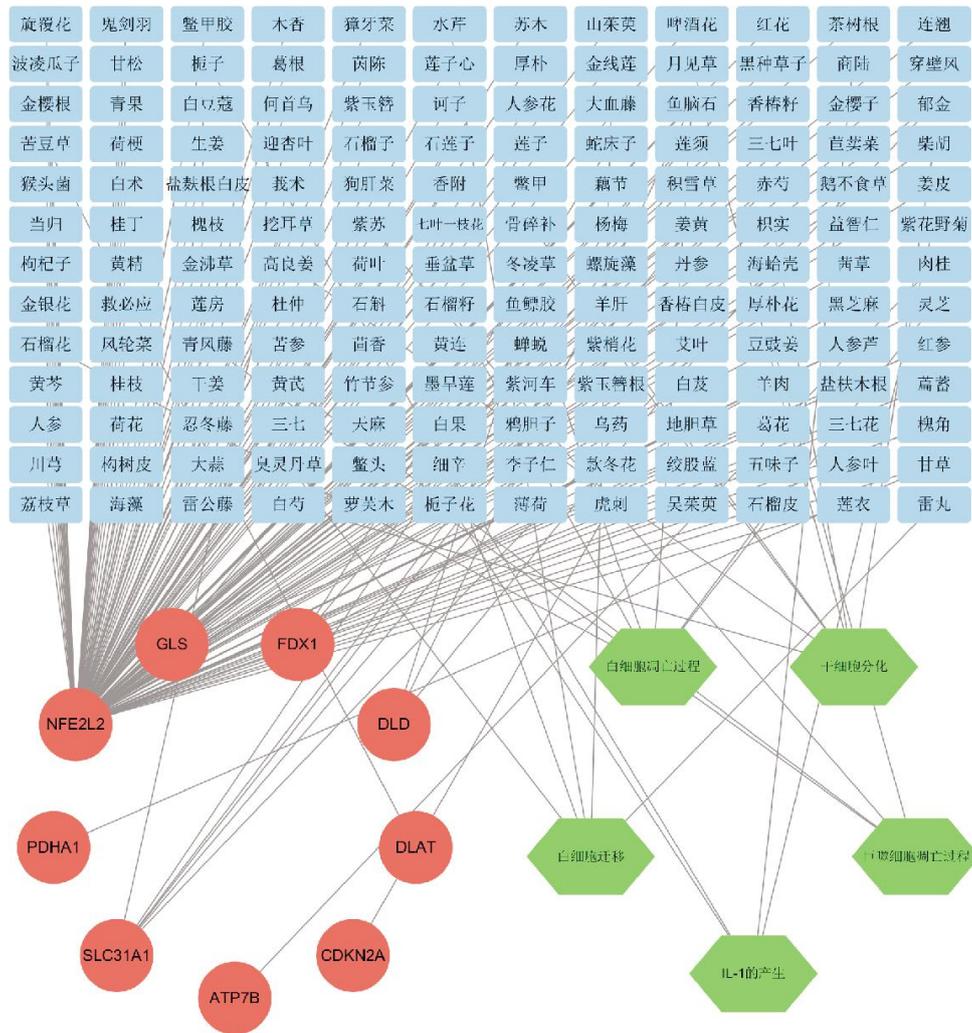


图 9 中药预测网络图

注:蓝色代表药物,红色代表基因名称,绿色代表生物过程。

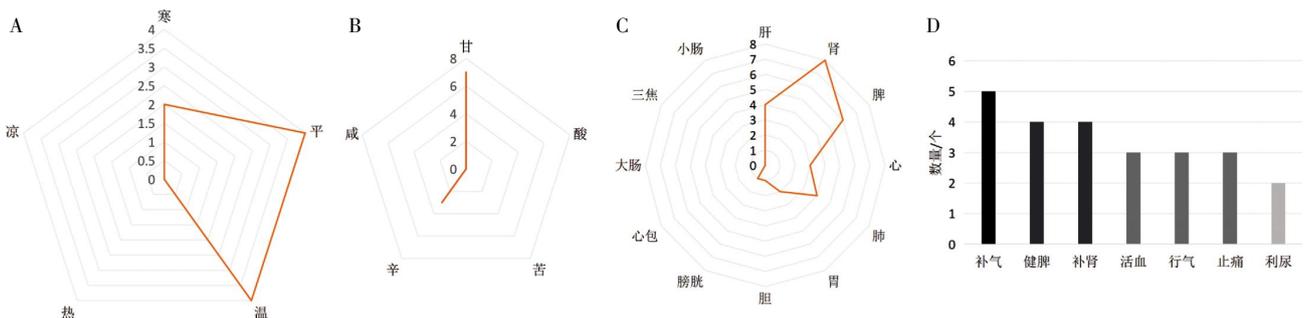


图 10 中药筛选与分析结果

注:A.四气统计雷达图;B.五味统计雷达图;C.归经统计雷达图;D.功效柱状图。

骨骼系统的不平衡状态。骨骼系统与免疫系统之间存在紧密的关联,免疫细胞在调节骨代谢中扮演着重要角色,如B细胞参与骨吸收和骨形成的调节、T细胞则通过调控炎症反应和细胞信号传导对骨骼健康产生影响^[8-9]。此外,与免疫系统相关的因素也可能在OP的预防和管理中扮演关键角色^[10]。因此,识别和探讨OP免疫相关的分子机制对其治疗具有重要意义。

本研究通过分析免疫细胞间和免疫功能间的相关性发现,OP与免疫系统之间存在紧密关联。我们发现TIL与辅助性T细胞、TIL与CD8⁺T细胞之间存在强正相关性,表明它们在OP中的协同作用可能有助于维持骨质的稳定性。辅助性T细胞可通过调节TIL的免疫反应,发挥维持骨骼健康的作用,而CD8⁺T细胞则在清除受损细胞方面发挥关键作用^[11-12]。对于免疫功能的相关性分析发现,细胞溶解活性与炎症促进活动之间存在强正相关性,表明免疫系统的活性和免疫调控之间存在密切的互动。细胞溶解活性代表免疫系统清除异常细胞的潜力,而炎症促进活动则涵盖了免疫系统引发炎症的功能。这种正相关性提示,细胞的溶解和炎症过程可能存在相互促进作用^[13]。另外,T细胞共刺激与免疫细胞检查点也呈强正相关性,表明T细胞的激活和免疫调节之间存在动态平衡。T细胞共刺激代表T细胞相互协作的过程,而免疫细胞检查点则代表免疫系统中的一种负性调控机制,这种相关性对于维持免疫平衡和骨骼健康至关重要^[14]。

通过分析免疫细胞和免疫功能的差异性发现,免疫系统的异常活跃状态可能是导致OP发生发展的重要原因。在OP患者中,树突状细胞、巨噬细胞、趋化因子受体、组织相容性复合体I表达显著增加。其中树突状细胞可以通过呈递抗原和激活T细胞的方式引发免疫反应,然而在OP病理情况下,树突状细胞可能异常激活T细胞,诱发T细胞产生炎症因子,进而导致骨质吸收增加^[15]。巨噬细胞在炎症条件下,会分泌肿瘤坏死因子和IL-1等炎症介质,进而促进成骨细胞的凋亡和骨吸收^[16]。本研究结果发现,趋化因子受体和组织相容性复合体I显著表达,说明OP患者的免疫系统处于高度活跃状态,可能导致免疫细胞进入骨组织并产生细胞毒性效应。这些细胞会攻击健康的骨组织并引发骨骼中的细胞

凋亡和溶解,导致骨质丢失^[17]。在健康对照组中,滤泡辅助T细胞的显著表达反映了其在维持正常骨骼健康中的重要作用。滤泡辅助T细胞通常参与抗体产生和细胞免疫应答,在淋巴组织中的定位使其能够调控局部免疫应答并产生抗体,有助于维持骨骼的免疫平衡,确保不会发生过度的骨质吸收或不适当的免疫反应^[12]。

为进一步探究铜死亡在OP免疫浸润方面的机制,运用风险模型筛选出与OP免疫浸润相关的13个铜死亡基因,包括*SLC31A1*、*PDHB*、*PDHA1*、*NFE2L2*、*LIPT1*等,其中*SLC31A1*最有可能是导致OP的风险因子。研究发现^[18-20],*SLC31A1*和*ATP7B*编码铜转运蛋白,有助于维持免疫细胞内的铜平衡,进而维持其抗氧化和免疫功能;在OP中,*SLC31A1*和*ATP7B*的异常表达会导致免疫细胞内铜供应不足,降低其抗氧化能力,导致细胞更容易受到氧化应激的损害,并影响免疫细胞的相互作用和信号传导。*PDHB*、*PDHA1*、*DLD*和*DLAT*编码的线粒体脱氢酶在免疫细胞中参与葡萄糖代谢和线粒体呼吸,并提供所需的能量和功能,而免疫细胞在激活状态下具有高能量需求,因此,异常的葡萄糖代谢和线粒体功能会对免疫细胞的活性和功能产生不利影响,继而影响骨代谢^[3,21]。*LIPT1*与脂质代谢和细胞膜组成紧密相关,细胞膜的组成对于免疫细胞的功能和信号传导至关重要,而异常的脂质代谢会导致细胞膜受损、信号传导异常以及免疫平衡紊乱,进而干扰免疫细胞对骨组织的免疫反应^[22]。*CDKN2A*编码细胞周期抑制蛋白,对细胞的增殖和生存起调控作用,然而,*CDKN2A*的过表达会导致免疫细胞的数量减少、功能降低,从而对OP的免疫反应产生影响^[23-24]。上述基因都有可靠的证据支持其参与调控铜死亡,但关于*NFE2L2*、*GLS*、*GCSH*、*FDX1*和*DBT*调控铜死亡在OP中的作用研究尚未见报道。综合本研究结果发现,铜和铜死亡相关基因介导免疫细胞的功能、代谢和抗氧化反应,对OP免疫浸润产生影响,进一步提示铜死亡与OP发病机制密切相关。

中医学并无OP病名,根据其临床症状及病因病机特点,可将其归属于“骨痿”的范畴。目前,临床上将OP分为肾虚血瘀证、肝肾阴虚证、脾肾阳虚证、气滞血瘀证和脾肾阳虚兼血瘀证^[25]。本研究对铜死亡基因进行相应的中药预测发现,筛选出的药物

药性主要为温,药味主要为平、甘,归经主要为肾、脾、肺经,功效主要为补肾、健脾、补气等,这与上述病机相对应,并且有中医学者^[26]认为“以补肾壮骨、益精填髓为主,健脾益气、和胃助运为辅”是治疗 OP 的主要方法,由此可见本次通过基因筛选出的药物具有一定的准确性。

目前,尚未见生物信息学结合预测中药技术与证候实质相关的研究报道。本研究运用生物信息学筛选 OP 铜死亡基因、预测中药,将有望为其证候实质研究提供前期理论基础。

参考文献

- [1] LI Z C, LI D D, CHEN R C, et al. Cell death regulation: A new way for natural products to treat osteoporosis[J]. *Pharmacological Research*, 2023, 187: 106635.
- [2] FISCHER V, HAFFNER-LUNTZER M. Interaction between bone and immune cells: Implications for postmenopausal osteoporosis[J]. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 2022, 123: 14–21.
- [3] LI D, GAO Z, LI Q, et al. Cuproptosis—a potential target for the treatment of osteoporosis[J]. *Frontiers in Endocrinology*, 2023, 5(14): 1135181.
- [4] TSVETKOV P, COY S, PETROVA B, et al. Copper induces cell death by targeting lipoylated TCA cycle proteins[J]. *Science*, 2022, 375(6586): 1254–1261.
- [5] CHANG B, HU Z, CHEN L, et al. Development and validation of cuproptosis-related genes in synovitis during osteoarthritis progress[J]. *Frontiers in Immunology*, 2023, 14: 1090596.
- [6] 卓桂锋, 陈 炜, 朱健敏, 等. 血管性痴呆铜死亡关键差异基因的生物信息学分析及防治中药筛选[J]. *中草药*, 2023, 54(21): 7120–7129.
- [7] SONG Q, ZHOU R, SHU F, et al. Cuproptosis scoring system to predict the clinical outcome and immune response in bladder cancer[J]. *Frontiers in Immunology*, 2022, 4 (13): 958368.
- [8] YUAN Y F, FU M Y, LI N, et al. Identification of immune infiltration and cuproptosis-related subgroups in Crohn's disease[J]. *Frontiers in Immunology*, 2022, 13: 1074271.
- [9] 杨会军, 郭 响, 李伟青, 等. 靶向铜死亡相关基因治疗类风湿关节炎生物信息学分析及干预中药的预测[J]. *中草药*, 2023, 54 (13): 4253–4265.
- [10] 郭曹培, 程飘涛, 杨成兵, 等. 骨免疫与骨代谢[J]. *中国组织工程研究*, 2024, 28(14): 2261–2266.
- [11] AHMAD S S, AHMED F, ALI R, et al. Immunology of osteoporosis: Relevance of inflammatory targets for the development of novel interventions[J]. *Immunotherapy*, 2022, 14(10): 815–831.
- [12] 何姣姣, 陈以发, 陈玉林, 等. 绝经后骨质疏松的骨免疫学机制[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2023, 29(7): 1032–1036.
- [13] SRIVASTAVA R K, DAR H Y, MISHRA P K. Immunoporosis: Immunology of osteoporosis—role of T cells[J]. *Frontiers in Immunology*, 2018, 9: 657.
- [14] D'ABRAMO A, ZINGAROPOLI M A, OLIVA A, et al. Higher levels of osteoprotegerin and immune activation/immunosenescence markers are correlated with concomitant bone and endovascular damage in HIV-suppressed patients[J]. *PLoS One*, 2016, 11(2): e0149601.
- [15] CRON R Q, GOYAL G, CHATHAM W W. Cytokine storm syndrome[J]. *Annual Review of Medicine*, 2023, 74: 321–337.
- [16] ZHENG D, WEI Z, GUO W C. Identification of a solute carrier family-based signature for predicting overall survival in osteosarcoma[J]. *Frontiers in Genetics*, 2022, 13: 849789.
- [17] LIU Y C G, TENG A Y T. Potential contribution of immature myeloid CD11c+dendritic cells-derived osteoclast precursor to inflammation-induced bone loss in the TRAF6-null chimeras in-vivo[J]. *Journal of Dental Sciences*, 2023, 18(3): 1372–1377.
- [18] VERONESE N, REGINSTER J Y. The effects of calorie restriction, intermittent fasting and vegetarian diets on bone health[J]. *Aging Clinical and Experimental Research*, 2019, 31 (6): 753–758.
- [19] ZHANG W J, DANG K, HUAI Y, et al. Osteoimmunology: The regulatory roles of T lymphocytes in osteoporosis[J]. *Frontiers in Endocrinology*, 2020, 11: 465.
- [20] QI Y, YAO Q Q, LI X Y, et al. Cuproptosis-related gene SLC31A1: Prognosis values and potential biological functions in cancer[J]. *Scientific Reports*, 2023, 13(1): 17790.
- [21] TANG S, LIANG C, HOU W, et al. ATP7B R778L mutant hepatocytes resist copper toxicity by activating autophagy and inhibiting necroptosis[J]. *Cell Death Discovery*, 2023, 9(1): 344.
- [22] CIPRIANI C, COLANGELO L, SANTORI R, et al. The interplay between bone and glucose metabolism[J]. *Frontiers in Endocrinology*, 2020, 11: 122.
- [23] NI M, SOLMONSON A, PAN C X, et al. Functional assessment of lipoyltransferase-1 deficiency in cells, mice, and humans[J]. *Cell Reports*, 2019, 27(5): 1376–1386.
- [24] HATZISTERGOS K E, WILLIAMS A R, DYKXHOORN D, et al. Tumor suppressors RB1 and CDKN2a cooperatively regulate cell-cycle progression and differentiation during cardiomyocyte development and repair[J]. *Circulation Research*, 2019, 124(8): 1184–1197.
- [25] 中华中医药学会. 骨质疏松性骨折中医诊疗指南[J]. *中医正骨*, 2023, 35(1): 1–9.
- [26] 张 辽, 叶有骏, 邓颖萍, 等. 叶海从肝脾肾论治绝经后骨质疏松性骨关节炎经验撷菁[J]. *浙江中医杂志*, 2023, 58(11): 803–804.