

本文引用: 唐 暹, 周丹丹, 尹林玉, 余 艳, 刘松涛, 艾 坤. 基于 PBMCs 转录组学探讨抗阻运动改善绝经后骨质疏松症患者骨代谢的作用机制[J]. 湖南中医药大学学报, 2026, 46(5): 964-974.

基于 PBMCs 转录组学探讨抗阻运动改善绝经后骨质疏松症患者骨代谢的作用机制

唐 暹¹, 周丹丹¹, 尹林玉², 余 艳¹, 刘松涛^{1,2*}, 艾 坤^{1*}

1. 湖南中医药大学, 湖南 长沙 410208; 2. 湘南学院附属医院, 湖南 郴州 423000

[摘要] **目的** 基于外周血单核细胞(PBMCs)转录组学分析,探讨3个月中等强度抗阻运动改善绝经后骨质疏松症(PMOP)患者骨代谢的潜在作用机制。**方法** 选取2025年4月至2025年8月在湘南学院附属医院康复医学科门诊就诊的16例PMOP患者,随机分为对照组与运动组(各8例)。对照组给予碳酸钙D₃补充及健康宣教;运动组在对照组基础上进行中等强度抗阻运动干预,每周3次,每次60 min,持续3个月。采用ELISA检测干预前后血清I型前胶原羧基端原肽(PICP)、I型胶原交联C端肽(CTX)含量。分离干预结束后采集的血液中的PBMCs进行转录组测序;采用edgeR对mRNA、lncRNA和miRNA进行差异表达分析;使用STRING数据库构建PPI网络并筛选枢纽基因;对基因集进行GO和KEGG富集分析;整合差异表达分析、数据库靶向预测与共表达分析,构建ceRNA网络;采用单样本基因集富集分析(ssGSEA)进行免疫浸润分析;RT-qPCR验证关键基因表达水平。**结果** 干预前,两组患者血清PICP和CTX含量比较,差异均无统计学意义($P>0.05$)。与干预前比较,干预后运动组血清PICP水平升高($P<0.01$)。与对照组比较,运动组干预后血清PICP含量升高($P<0.05$)。与对照组比较,运动组干预前后血清PICP含量的差值升高($P<0.05$),干预前后血清CTX的差值降低($P<0.05$)。差异表达分析共识别出529个mRNA,500个lncRNA,68个miRNA;PPI网络识别出10个枢纽基因;GO和KEGG富集分析显示,差异基因主要涉及吞噬作用/吞噬体、髓系白细胞激活、白细胞介素-6调控、C型凝集素受体信号通路、Toll样受体(TLR)信号通路等先天免疫与炎症信号,并与过氧化物酶体增殖物激活受体、促分裂原激活蛋白激酶、腺苷酸活化蛋白激酶及甲状旁腺激素等相关通路相关。ceRNA网络包括2个lncRNA,5个miRNA和7个mRNA,其中lncRNA核富集丰度转录本1(NEAT1)与母源表达基因3(MEG3)为ceRNA网络关键节点,mRNA富集于机械刺激/肌肉牵张反应、破骨细胞分化的调控、脂多糖介导信号、TLR与钙信号及钙再吸收相关通路。免疫浸润分析显示,运动组中性粒细胞、巨噬细胞、树突状细胞及髓源性抑制性细胞等免疫细胞的浸润评分降低($P<0.05$),且ceRNA网络mRNA与多类先天免疫细胞浸润呈正相关($P<0.05$)。TLR4与AP-1转录因子亚单位(FOS)作为PPI网络与ceRNA网络的共同关键基因,经RT-qPCR验证在运动组表达下调($P<0.05$)。**结论** 3个月中等强度抗阻运动可促进PMOP患者骨代谢良性趋势改变,其机制可能与先天免疫功能状态重塑、炎症信号抑制及钙/内分泌相关通路调控有关。NEAT1与MEG3介导的ceRNA网络可能通过调控miRNA影响TLR4、FOS等关键基因表达,从而参与运动介导的免疫炎症改变与骨代谢调控。

[关键词] 绝经后骨质疏松症;抗阻运动;外周血单核细胞;转录组学;ceRNA;lncRNA;miRNA;免疫浸润

[中图分类号] R271

[文献标志码] B

[文章编号] doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2026.05.013

Mechanism of action of resistance exercise in improving bone metabolism in postmenopausal osteoporosis based on PBMCs transcriptomics

TANG Xian¹, ZHOU Dandan¹, YIN Linyu², SHE Yan¹, LIU Songtao^{1,2*}, AI Kun^{1*}

[收稿日期] 2026-02-11

[基金项目] 湖南省自然科学基金项目(2024JJ7533);湖南中医药大学校级科研项目(2024XJZC003);湖南中医药大学研究生科研创新项目(2024CX001)。

[通信作者] *艾 坤,男,硕士,教授,博士研究生导师,E-mail:aikun650@qq.com;刘松涛,男,硕士,主任医师,E-mail:3370378@qq.com。

1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. Affiliated Hospital of Xiangnan University, Chenzhou, Hunan 423000, China

[Abstract] **Objective** To explore the potential mechanism of action of 3-month moderate-intensity resistance exercise in improving bone metabolism in patients with postmenopausal osteoporosis (PMOP) based on peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) transcriptomic analysis. **Methods** Sixteen PMOP patients who visited the outpatient clinic of the Department of Rehabilitation Medicine, Affiliated Hospital of Xiangnan University from April 2025 to August 2025 were enrolled and randomly divided into control group and exercise group, with 8 patients in each group. The control group received calcium carbonate D3 supplementation and health education, while the exercise group received moderate-intensity resistance exercise intervention on the basis of the control group, 3 times per week, 60 min per session, for 3 months. Serum levels of type I procollagen carboxy-terminal propeptide (PICP) and C-terminal telopeptide of type I collagen (CTX) were measured using ELISA before and after the intervention. PBMCs were isolated from post-intervention blood for transcriptome sequencing. Differential expression analysis of mRNAs, lncRNAs, and miRNAs was performed using edgeR. The STRING database was used to construct a protein-protein interaction (PPI) network and screen hub genes. Gene Ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) enrichment analyses were performed on gene sets. A competing endogenous RNA (ceRNA) network was constructed by integrating differential expression analysis, database-based target prediction, and co-expression analysis. Immune infiltration analysis was performed using single-sample gene set enrichment analysis (ssGSEA). Key gene expression levels were validated using reverse transcription quantitative real-time PCR (RT-qPCR). **Results** Before the intervention, there were no statistically significant differences in serum PICP and CTX levels between the two groups ($P>0.05$). Compared with before intervention, serum PICP levels in the exercise group increased after intervention ($P<0.01$). Compared with the control group, serum PICP levels in the exercise group were higher after intervention ($P<0.05$). Compared with the control group, the exercise group showed a greater increase in the difference in serum PICP levels before and after intervention ($P<0.05$), and a greater decrease in the difference in serum CTX levels ($P<0.05$). Differential expression analysis identified 529 mRNAs, 500 lncRNAs, and 68 miRNAs. The PPI network identified 10 hub genes. GO and KEGG enrichment analyses showed that the differentially expressed genes were mainly involved in innate immune and inflammatory signaling, including phagocytosis/phagosome, myeloid leukocyte activation, interleukin-6 (IL-6) regulation, C-type lectin receptor (CLR) signaling pathway, and Toll-like receptor (TLR) signaling pathway, and were also associated with pathways related to peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR), mitogen-activated protein kinase (MAPK), AMP-activated protein kinase (AMPK), and parathyroid hormone (PTH). The ceRNA network included 2 lncRNAs, 5 miRNAs, and 7 mRNAs. Among them, lncRNA nuclear-enriched abundant transcript 1 (NEAT1) and maternally expressed gene 3 (MEG3) were key nodes in the ceRNA network. The mRNAs in this network were enriched in pathways related to mechanical stimulation/muscle stretch response, regulation of osteoclast differentiation, lipopolysaccharide-mediated signaling, TLR and calcium signaling, and calcium reabsorption. Immune infiltration analysis showed that infiltration scores of neutrophils, macrophages, dendritic cells, and myeloid-derived suppressor cells were decreased in the exercise group ($P<0.05$), and the mRNAs in the ceRNA network were positively correlated with the infiltration of multiple innate immune cells ($P<0.05$). TLR4 and AP-1 transcription factor subunit (FOS), as common key genes in both the PPI and ceRNA networks, were downregulated in the exercise group as verified by RT-qPCR ($P<0.05$). **Conclusion** Three months of moderate-intensity resistance exercise can promote a favorable shift in bone metabolism in PMOP patients, and the underlying mechanisms may be associated with the remodeling of innate immune functional status, inhibition of inflammatory signaling, and regulation of calcium/endocrine-related pathways. The NEAT1- and MEG3-mediated ceRNA network may modulate the expression of key genes such as TLR4 and FOS through miRNA regulation, thereby participating in exercise-mediated immunoinflammatory changes and bone metabolism regulation.

[Keywords] postmenopausal osteoporosis; resistance exercise; peripheral blood mononuclear cell; transcriptomics; competing endogenous RNA; lncRNA; miRNA; immune infiltration

绝经后骨质疏松症(postmenopausal osteoporosis, PMOP)是由雌激素水平急剧下降引起的全身性骨代谢疾病,表现为骨量减少、骨微结构破坏及骨脆性增加^[1]。中国 PMOP 患病率为 32.1%,患者骨折风险显著增加,不仅严重影响患者生活质量,还给患者带来巨大的医疗负担^[2-3]。运动疗法作为一种非药物干预手段,已被证明可以有效防治骨质疏松症(osteoporosis, OP)^[4]。研究表明,包括抗阻运动、有氧运动及身心运动在内的多种运动形式均能改善骨密度和骨代谢,其中抗阻运动是最有效的一种方式^[4]。既往研究表明,运动可以通过调控成骨细胞(osteoblast, OB)和破骨细胞(osteoclast, OC)的活性以及经典骨代谢通路改善 OP^[5-6]。近年来,研究发现,运动介导的免疫调节也是改善 OP 的重要机制之一^[7]。外周血单核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs)是免疫系统功能的重要执行者,由单核细胞和淋巴细胞组成^[8]。研究表明,运动可通过调节 PBMCs 及其细胞因子的释放重塑免疫功能,优化骨微环境,从而改善骨代谢^[9]。然而,运动通过调节 PBMCs 改善 OP 的作用机制尚未完全阐明。转录组学为解析运动干预 PMOP 的作用机制提供了新的工具^[10]。通过链特异性建库和 small RNA 建库,可同时检测 mRNA 以及非编码 RNA(如 miRNA、lncRNA)的表达水平,从而构建完整的转录调控网络^[11]。研究表明,非编码 RNA 可通过竞争性内源 RNA(competing endogenous RNA, ceRNA)参与骨代谢及炎症调控^[12]。基于此,本研究以 PMOP 患者为研究对象,实行 3 个月的抗阻运动干预,结合骨代谢指标、PBMCs 转录组测序、ceRNA 网络构建及 RT-qPCR 验证,探讨抗阻运动改善 PMOP 的潜在作用机制,为运动干预研究提供依据。

1 资料

1.1 一般资料

选取 2025 年 4 月至 2025 年 8 月在湘南学院附属医院康复医学科门诊就诊的 PMOP 患者 16 例作为研究对象。采用 SPSS 25.0 软件生成随机数字序列,并按 1:1 的比例将受试者随机分为对照组和运动组,每组 8 例。分组结果由非研究人员保存,并采用密封信封法实施分配隐藏。由于本研究为运动干预研究,受试者及康复治疗师无法实施盲法。试验过程中无脱落或剔除病例,所有受试者均完成干预、检测及样本采集。两组患者年龄、距最后一次月经的时

间、骨密度、T 值的差异均无统计学意义($P>0.05$),两组患者均无规律运动、吸烟及饮酒史,具有可比性,详见表 1。本项目已通过湘南学院附属医院技术科研伦理委员会审查(批件号:K2025-003-01)。

表 1 两组患者一般资料比较

Table 1 Comparison of general data between the two groups of patients

组别	n	年龄/ ($\bar{x}\pm s$, 岁)	距最后一次月经 的时间/($\bar{x}\pm s$, 年)	骨密度/ ($\bar{x}\pm s$, mg/cm ³)	T 值/ ($\bar{x}\pm s$)
对照组	8	59.50 $\pm$ 4.78	9.75 $\pm$ 3.73	61.42 $\pm$ 14.49	-4.52 $\pm$ 0.52
运动组	8	61.38 $\pm$ 4.37	11.38 $\pm$ 4.90	56.36 $\pm$ 20.38	-4.70 $\pm$ 0.73
t 值		-0.818	-0.746	0.573	0.574
P 值		0.427	0.468	0.576	0.575

1.2 诊断标准

参照《原发性骨质疏松症诊疗指南(2022)》^[13]和《中国老年骨质疏松症诊疗指南(2023)》^[14]的诊断标准,腰椎定量计算机断层扫描(quantitative computed tomography, QCT)骨密度绝对值 <80 mg/cm³ 可诊断为 OP。

1.3 纳入标准

(1)符合上述 OP 诊断标准者;(2)年龄为 50~70 岁的绝经后妇女;(3)距离最后一次月经 ≥ 12 个月者;(4)自愿参加研究并签署知情同意书者。

1.4 排除标准

(1)患有重要器官功能障碍、神经系统疾病或风湿免疫性疾病者;(2)患有糖尿病的患者;(3)患有恶性肿瘤、感染性疾病等严重疾病者;(4)近期使用影响骨代谢药物者;(5)伴随其他代谢性疾病或遗传性骨病者;(6)继发性 OP 者;(7)存在上下肢关节损伤者;(8)近 12 个月内发生骨折或存在局部背痛者;(9)存在剧烈体育活动禁忌证者;(10)无法参加有监督的训练计划者。

1.5 脱落标准

(1)未能按研究方案完成运动训练计划者;(2)研究过程中主动要求退出者;(3)未能按试验要求完成样本采集者。

1.6 剔除标准

(1)研究数据缺失严重或不完整者;(2)试验期间接受非研究方案规定的抗 OP 治疗者;(3)运动干预过程中违背训练方案或依从性较差者。

1.7 中止标准

(1)运动过程中发生严重不良事件或存在明显安全风险者;(2)不能耐受运动计划中的强度或负荷,且调整后仍无法继续完成干预者。

2 方法

2.1 干预方法

2.1.1 对照组 患者口服碳酸钙 D₃ 片,每次 1 片,每日 2 次,持续 3 个月。同时进行 OP 健康宣教,包括饮食调整、生活习惯、预防跌倒和心理支持等。

2.1.2 运动组 患者在对照组的基础上进行中等强度抗阻运动干预,每周 3 次,每次 60 min,持续 3 个月。具体训练计划如下:(1)热身运动,包括手腕及脚踝的活动、肩部环绕、胸部和肩部扩展、髋部环绕、弓步、高抬腿,持续 5 min;(2)下肢抗阻运动,包括阻力单车,选择改良感知用力等级量表(rate of perceived exertion, RPE)评分为 5~6 分的强度(中等偏强强度)^[15],25 min/次;深蹲和站立提踵,每次训练 2 组,每组 8~15 个;(3)上肢抗阻运动,包括肱三头肌伸展、肱二头肌弯举、双臂侧举、双臂前举,各动作采用 Brzycki 公式估算最大单次重量(one repetition maximum, 1RM)^[16],训练强度设定为估算 1RM 的 60%~80%,每次训练 2 组,每组 10 个;(4)核心训练,臀桥,每次训练 2 组,每组 10~15 个;(5)放松训练,包括上肢、下肢和核心肌群的静态拉伸,持续 5 min。

2.2 主要试剂与仪器

淋巴细胞分离液(货号:07801,加拿大 STEM-CELL 公司);红细胞裂解液(货号:HY-K3010,美国 MCE 公司);人 I 型前胶原羧基端原肽(procollagen type I C-terminal propeptide, PICP)ELISA 检测试剂盒、人 I 型胶原交联羧基端肽(C-terminal telopeptide of type I collagen, CTX)ELISA 检测试剂盒(货号分别为:JL19025、JL49228,上海江莱生物科技有限公司);TRIzol、核糖体 RNA 去除试剂盒、通用 RNA 测序文库构建试剂盒、small RNA 文库构建试剂盒、DNA 纯化磁珠、RNA 纯化磁珠、逆转录试剂盒、荧光定量 PCR 试剂盒(货号分别为:R411、RN416、RN616、NR811、N411、N412、R333、Q412,南京诺唯赞生物科技股份有限公司)。

高通量测序平台(型号:NovaSeq Xplus,美国 Illumina 公司);循环变温加热 PCR 仪(型号:C1000 Touch,美国 BIO-RAD 公司);超微分光光度计、荧光定量 PCR 仪、高速冷冻离心机、台式高速冷冻离心机(型号分别为:Nanodrop One、QuantStudio 7 Flex、Fresco 17、Sorvall ST 16R,美国 Thermo Fisher 公司)。

2.3 临床药物和设备

碳酸钙 D₃ 片(批号:7M2D,惠氏制药有限公司,国药准字 H10750029,规格:每片含钙 600 mg、维生素 D₃125 IU);阻力单车(型号:JTB616a,浙江金拓机电有限公司)。

2.4 样本采集

2.4.1 PBMCs 分离 在最后一次运动干预后 24 h,使用 EDTA 抗凝采血管采集 10 mL 外周静脉血,用 PBS 缓冲液按 1:1 比例稀释,使用淋巴细胞分离液通过密度梯度离心法分离 PBMCs。离心结束后,小心吸取 PBMCs 层(即白膜层)并转移至离心管中,加入 PBS 缓冲液进行洗涤,离心获取细胞沉淀。加入红细胞裂解液裂解残余红细胞,离心后去除上清。再次加入 PBS 缓冲液进行洗涤,离心后去除上清,用 1 mL TRIzol 重悬沉淀细胞,放入-80℃冰箱保存。

2.4.2 血清分离 在运动干预前和最后一次运动干预后 24 h,使用红色采血管采集 5 mL 外周静脉血,室温静置 1 h 进行凝固分层,3 000 r/min 室温离心 10 min(离心半径:16.8 cm),取上清转至干净的离心管中,12 000 r/min 4℃离心 10 min(离心半径:8.5 cm),取上清分装到 1.5 mL 离心管中,每管 0.2 mL,放入-80℃冰箱保存。

2.5 检测指标

骨代谢生物标志物检测:采用 ELISA 检测干预前后 PICP/CTX 含量,操作步骤按试剂盒说明书进行。

2.6 转录组测序与数据分析

2.6.1 RNA 提取、文库构建与测序 使用 TRIzol 从 PBMCs 提取总 RNA,并进行 RNA 质量检测。质检合格的样本用于构建文库。总 RNA 经核糖体 RNA 去除后,采用通用型 RNA 测序文库构建试剂盒构建链特异性文库;采用 small RNA 文库构建试剂盒构建 small RNA 文库。文库经纯化、片段筛选及质量检测合格后,在 Illumina NovaSeq Xplus 平台进行测序,测序模式为 PE150。

2.6.2 质控、比对与定量 FastQC 软件对链特异性建库原始测序数据进行质量控制,fastp 软件去除接头序列与低质量 reads,获得干净读段,使用 STAR 软件映射到参考基因组(GRCh38, GENCODE v49),通过 featureCounts 软件进行基因表达定量。small RNA 建库测序数据使用 bowtie 软件与参考基因组作进行比对,采用 miRDeep2 软件对 miRNA 进行表达定量。

2.6.3 差异表达分析 使用 edgeR 进行运动组与对

照组 mRNA、lncRNA 与 miRNA 差异表达分析。差异基因筛选阈值为 $P < 0.05$ 且 $|\log_2FC| > 0.5$ 。

2.6.4 数据库靶向预测 通过 ENCORI 数据库 (<https://rnasysu.com/encori/>) 预测差异表达 lncRNA 靶向的 miRNA^[17]。采用 multiMiR 包结合 TargetScan、miRDB 和 miRTarBase 数据库预测差异表达 miRNA 的靶基因^[18]。

2.6.5 PPI 网络构建与枢纽基因筛选 使用 STRING 数据库 (<https://cn.string-db.org/>) 构建交集基因的 PPI 网络,蛋白质对综合得分的阈值为 0.4。使用 Cytoscape 软件的 cytoHubba 算法对 PPI 网络节点进行拓扑评分,筛选枢纽基因,用于提示潜在关键调控分子。

2.6.6 功能富集分析 对差异基因及 ceRNA 网络中的关键 mRNA 进行 GO 富集分析与 KEGG 富集分析,GO 富集分析分别从生物过程(biological process, BP)、细胞组分(cellular component, CC)与分子功能(molecular function, MF)3 个层面解释基因集的功能特征,KEGG 富集分析评估显著富集的信号通路与生物学过程。富集结果按显著性与富集强度排序并进行可视化,以 $P < 0.05$ 视为显著富集。

2.6.7 共表达分析 为预测潜在的 lncRNA-miRNA 与 miRNA-mRNA 调控关系,对差异表达 lncRNA、miRNA、mRNA 进行共表达相关分析。计算配对分子之间的 Spearman 相关系数(ρ),并以显著负相关($\rho < -0.5$ 且 $P < 0.05$)作为潜在调控关系。对 $\rho < -0.8$ 的负相关进行可视化,采用桑基图展示 lncRNA-miRNA 及 miRNA-mRNA 的潜在调控关系与表达方向。

2.6.8 ceRNA 网络构建 整合差异表达分析、数据库靶向预测与共表达分析结果,以识别出被 lncRNA 和 mRNA 调控的 miRNA,筛选的 miRNA 表达变化趋势与对应的 lncRNA/mRNA 相反(负相关)。通过 Cytoscape 可视化,构建了 lncRNA-miRNA-mRNA 网络。

2.6.9 免疫浸润分析 使用单样本基因集富集分析(single-sample gene set variation analysis, ssGSEA)进行免疫浸润分析^[19],基于预设免疫细胞基因集计算每个样本的免疫细胞浸润得分^[20]。比较运动组与对照组免疫细胞浸润评分差异;进一步计算免疫细胞之间浸润得分的相关性,评估免疫细胞协同变化趋势。同时分析 ceRNA 网络 mRNA 与免疫细胞浸润的相关性,以探讨关键基因与免疫微环境改变的潜在联系。

2.7 RT-qPCR 验证

通过逆转录试剂盒将 RNA 逆转录为 cDNA,反

应条件为:50 °C 逆转录 15 min,85 °C 灭活 5 s。qPCR 法检测目的基因表达水平,扩增条件为 95 °C 预变性 30 s,95 °C 变性 10 s,65 °C 退火 30 s,共 40 个循环。以 GAPDH 为内参进行标准化,使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算 Toll 样受体 4(Toll-like receptor 4, TLR4)和 AP-1 转录因子亚单位(AP-1 transcription factor subunit, FOS)的相对表达水平。比较对照组与运动组 TLR4 和 FOS 的表达差异,以验证测序结果的可靠性与方向一致性。基因引物由生工生物工程有限公司(中国上海)合成,引物序列见表 2。

表 2 引物序列

Table 2 Primer sequences

基因	引物序列(5'-3')	长度/bp
TLR4	正向:GCCTTCTCAGCAGGAACACT	152
	反向:TGTTGCTTCTCTGCCAATTGC	
FOS	正向:CAGACTACGAGGCGTCATCC	82
	反向:TCTGCGGGTGAGTGCTAGTA	
GAPDH	正向:ACCACAGTCCATGCCATCAC	155
	反向:TTCCCGTTTCAGCTCAGGGAT	

2.8 统计学分析

采用 SPSS 25.0 进行统计学分析。计量资料先进行正态性检验,符合正态分布,以“ $\bar{x} \pm s$ ”表示,两组间比较采用独立样本 t 检验,两组内比较应计算干预前后的差值,差值符合正态分布,采用配对 t 检验。以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 干预前后患者血清 PICP 和 CTX 含量比较

干预前,两组患者血清 PICP 和 CTX 含量比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。与干预前比较,干预后对照组血清 PICP 和 CTX 含量差异无统计学意义($P > 0.05$);运动组血清 PICP 升高($P < 0.01$),血清 CTX 含量差异无统计学意义($P > 0.05$)。干预后,与对照组比较,运动组血清 PICP 含量升高($P < 0.05$),血清 CTX 含量差异无统计学意义($P > 0.05$)。与对照组比较,运动组干预前后血清 PICP 含量的差值升高($P < 0.05$),干预前后血清 CTX 的差值降低($P < 0.05$)。详见表 3。

3.2 两组患者 mRNA、lncRNA 和 miRNA 的差异表达分析

差异表达分析共识别出 529 个差异表达的 mRNA(192 个上调,337 个下调)、500 个差异表达的 lncRNA(184 个上调和 316 个下调)和 68 个差异表达的 miRNA(49 个上调和 19 个下调),详见图 1。差异表达的 miRNA 包含 61 个 miRNA 成熟体(46 个

上调和 15 个下调)和 7 个前体 miRNA(3 个上调和 4 个下调),后续均使用 miRNA 成熟体进行分析。

3.3 差异表达 lncRNA 靶向 miRNA 预测、差异表达 miRNA 靶基因预测及富集分析

差异上调 lncRNA 共预测 76 个靶向 miRNA,差异下调 lncRNA 共预测 522 个靶向 miRNA。根据 lncRNA 和 miRNA 之间的海绵作用,差异上调 lncRNA 预测的靶向 miRNA 与差异下调 miRNA 取交集,获得 0 个共同 miRNA;差异下调 lncRNA 的靶向 miRNA 与差异上调的 miRNA 取交集,获得 34 个共同 miRNA(见图 2A)。差异上调 miRNA 共预测 6 467 个靶基因,差异下调 miRNA 共预测 1 611 个靶基

因。根据 miRNA 对 mRNA 的抑制作用,差异上调 miRNA 预测的靶基因与差异下调 mRNA 取交集,获得 132 个共同基因;差异下调 miRNA 预测靶基因与差异上调 mRNA 取交集,获得 11 个共同基因(见图 2B)。对交集基因进行 PPI 分析(见图 2C),并使用 cytoHubba 筛选枢纽基因,共识别出 10 个枢纽基因(见图 2D)。GO 分析结果显示,BP 主要富集在吞噬作用、髓系白细胞活化、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)调控等;CC 主要富集在内吞囊泡、内质网腔、含胶原蛋白的细胞外基质等;MF 主要富集在模式识别受体活性、清道夫受体活性、货物受体活性等(见图 2E)。KEGG 通路分析主要富集在吞噬体、C

表 3 两组患者干预前后血清 PICP 和 CTX 含量比较($\bar{x}\pm s$, ng/mL)

Table 3 Comparison of serum PICP and CTX levels between the two groups of patients before and after intervention ($\bar{x}\pm s$, ng/mL)

组别	n	PICP			CTX		
		干预前	干预后	差值	干预前	干预后	差值
对照组	8	491.39±250.03	473.01±184.88	-18.38±150.05	1.58±0.37	1.67±0.25	0.09±0.22
运动组	8	509.40±180.14	709.83±192.42** [#]	200.43±141.19 [#]	1.62±0.26	1.40±0.34	-0.22±0.32 [#]

注:与干预前比较,** $P<0.01$;与对照组比较,[#] $P<0.05$ 。

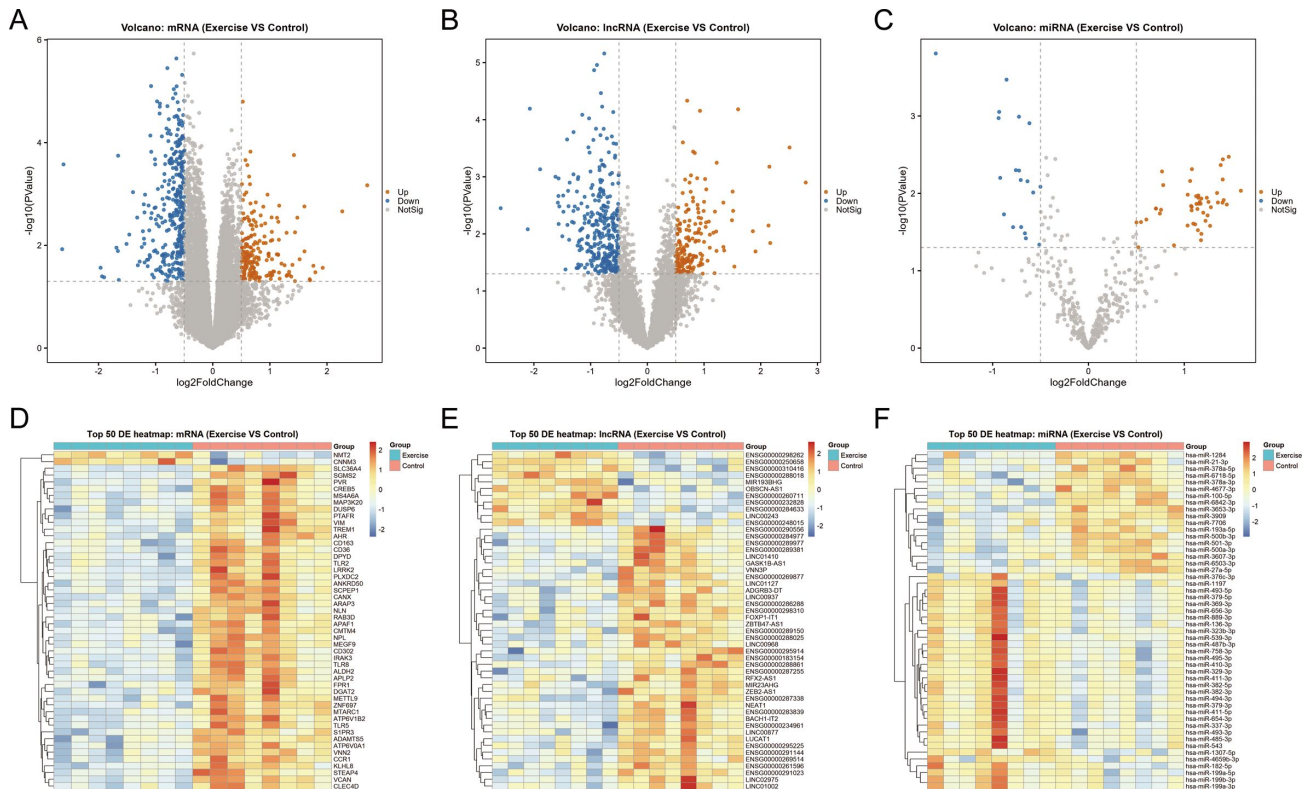


图 1 mRNA、lncRNA 和 miRNA 的差异表达分析

Fig.1 Differential expression analysis of mRNA, lncRNA, and miRNA

注:A.差异表达 mRNA 的火山图;B.差异表达 lncRNA 的火山图;C.差异表达 miRNA 的火山图;D.差异表达 mRNA 的热图;E.差异表达 lncRNA 的热图;F.差异表达 miRNA 的热图。火山图中上调的基因以红色表示,下调基因以蓝色表示。热图提取了差异表达前 50 的 mRNA、lncRNA 和 miRNA 进行绘制,上调的基因以红色表示,下调基因以蓝色表示。

型凝集素受体(C-type lectin receptor, CLR)信号通路、TLR 信号通路、细胞黏附分子相互作用与细胞外基质受体相互作用、过氧化物酶体增殖物激活受体(peroxisome proliferator-activated receptor, PPAR)信号通路、脂肪细胞因子通路、促分裂原激活蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)信号通路、腺苷酸活化蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)信号通路以及甲状旁腺激素(parathyroid hormone, PTH)合成、分泌与作用等(见图 2F)。

3.4 差异表达的 lncRNA 和 miRNA、miRNA 和 mRNA 共表达分析

为进一步预测 lncRNA-miRNA 和 miRNA-mRNA 调控关系,进行了差异表达 lncRNA、miRNA 和 mRNA 的共表达分析。计算 lncRNA-miRNA 和 miRNA-mRNA 的 ρ 值,其中负相关对($\rho < -0.5, P < 0.05$)被视为潜在的调控相互作用,用于构建 ceRNA 网络。共识别出 2 678 对 lncRNA-miRNA 和 4 139

对 miRNA-mRNA。对 $\rho < -0.8$ 的 lncRNA-miRNA 和 miRNA-mRNA 的负相关对进行可视化,构建桑基图。详见图 3A 和 B。

3.5 ceRNA 网络构建及富集分析

整合差异表达分析、数据库靶向预测和共表达分析构建 ceRNA 网络,其中包括 2 个 lncRNA、5 个 miRNA 和 7 个 mRNA, lncRNA 核富集丰度转录本 1(nuclear enriched abundant transcript 1, NEAT1)与母源表达基因 3(maternally expressed gene 3, MEG3)为 ceRNA 网络关键节点(见图 4A)。基于参与 ceRNA 调控网络的 mRNA,进行 GO 和 KEGG 富集分析。GO 分析结果显示,BP 主要富集在对含嘌呤化合物的反应、对肌肉拉伸的反应、对机械刺激的反应、对酮的反应、肌肉细胞增殖、脂多糖介导信号通路等(见图 4B);CC 主要富集在肌球蛋白复合体、波纹、丝状伪足膜和细胞前缘等(见图 4C);MF 主要富集在脂多糖结合、模式识别受体活性和钙调蛋白结

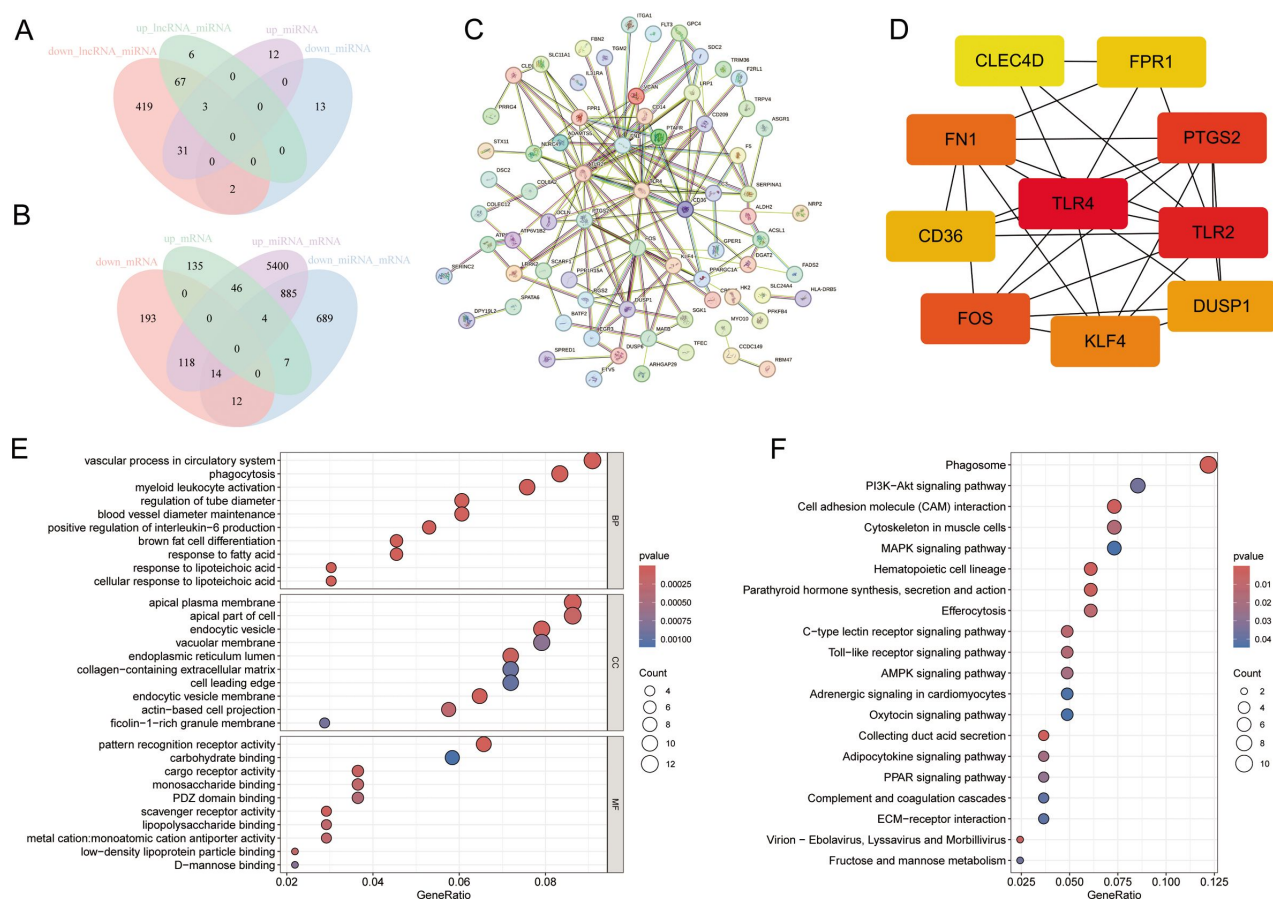


图 2 差异表达 lncRNA 靶向 miRNA 预测、差异表达 miRNA 靶基因预测及富集分析

Fig.2 Prediction of differentially expressed lncRNA-targeted miRNA, prediction of differentially expressed miRNA-targeted genes, and enrichment analysis

注:A.差异表达 lncRNA 预测的靶向 miRNA 与差异表达 miRNA 交集的韦恩图;B.差异表达 miRNA 预测的靶基因与差异表达 miRNA 交集基因的韦恩图;C.交集基因的 PPI 分析;D.枢纽基因的筛选;E.GO 富集分析结果;F.KEGG 富集分析结果。

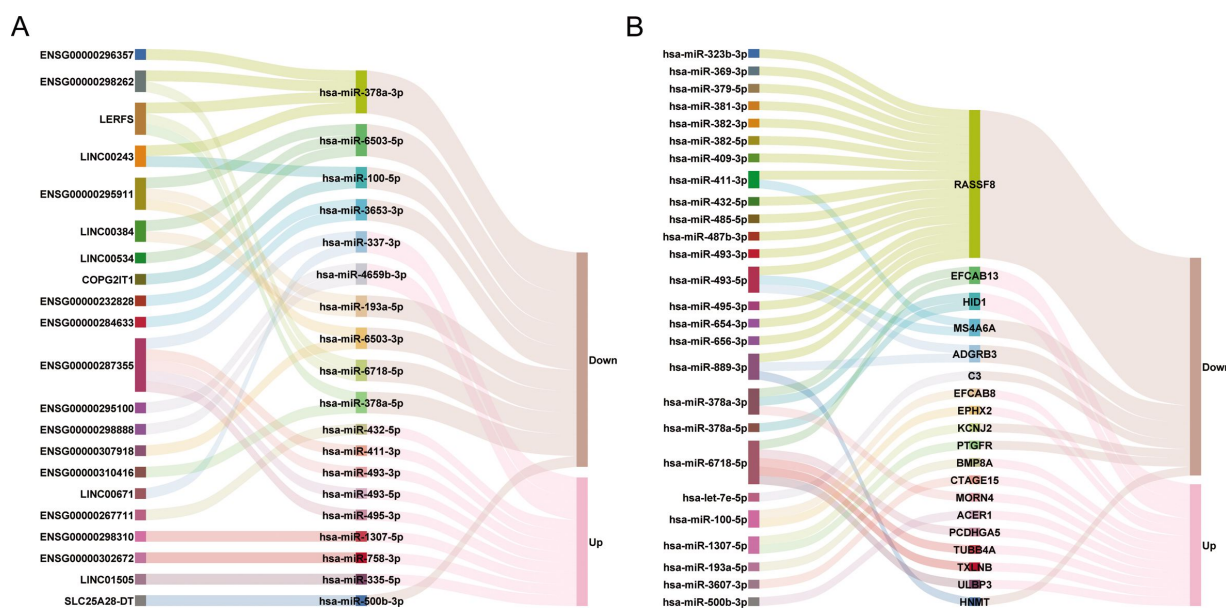


图3 差异表达的 lncRNA 和 miRNA、miRNA 和 mRNA 共表达分析

Fig.3 Co-expression analysis of differentially expressed lncRNA and miRNA, as well as miRNA and mRNA

注:A.差异表达的 lncRNA 和 miRNA 共表达分析的桑基图,左侧节点代表 lncRNA,中间节点代表 miRNA,右边节点代表 miRNA 表达情况(Up 代表上调,Down 表示下调);B.差异表达的 miRNA 和 mRNA 共表达分析的桑基图,左侧节点代表 miRNA,中间节点代表 mRNA,右边节点代表 mRNA 表达情况(Up 代表上调,Down 表示下调)。

合等(见图 4D)。KEGG 主要富集在 TLR 信号通路、钙信号通路和内分泌及其他因子调控的钙再吸收

等通路(见图 4E)。TLR4 和 FOS 富集于 OC 分化的调控,提示其调控骨代谢的潜在作用。

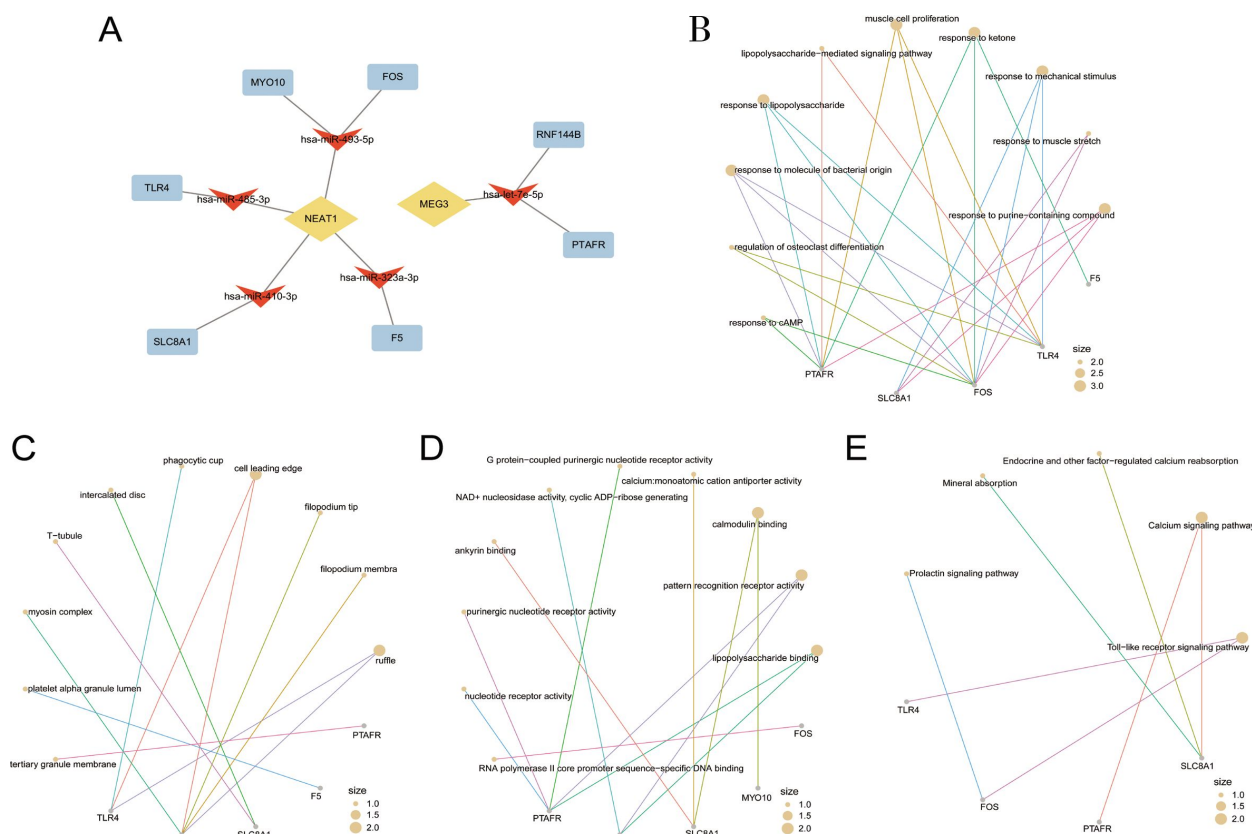


图4 ceRNA 网络构建及富集分析

Fig.4 Construction of ceRNA network and enrichment analysis

注:A.整合差异表达分析、数据库靶向预测与共表达分析构建的 ceRNA 网络,黄色菱形节点代表 lncRNA,红色 V 形节点代表 miRNA,蓝色圆角矩形节点代表 mRNA;B.BP 富集分析结果;C.CC 富集分析结果;D.MF 富集分析结果;E.KEGG 富集分析结果。

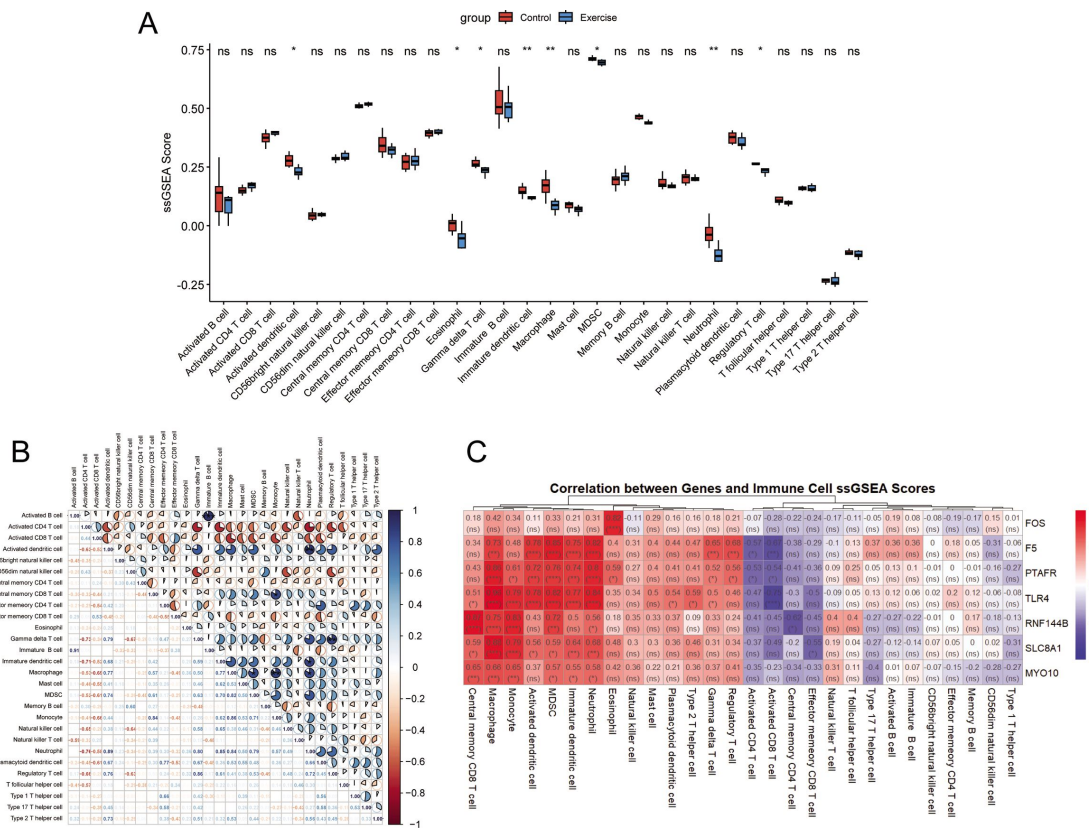


图5 ssGSEA 免疫浸润分析

Fig.5 ssGSEA immune infiltration analysis

注:A.对照组与运动组免疫浸润评分的箱线图;B.免疫细胞浸润得分的相关性热图;C.ceRNA 网络 mRNA 与免疫细胞浸润的相关性热图。

3.6 免疫浸润分析

基于 ssGSEA 计算的免疫浸润得分显示,对照组与运动组的免疫微环境存在显著差异。与对照组相比,运动组中性粒细胞、巨噬细胞、未成熟树突状细胞、活化树突状细胞、 $\gamma\delta$ T 细胞、髓源性抑制性细胞、嗜酸性粒细胞、调节性 T 细胞的浸润评分均降低($P<0.05$),其中中性粒细胞、巨噬细胞下降最为明显($P<0.01$)(见图 5A)。免疫细胞相关性分析显示,巨噬细胞与中性粒细胞、单核细胞和髓源性抑制性细胞浸润评分呈正相关($P<0.05$)(见图 5B)。此外,ceRNA 网络 mRNA 与免疫细胞浸润的相关性分析结果表明,多数基因与巨噬细胞、中性粒细胞、单核细胞、未成熟树突状细胞及活化树突状细胞呈正相关($P<0.05$)(见图 5C)。

3.7 运动组和对照组 PBMCs 中 TLR4 和 FOS mRNA 表达比较

TLR4 和 FOS 为 PPI 网络枢纽基因和 ceRNA 网络的共有基因,且调控 OC 的分化。对这两个基因进行 RT-qPCR,以验证对照组和运动组的转录组学测序结果。结果显示,与对照组比较,运动组 TLR4 和 FOS mRNA 相对表达水平均降低($P<0.05$),趋势基本与转录组学测序结果一致。详见图 6。

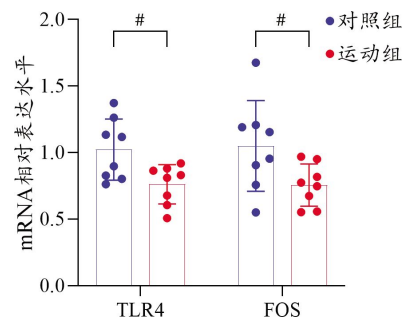


图6 对照组和运动组 PBMCs 中 TLR4 和 FOS mRNA 表达比较

Fig.6 Comparison of TLR4 and FOS mRNA expression in PBMCs between the control and exercise groups

注:与对照组比较,* $P<0.05$ 。

4 讨论

抗阻运动是 PMOP 患者重要防治手段。既往研究表明,抗阻运动可有效维持绝经后女性的股骨颈和腰椎骨密度^[21-22]。预防 OP 和脆性骨折的运动处方建议为女性应每周累积 ≥ 150 min 的中等至高强度体育活动^[23]。另一项研究显示,与低强度和高强度抗阻运动相比,中等强度抗阻运动在改善骨密度方面更具优势,且依从性较好^[24]。一项短期运动训练研究显示,3 个月的抗阻运动明显改善了绝经后女性

骨代谢标志物水平^[25]。综上所述,本研究对 PMOP 患者实施为期 3 个月的中等强度抗阻运动训练。研究表明,该方案显著提高骨形成标志物水平,并在一定程度上降低骨吸收标志物水平,提示中等强度抗阻运动可促进 PMOP 患者骨代谢良性趋势改变。

本研究在抗阻运动干预后共识别出 529 个差异表达 mRNA、500 个差异表达 lncRNA 和 68 个差异表达 miRNA,提示抗阻运动可引起 PMOP 患者中 PBMCs 转录谱改变。差异表达 miRNA 靶基因和差异表达 mRNA 的交集基因功能富集分析显示,其主要涉及吞噬作用、髓系白细胞激活、IL-6 调控以及 CLR/TLR、PPAR、MAPK、AMPK 等信号通路,提示抗阻运动可能通过调节以单核细胞/巨噬细胞为代表的先天免疫相关功能状态,并抑制炎症信号,从而参与骨代谢调控。免疫浸润分析显示,运动组中性粒细胞、巨噬细胞、树突状细胞及髓源性抑制性细胞等浸润评分降低,且巨噬细胞与中性粒细胞、单核细胞等呈协同变化趋势,进一步支持抗阻运动干预可能与 PMOP 患者外周先天免疫状态的改变有关。此外,KEGG 分析还显示交集基因在 PTH 合成、分泌与作用显著富集,提示抗阻运动还可能涉及钙磷内分泌相关信号调节。

本研究进一步构建 ceRNA 网络,以探讨抗阻运动介导的非编码 RNA 调控机制。结果显示,NEAT1 与 MEG3 是网络中的关键 lncRNA 节点。既往研究表明,NEAT1 是机械敏感 lncRNA,可参与机械刺激介导的成骨过程,并影响骨髓间充质干细胞谱系命运及破骨分化^[26-27];MEG3 亦可能通过调控免疫相关破骨细胞分化参与 OP 发生^[28]。本研究表明,NEAT1 与 MEG3 可能通过竞争性结合 miRNA,调控 TLR4 和 FOS 等基因表达,从而调控 PMOP 的骨代谢。ceRNA 网络的 mRNA 富集分析结果显示,该网络涉及对肌肉拉伸/机械刺激反应、OC 分化的调控、脂多糖介导的信号通路、肌肉细胞增殖等关键生物过程,并可能影响 TLR 信号通路、钙信号通路及钙重吸收相关通路。这些富集分析结果进一步提示,抗阻运动诱导的肌肉拉伸和机械刺激,可能通过调控 NEAT1/MEG3 相关 ceRNA 网络,重塑 PBMCs 的免疫状态、炎症反应以及钙稳态,进而影响 OC 分化,改善骨代谢。此外,ceRNA 网络 mRNA 与多类先天免疫细胞呈正相关,进一步表明这些基因在运动介导的先天免疫相关功能状态重塑中具有重要作用。

本研究发现,TLR4 和 FOS 为 PPI 网络枢纽基因和 ceRNA 网络的共有基因,参与调控 OC 的分化,并

在运动组显著下调。TLR4 作为先天免疫模式识别受体,可通过激活核因子 κ B(nuclear factor, NF- κ B) 和 MAPK 等炎症信号通路,促进 IL-6、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)等促炎性细胞因子释放,增强 OC 分化和骨吸收^[29]。规律运动可降低老年女性外周血免疫细胞 TLR4 的表达以及炎症因子的释放^[30]。FOS 编码 AP-1 复合体的重要组分 c-Fos,而 c-Fos 是 NF- κ B 受体活化因子配体(receptor activator of nuclear factor- κ B ligand, RANKL)诱导 OC 分化的关键转录因子^[31]。抑制 c-Fos 活性和表达可有效抑制 RANKL 诱导的 OC 形成和骨吸收,从而改善 PMOP 骨代谢^[32]。

研究表明,3 个月中等强度抗阻运动可促进 PMOP 患者骨代谢向良性趋势改变,其机制可能与先天免疫相关功能重塑、炎症信号通路的抑制及钙代谢内分泌相关通路调控有关。本研究构建了 ceRNA 网络,提示 NEAT1 与 MEG3 介导的 ceRNA 网络可能通过调控 miRNA 影响 TLR4、FOS 等关键基因表达,从而参与运动介导的免疫炎症改变与骨代谢调控。此外,本研究存在一定局限性:样本量较小,研究结果的稳定性有限;基线资料不够全面,混杂因素控制不足;运动干预周期仅 3 个月,难以充分评价骨密度的长期获益;ceRNA 网络主要基于差异表达分析、数据库靶向预测与共表达分析构建,尚缺乏体内外功能验证,具体靶向调控机制仍需进一步研究。

参考文献

- [1] SUBARAJAN P, ARCEO-MENDOZA R M, CAMACHO P M. Postmenopausal osteoporosis: A review of latest guidelines [J]. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, 2024, 53(4): 497-512.
- [2] LEBOFF M S, GREENSPAN S L, INSOGNA K L, et al. The clinician's guide to prevention and treatment of osteoporosis [J]. *Osteoporosis International*, 2022, 33(10): 2049-2102.
- [3] WANG L H, YU W, YIN X J, et al. Prevalence of osteoporosis and fracture in China: The China osteoporosis prevalence study [J]. *JAMA Network Open*, 2021, 4(8): e2121106.
- [4] ZHANG S F, HUANG X X, ZHAO X Y, et al. Effect of exercise on bone mineral density among patients with osteoporosis and osteopenia: A systematic review and network meta-analysis [J]. *Journal of Clinical Nursing*, 2022, 31(15/16): 2100-2111.
- [5] FAIENZA M F, LASSANDRO G, CHIARITO M, et al. How physical activity across the lifespan can reduce the impact of bone ageing: A literature review [J]. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2020, 17(6): 1862.
- [6] HART D A. Regulation of bone by mechanical loading, sex hormones, and nerves: Integration of such regulatory complexity and

- implications for bone loss during space flight and post-menopausal osteoporosis[J]. *Biomolecules*, 2023, 13(7): 1136.
- [7] WENG K H, HE Y T, WENG X Q, et al. Exercise alleviates osteoporosis by regulating the secretion of the Senescent Associated Secretary Phenotype[J]. *Bone*, 2025, 196: 117485.
- [8] LI B, YANG C M, JIA G, et al. Comprehensive evaluation of the effects of long-term cryopreservation on peripheral blood mononuclear cells using flow cytometry[J]. *BMC Immunology*, 2022, 23(1): 30.
- [9] ZHAO Z H, DU Y X, YAN K, et al. Exercise and osteoimmunology in bone remodeling[J]. *The FASEB Journal*, 2024, 38(7): e23554.
- [10] LENG J C, WU L Y. Interaction-based transcriptome analysis via differential network inference[J]. *Briefings in Bioinformatics*, 2022, 23(6): bbac466.
- [11] MATSUI M, COREY D R. Non-coding RNAs as drug targets[J]. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2017, 16(3): 167-179.
- [12] LIU J L, YAO Y, HUANG J Y, et al. Comprehensive analysis of lncRNA-miRNA-mRNA networks during osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells[J]. *BMC Genomics*, 2022, 23(1): 425.
- [13] 中华医学会骨质疏松和骨矿盐疾病分会. 原发性骨质疏松症诊疗指南(2022)[J]. *中国全科医学*, 2023, 26(14): 1671-1691.
- [14] 《中国老年骨质疏松症诊疗指南 2023》工作组, 中国老年学和老年医学学会骨质疏松分会, 中国医疗保健国际交流促进会骨质疏松病学分会, 等. 中国老年骨质疏松症诊疗指南 (2023)[J]. *中华骨与关节外科杂志*, 2023, 16(10): 865-885.
- [15] ARANTES BERTOCHI G F, MOTA G R, HAILE L K, et al. Validity of weekly and monthly perceived exertion in Runners[J]. *International Journal of Sports Medicine*, 2023, 44(11): 763-777.
- [16] BRZYCKI M. Strength testing: Predicting a one-rep max from reps-to-fatigue[J]. *Journal of Physical Education, Recreation & Dance*, 1993, 64(1): 88-90.
- [17] 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 Research*, 2014, 42(D1): D92-D97.
- [18] RU Y B, KECHRIS K J, TABAKOFF B, et al. The multiMiR R package and database: Integration of microRNA-target interactions along with their disease and drug associations[J]. *Nucleic Acids Research*, 2014, 42(17): e133.
- [19] HÄNZELMANN S, CASTELO R, GUINNEY J. GSVA: gene set variation analysis for microarray and RNA-Seq data [J]. *BMC Bioinformatics*, 2013, 14(1): 7.
- [20] CHAROENTONG P, FINOTELLO F, ANGELOVA M, et al. Pan-cancer immunogenomic analyses reveal genotype-immunophenotype relationships and predictors of response to checkpoint blockade[J]. *Cell Reports*, 2017, 18(1): 248-262.
- [21] ZHAO R Q, ZHANG M Y, ZHANG Q. The effectiveness of combined exercise interventions for preventing postmenopausal bone loss: A systematic review and meta-analysis[J]. *Journal of Orthopaedic & Sports Physical Therapy*, 2017, 47(4): 241-251.
- [22] ZHAO R, ZHAO M, XU Z. The effects of differing resistance training modes on the preservation of bone mineral density in postmenopausal women: A meta-analysis[J]. *Osteoporosis International*, 2015, 26(5): 1605-1618.
- [23] DALY R M, DALLA VIA J, DUCKHAM R L, et al. Exercise for the prevention of osteoporosis in postmenopausal women: An evidence-based guide to the optimal prescription[J]. *Brazilian Journal of Physical Therapy*, 2019, 23(2): 170-180.
- [24] WANG Z Y, ZAN X C, LI Y J, et al. Comparative efficacy different resistance training protocols on bone mineral density in postmenopausal women: A systematic review and network meta-analysis[J]. *Frontiers in Physiology*, 2023, 14: 1105303.
- [25] PASQUALINI L, MINISTRINI S, LOMBARDINI R, et al. Effects of a 3-month weight-bearing and resistance exercise training on circulating osteogenic cells and bone formation markers in postmenopausal women with low bone mass[J]. *Osteoporosis International*, 2019, 30(4): 797-806.
- [26] ZHANG H G, XU R Y, LI B, et al. LncRNA NEAT1 controls the lineage fates of BMSCs during skeletal aging by impairing mitochondrial function and pluripotency maintenance[J]. *Cell Death & Differentiation*, 2022, 29(2): 351-365.
- [27] LIU C Z, GAO X C, LI Y H, et al. The mechanosensitive lncRNA Neat1 promotes osteoblast function through paraspeckle-dependent Smurf1 mRNA retention[J]. *Bone Research*, 2022, 10: 18.
- [28] GAO X R, GE J, ZHOU W C, et al. IL-10 inhibits osteoclast differentiation and osteolysis through MEG3/IRF8 pathway[J]. *Cellular Signalling*, 2022, 95: 110353.
- [29] ZHU X P, DU L, ZHANG L, et al. The critical role of Toll-like receptor 4 in bone remodeling of osteoporosis: From inflammation recognition to immunity[J]. *Frontiers in Immunology*, 2024, 15: 1333086.
- [30] MCFARLIN B K, FLYNN M G, CAMPBELL W W, et al. TLR4 is lower in resistance-trained older women and related to inflammatory cytokines[J]. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, 2004, 36(11): 1876-1883.
- [31] TAKAYANAGI H, KIM S, MATSUO K, et al. RANKL maintains bone homeostasis through c-Fos-dependent induction of interferon- β [J]. *Nature*, 2002, 416(6882): 744-749.
- [32] WANG Y B, YANG Q C, FU Z Y, et al. Hinokitiol inhibits RANKL-induced osteoclastogenesis in vitro and prevents ovariectomy-induced bone loss in vivo[J]. *International Immunopharmacology*, 2021, 96: 107619.

(本文编辑 田梦妍)