

骨性关节炎滑膜病变的生物信息分析

丁宁, 杨青山, 施松波, 李金龙, 刘杰
甘肃省人民医院骨科一病区, 甘肃 兰州 730000

【摘要】目的:通过生物信息分析探索骨性关节炎中滑膜组织的基因变化。**方法:**从GEO数据库中获取GSE55235和GSE12021数据,分析数据得到差异表达基因(DEGs)。再对DEGs进行功能富集分析、蛋白互作网络分析、hub基因分析等。最后分析预测与hub基因相关的转录因子和miRNA,构建互作网络。**结果:**通过分析得到249个DEGs,再对其进行功能富集分析发现炎症反应、细胞外基质和细胞外区域以及TNF信号通路有更多的基因富集。此外,从DEGs中筛选出10个hub基因,进行转录因子和miRNA分析,得到242个转录因子和212个miRNA与之相关。**结论:**对OA滑膜组织的差异基因分析,不难发现,在OA的发展过程中,滑膜组织的基因发生明显的变化,并主要涉及炎症调控、炎症反应等过程。同时预测了可能与一些关键基因相关的转录因子和miRNA,进一步揭示了分子调控网络。

【关键词】骨性关节炎;滑膜组织;差异表达基因;生物信息分析

【中图分类号】R318;R684.3

【文献标志码】A

【文章编号】1005-202X(2024)04-0512-09

Bioinformatics analysis of gene expression changes of synovial tissue in osteoarthritis

DING Ning, YANG Qingshan, SHI Songbo, LI Jinlong, LIU Jie

The First Department of Orthopedics, Gansu Provincial Hospital, Lanzhou 730000, China

Abstract: Objective To explore the gene expression changes of synovial tissue in osteoarthritis (OA) through bioinformatics analysis. **Methods** GSE55235 and GSE12021 were obtained from GEO database for data analysis and identification of differentially expressed genes (DEGs). The analyses of functional enrichment, protein-protein interaction network, and hub genes were performed on the identified DEGs. Subsequently, transcription factors (TFs) and miRNA related to hub genes were predicted for constructing an interaction network. **Results** A total of 249 DEGs were obtained through analysis, and functional enrichment analysis revealed that gene enrichment was dominant in inflammatory response, extracellular matrix, extracellular region, and TNF signaling pathway. From the DEGs, 10 hub genes were selected, and the TFs and miRNA analyses identified 242 TFs and 212 miRNAs associated with them. **Conclusion** The analysis of DEGs in OA synovial tissue highlights significant genetic changes during OA development, primarily involving processes related to inflammatory regulation and response. The predictions of TFs and miRNAs associated with key genes provide further insights into the molecular regulatory network.

Keywords: osteoarthritis; synovial tissue; differentially expressed gene; bioinformatics analysis

前言

骨性关节炎(Osteoarthritis, OA)是一种伴随着衰老和损伤的慢性退行性病变。软骨和滑膜作为关节重要的结构在OA的发展过程中不断发生病变,最终导致软骨损伤和滑膜炎[1]。学者们对OA的软骨损伤机制已经研究多年,然而对滑膜病变关注相对

较少。但滑膜炎贯穿OA发展的始末,并起着至关重要的作用。而且,滑膜中多种细胞产生大量的细胞因子及炎性介质,共同调控OA的发生发展。

已有研究发现,IL6、IL8、AP1等多个因子在OA的发展中起到了重要的作用[2]。CXCL2、CXCL8、PTGS2和JUN、MYC、VEGFA和EGR1等也是调控OA的关键节点[3-4]。转录因子(Transcriptional Factors, TFs)调节基因表达并参与细胞作用的发挥[5-6],miRNA(microRNA)是一种小非编码RNA,发挥着转录抑制的作用,并参与炎症反应[7-8]、滑膜炎[9]以及软骨损伤[10]等。miR-206能够抑制软骨细胞增殖并促进其凋亡[11],而且其能够通过SOCS3以

【收稿日期】2023-12-15

【作者简介】丁宁,硕士,主治医师, E-mail: dingninghr@yeah.net

【通信作者】刘杰,硕士,主任医师, E-mail: liujiegssy@163.com

及 Foxp3 调控 Th17 和 Treg 细胞进而影响 OA 的进展^[7]。此外, miR-10a-5p^[12]、miR-93^[13] 和 miR-363-3p^[14]也参与调节 OA 软骨细胞的凋亡。近年来,多项研究报道了 OA 过程中软骨及滑膜的基因表达变化^[2-4, 15-16],而滑膜组织差异基因、TFs 以及 miRNA 的关系少有提及。

本研究选择的 GSE12021 和 GSE55235 数据集来自于 GEO (Gene Expression Omnibus) 数据库,对多项数据分析得出 249 个差异基因 (Differential Expressed Genes, DEGs),随后通过功能富集分析、蛋白互作网络、hub 基因分析、TFs-hub 基因网络分析以及与

miRNA 作用分析的研究,揭示了 OA 滑膜病变的调节因子变化,也为今后的治疗提供了分子基础。

1 方法

1.1 基因表达数据获取

在 GEO 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) 中检索关键字“人类”、“OA 滑膜组织”、“完整数据”,经过筛选获得 GSE12021 和 GSE55235 数据集,均为 GPL96 平台。GSE55235 包含 10 个对照组和 10 个 OA 组;GSE12021 包含 9 个对照组和 10 个 OA 组。详细数据如表 1 所示。

表 1 GEO 中筛选出的数据集简明信息
Table 1 Brief information of datasets selected from GEO

数据集	测序平台	样本		组织来源
		对照组	OA 组	
GSE55235	GPL96	GSM1332201~GSM1332210	GSM1332211~GSM1332220	滑膜组织
GSE12021	GPL96	GSM302859、GSM302864、 GSM302866、GSM302870、 GSM303522、GSM303523、 GSM303525、GSM303531、 GSM303533	GSM302876、GSM302880、 GSM302930、GSM303326、 GSM303341、GSM303356、 GSM303358、GSM303360、 GSM303362、GSM303370	滑膜组织

1.2 DEGs 分析以及热图

原始数据下载后去除信息不全基因,在 R4.2.0 软件中用 RMA (Robust Multiarray Average) 算法“affy 包”进行分析。“Limma 包”和“sva 包”用于去除批间差并进行 DEGs 分析。节点值为 log2 倍数>2.0 和调整 P 值<0.05。并绘制热图。

1.3 功能富集分析

通过 DAVID (<https://david.ncifcrf.gov/>) 对 DEGs 数据进行生物学过程 (Biological Process, BP)、细胞学组分 (Cellular Component, CC)、分子功能 (Molecular Function, MF) 和京都基因与基因组百科全书 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) 分析,数据通过 R 软件绘制,并通过“enrichplot 包”和“GOplot 包”绘制 GO (Gene Ontology) 功能图,图中显示前 5 功能簇。调整 P<0.05 为差异有统计学意义。

1.4 蛋白互作网络及 hub 基因分析

采用 STRING 11.5 (<https://cn.string-db.org>) 进行蛋白互作分析 (PPI)。在 Cytoscape 3.9.1 中绘图。用“CytoHubba”包的 MCC 方法分析出前 10 个基因作为 hub 基因。MCODE 进行模块化分析,规定:Node score cut-off=0.2, K-Core=2, max.depth=100, MCODE score>4.0。

1.5 TFs-hub 基因以及 hub 基因-miRNA 互作分析

hub 基因的 TFs 和 miRNA 通过 NetworkAnalyst 3.0 进行预测,TFs 数据来源于 ENCODE 数据库,miRNA 数据来源于 miRTarBase v8.0 数据库。互作网络使用 Cytoscape 绘制。

2 结果

2.1 DEGs 分析

GSE55235 和 GSE12021 来源于 GEO 数据库,两组数据集信息如表 1 所示。通过对照组和 OA 组比较分析,得到 249 个 DEGs,其中 111 个 DEGs 上调,138 个 DEGs 下调。

2.2 功能富集分析

DEGs 数据在 DAVID 中进行 BP、CC、MF 和 KEGG 分析。各项分析排名前 10 的结果见图 1。在 BP 分析中 (图 1a), DEGs 主要涉及炎症反应、细胞因子介导的信号通路、细胞外基质、机械刺激反应以及细胞连接方面。不论从错误发现率 (False Discovery Rate, FDR) 维度还是基因数量维度,炎症反应在其中都发挥着重要作用。在 CC 分析方面 (图 1b), 细胞外区域占有优势。而对于 MF 分析 (图 1c), 细胞外结构具有最小的 FDR, 蛋白连接具有最多的基因富集数

量。KEGG 分析发现 TNF 信号通路在众多调控途径中是最具有优势的(图 1d)。通过 GO 分析(图 1e)发现基因主要分布于细胞外基质组织、细胞外结构组织、白细胞迁移调控等功能区域。

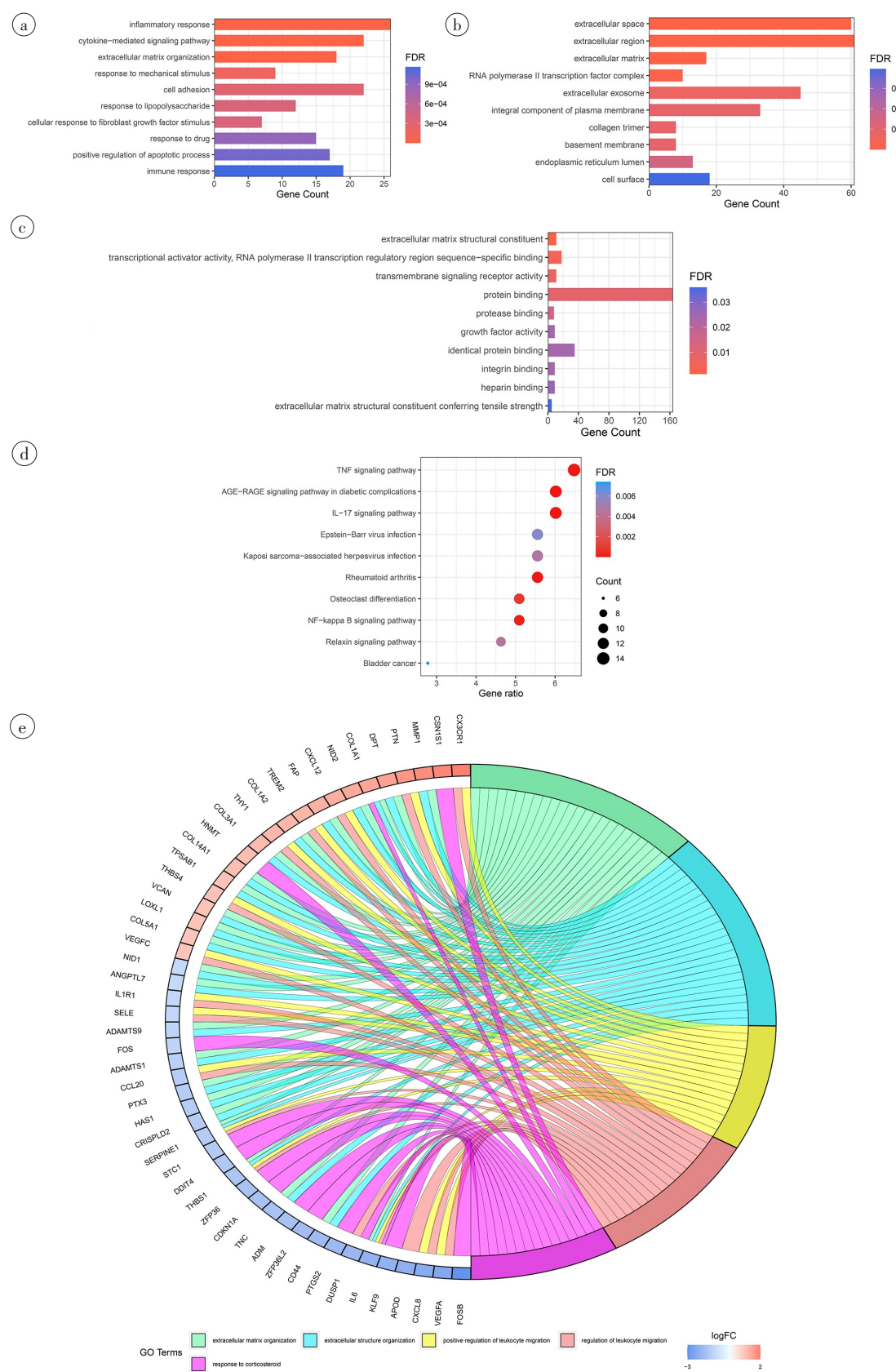


图 1 DEGs 的功能富集分析

Figure 1 Functional enrichment analysis of DEGs

a: DEGs 的 BP 分析; b: DEGs 的 CC 分析; c: DEGs 的 MF 分析; d: DEGs 的 KEGG 分析; e: DEGs 的 GO 分析

随后,分别对上调DEGs和下调DEGs进行分析(图2)。在上调DEGs中,细胞黏附是主要的BP功能(图2a),而细胞因子介导的信号通路则为下调DEGs中最主要的功能(图2b)。与总体DEGs的CC和MF分析类似,上调DEGs的细胞外区域和细胞外基质结

构为主要功能富集区域(图2c、e)。对于下调DEGs,细胞核和蛋白连接则是CC和MF分析的主要功能区域(图2d、f)。蛋白消化和吸收通路对于上调DEGs是很重要的,而TNF信号通路对于下调DEGs是影响最大的(图2g、h)。

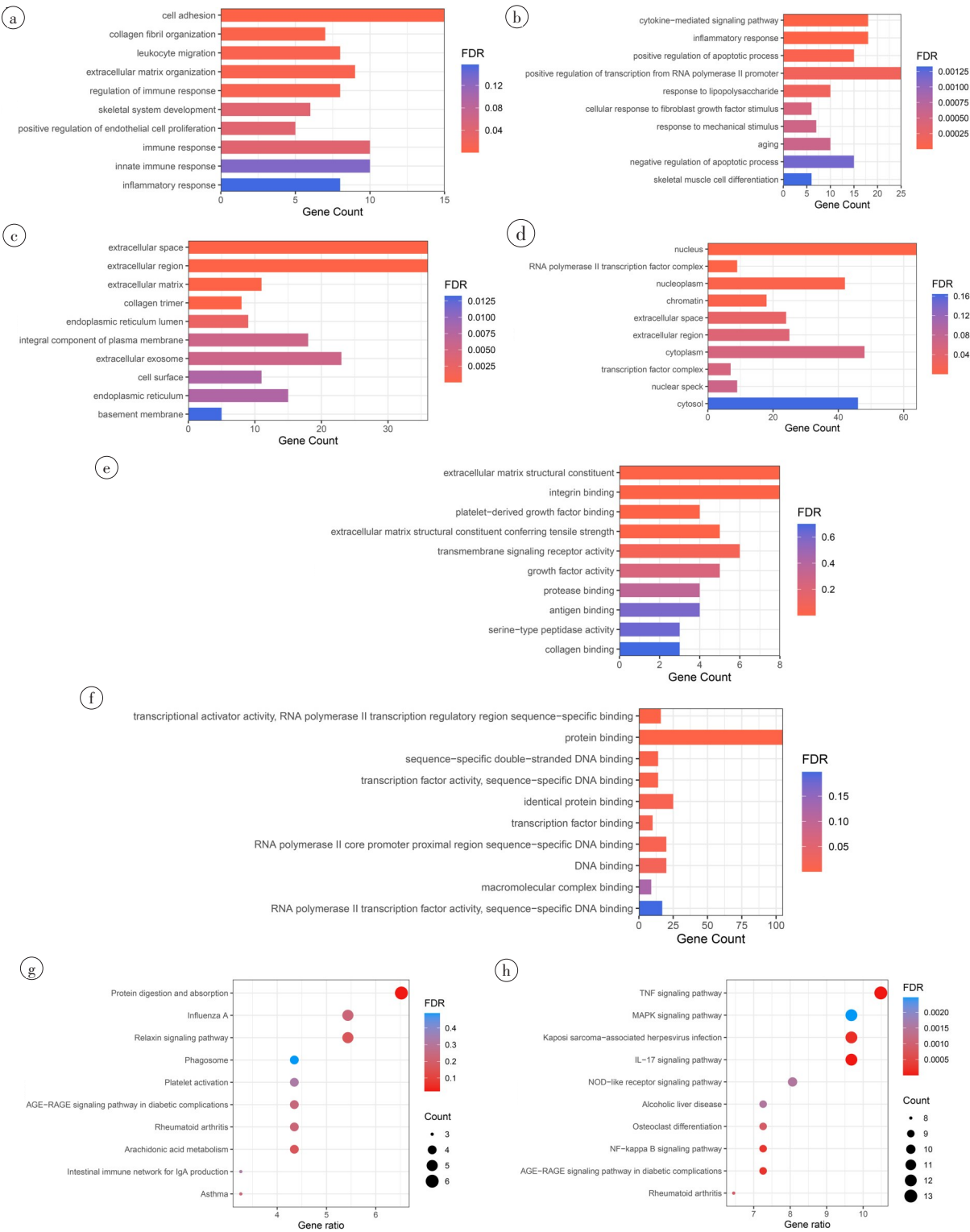


图2 上调及下调DEGs的功能富集分析

Figure 2 Functional enrichment analyses of up- and down-regulated DEGs

a:上调DEGs的BP分析;b:下调DEGs的BP分析;c:上调DEGs的CC分析;d:下调DEGs的CC分析;e:上调DEGs的MF分析;f:下调DEGs的MF分析;g:上调DEGs的KEGG分析;h:下调DEGs的KEGG分析

2.3 PPI网络分析和模块分析

DEGs数据通过STRING进行分析,去除离散数据,得到231个节点以及1064个连接。规定minimum required interaction scores=0.4, average node degree=9.21。模块分析中,规定k-core=2, max. dept from seed=100。得到3个显著模块(node score>4.0),如图3a~c所示。模块1(score=14.973)包含38个节点和277个连接,例如CXCL2、SELE、DUSP1、COL1A1等。模块2(score=6.5)包含13个节点和37个连接,例如GADD45A、EGR1、JUN、IER3等。模块3(score=4.4)包含6个节点和11个连接,例如TRA2A、

SRRM2、PCBP2、RBM25等。

2.4 hub基因分析

PPI分析后通过MCC算法得到前10个基因定义为hub基因。hub基因以及联系最密切的基因如图3d和e。hub基因包括JUN、IL-6、CXCL8、NFKBIA、FOS、PTGS2、SOCS3、EGR1、DUSP1和ATF3。这些hub基因参与多条信号通路并有多种上游及下游调节靶点。其中,IL-6具有最丰富的连接体系。此外,与基因转录相关的细胞因子包括JUN、FOS和ATF3同样具有较高的活跃度。

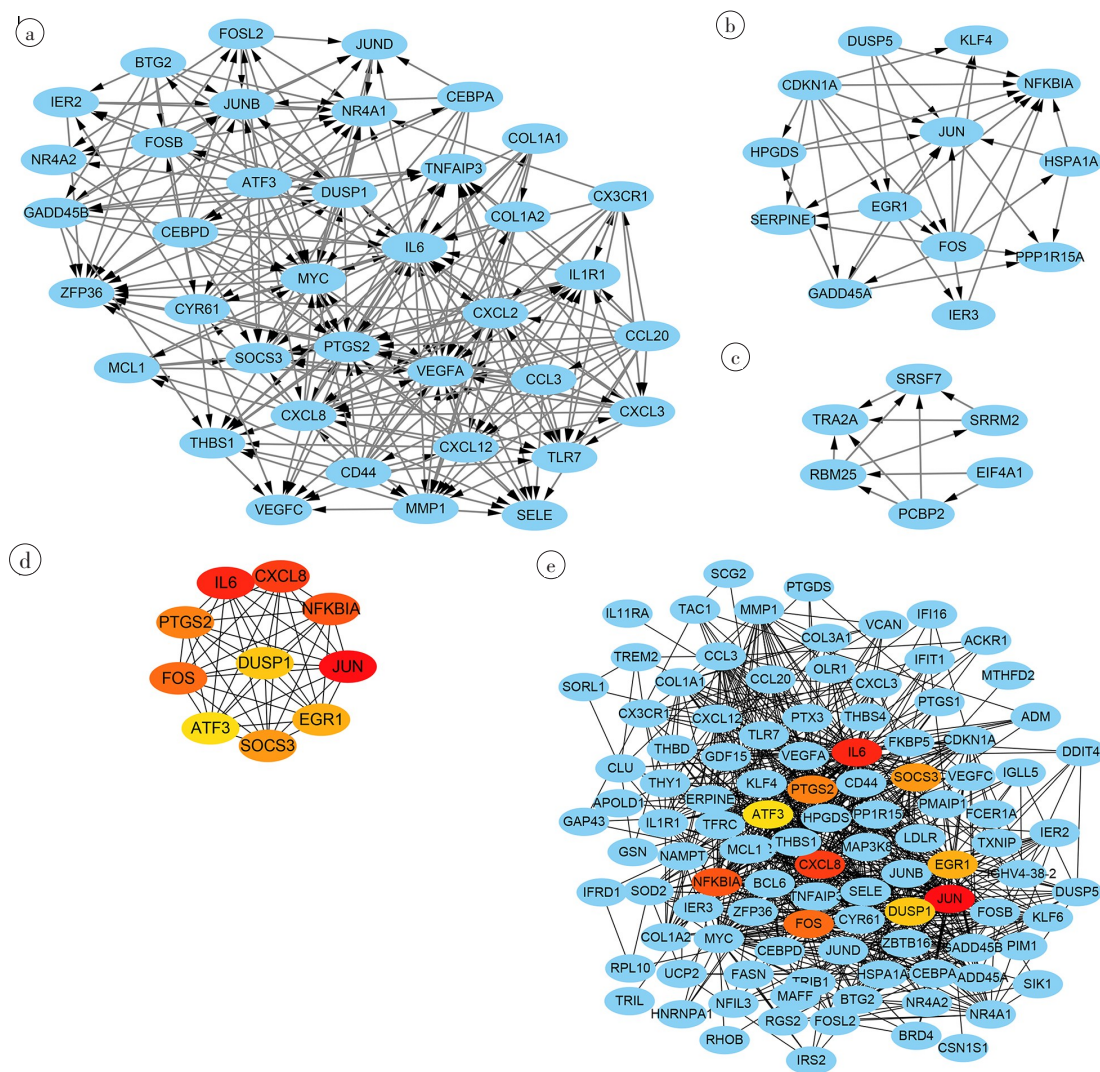


图3 DEGs的hub基因及模块分析

Figure 3 Module analysis and hub genes of DEGs

a~c:3个显著模块网络(node score>4.0);d:hub基因;e:DEGs与hub基因联系紧密的基因网络

2.5 TFs-hub基因相互作用

转录因子和hub基因相互作用通过NetworkAnalyst绘制如图4所示,其中包含242个转录因子与hub基因

相互作用。145个转录因子调节超过1个基因。129个转录因子调节DUSP1,远超过其他hub基因。ELK1、NZF644、NRF1和SIN3A等具有较高关联度。

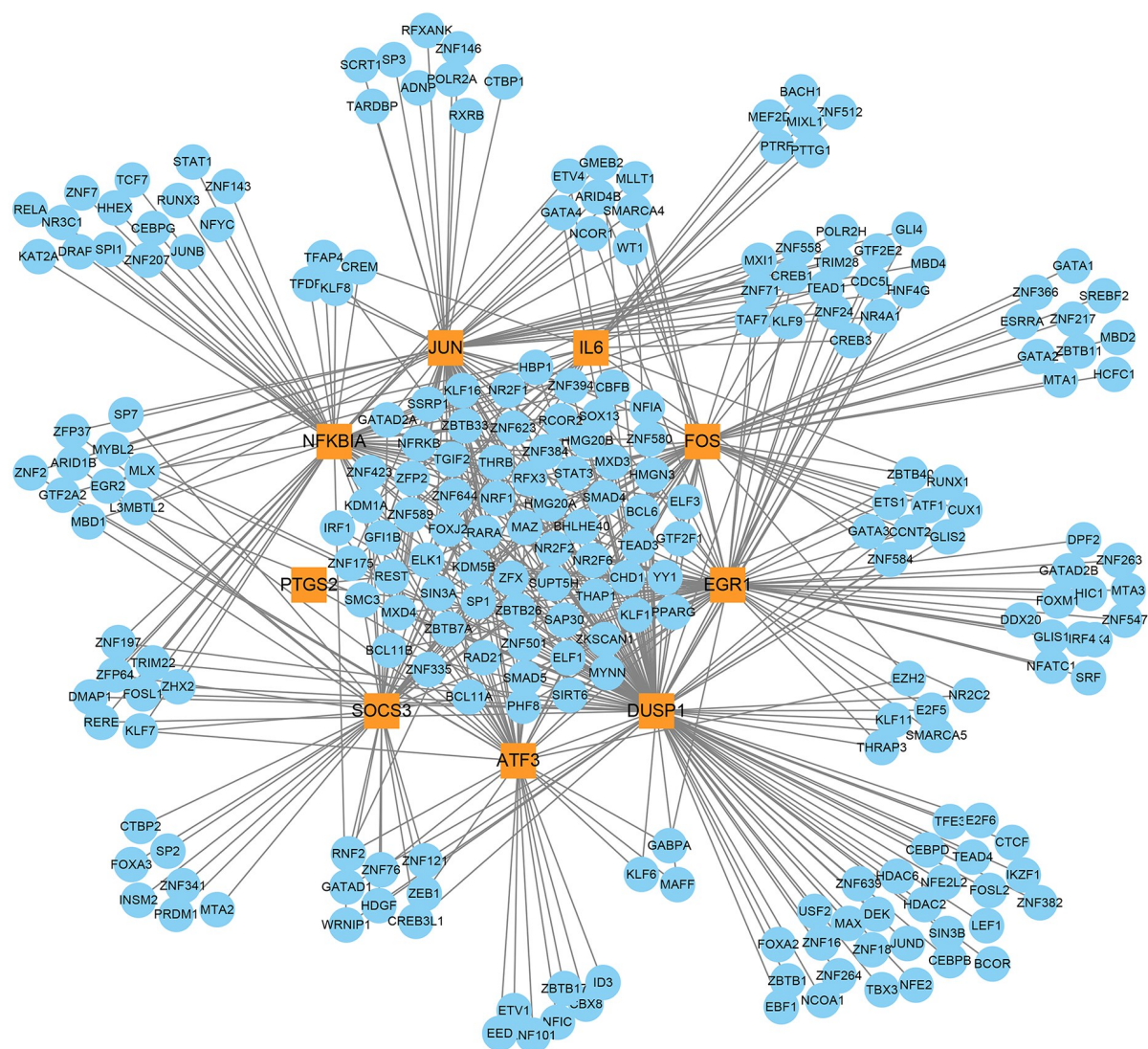


图4 TFs-hub 基因互作网络
Figure 4 TFs-hub gene interaction network

2.6 miRNA-hub 基因相互作用

通过 NetworkAnalyst 分析 miRNA 与 hub 基因的关系,如图 5 所示。笔者发现有 212 个 miRNA 与 10 个 hub 基因产生关联。其中 58 个 miRNA 调节 FOS。在众多 miRNA 中,39 个 miRNA 调节多个基因。hsa-miR-155-5p 参与调控 CXCL8、FOS、SOCS3 和 JUN。

3 讨论

本研究中,数据集 GSE12021 和 GSE55235 来源于 GEO 数据库。通过差异基因分析得到 249 个 DEGs,其中,上调 DEGs 有 111 个。随后,通过 GO 和 KEGG 等对 DEGs 进行富集分析。总体 DEGs 的 BP 分析结果和下调 DEGs 的 BP 分析结果类似,炎症反应和细胞因子介导信号通路具有显著的功能优势,而细胞黏附作用则为上调 DEGs 的 BP 功能富集区域。显然,炎症反应、免疫反应在 OA 发展中起着重

要的作用。从 CC 和 MF 分析也得到,细胞外基质结构相关的功能是 DEGs 具有的重要功能。而 KEGG 通路分析中发现,基因在 TNF 和 IL-6 通路的富集体现了炎症对 OA 影响的关键性。

滑膜炎是关节 OA 常见的表现。正常滑膜组织中存在成纤维细胞样滑膜细胞 (FLS) 和巨噬细胞样滑膜细胞 (MLS)^[17]。对于 OA 滑膜组织,滑膜中出现炎症细胞浸润^[18-19],炎症细胞能够刺激 MLS 产生 TNF、IL-6 等^[1],而 TNF 是一种重要的炎症相关细胞因子^[20]。显然,本研究中展现的 TNF 和 IL 相关的免疫因子调节 OA 滑膜炎与之前研究结果相符合。从 DEGs 网络分析,能够发现模块 1 涉及 38 个节点,远多于其他 2 个模块,而且 10 个 hub 基因中有 6 个(分别为 CXCL8、DUSP1、ATF3、IL-6、PTGS2 和 SOCS3)分布于模块 1 中,其他的 4 个 hub 基因分布在模块 2 中。

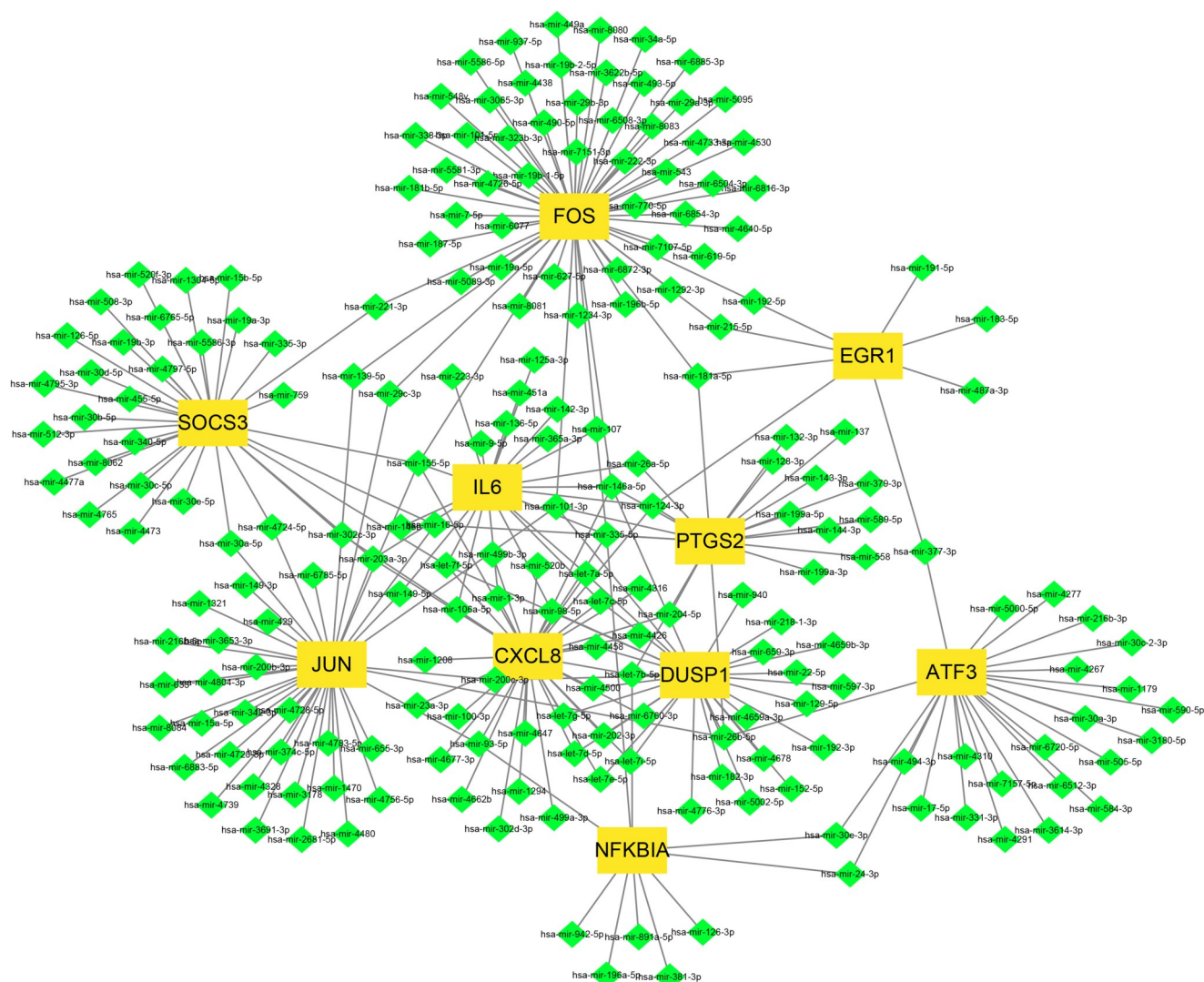


图5 miRNA-hub基因调控网络

Figure 5 miRNA-hub gene regulation network

JUN和FOS是转录因子AP-1的亚结构^[21]。AP-1能够被TNF和IL-1诱导并参与炎性和免疫反应^[22]。JUN和FOS调节细胞周期进程^[23]。也参与OA的前炎性和前损伤发展过程^[21-22, 24]。此外,一些研究表明FOS和JUN调控软骨细胞ATF3的表达^[25],而ATF3在OA软骨细胞中上调^[26]。但在破骨细胞中,ATF3调节AP-1相关基因表达^[27]。显然,在不同细胞系中,ATF3的作用存在差异,而ATF3是否参与反馈调控还有待确认。除了炎性过程外,ATF3还能够调节增殖和分化。软骨细胞中,TNF和IL-1 β 通过NF- κ B调节ATF3进而调控cyclin D1表达^[26, 28]。ATF3还是神经元损伤的标志并与神经痛有关^[29],这从侧面也印证了ATF3和OA疼痛存在关联性^[30]。CXCL8是一种趋化因子,引导细胞于损伤和炎症处富集^[31]。在SOCS家族中,SOCS1、SOCS3和CISH抑制IL-6信号通路^[32-33],而且在软骨细胞和骨细胞中,SOCS3存在

负反馈调控^[34-37]。SOCS3抑制软骨细胞增殖^[38]、骨形成^[35]以及作为炎性产物参与炎症反应^[36, 39]。在软骨细胞中,SOCS3抑制JAK通路而且被下调^[40-42]。然而,有些研究表明SOCS3在正常软骨和OA软骨中变化不明显^[43]。CXCL8、TNF和PTGS2的水平与滑膜炎的程度存在关联性^[44]。DUSP是脱氨酸相关酶,参与MAPK通路^[45]。DUSP1的主要靶点是ERK1/2、p38和JNK^[46],能够使MAPK家族成员去磷酸化进而抑制下游蛋白的作用并下调MMP-13和COX-2的水平^[47-50]。DUSP1被认为能够负性调节炎症反应,并且有研究也证实在OA滑膜细胞中DUSP1被抑制^[50-51]。EGR1是一种细胞因子并参与调节细胞增殖、生存、分化、DNA损伤以及炎症反应^[52-54],而且能够促进软骨退化^[55]、抑制细胞外基质相关基因表达^[53]。血液中EGR1水平被认为是早期OA的标志^[56]。显然,本研究分析的hub基因都是在OA发生发展过程中至关

重要的调节因子。然而,这些研究也存在局限性。大多数的研究都集中在软骨细胞,而滑膜细胞涉及很少。滑膜组织中有多种细胞,而且同样的基因在不同细胞中的作用可能存在差异。尽管滑膜纤维细胞和滑膜巨噬细胞在OA滑膜组织中占据优势,但任何一种都无法代表整体的变化^[57],而且在OA滑膜中还有其他炎性细胞浸润的存在^[19]。细胞之间的相互影响是不可忽视的。

与hub基因相连的miRNA作用网络如图5所示。其中,FOS能被miRNA调节的数量是最多的,而EGR1被调节的数量最少。而hsa-miR-26b-5p、hsa-miR-155-5p、hsa-miR-335-5p以及hsa-miR-146a-5p等对hub基因调控更加密切。hsa-miR-146a-5p与膝关节置换术后疼痛有关,术前血液中hsa-miR-146a-5p越高,术后疼痛缓解越差^[58]。另外,在OA的软骨中,hsa-miR-146a-5p被上调^[59-60]。同样,hsa-miR-335-5p也参加OA的调控。早期OA中,hsa-miR-335-5p在血液中的水平升高^[61]。对于hsa-miR-155-5p,已经有研究表明其与类风湿关节炎密切相关^[8]。目前对于大多数与hub基因相关的miRNA并没有得到充分的探讨,需要进一步研究揭示其中的调控机制。

在hub基因与TF的关联研究中,笔者发现与DUSP1相关的TF最多。在互作网络中,ZNF644、ELK1、NRF1和MAZ等可能具有更多的作用。研究表明,软骨细胞中ELK1能够介导MAPK调控的AP-1和MMP-13表达,而且在滑膜细胞中,ELK1能直接被NF- κ B调节^[62-65]。OA大鼠软骨组织中NRF1被抑制,而NRF1是miR-363-3p的靶点。抑制miR-363-3p能够提升NRF1的水平并抑制凋亡^[14]。显然,还需要更多的研究表明转录因子的调节作用。

本研究讨论了与OA发展相关的基因,包括249个差异表达基因和10个hub基因。随后对hub基因进行了miRNA和TF互作网络分析。通过对多种基因功能和信号通路的研究,为探索OA的发生发展分子机制提供了新的思路。

【参考文献】

- [1] Bondeson J, Wainwright SD, Lauder S, et al. The role of synovial macrophages and macrophage-produced cytokines in driving aggrecanases, matrix metalloproteinases, and other destructive and inflammatory responses in osteoarthritis[J]. *Arthritis Res Ther*, 2006, 8(6): R187.
- [2] Lin J, Wu GW, Zhao ZS, et al. Bioinformatics analysis to identify key genes and pathways influencing synovial inflammation in osteoarthritis[J]. *Mol Med Rep*, 2018, 18(6): 5594-5602.
- [3] Cai WS, Li HH, Zhang YB, et al. Identification of key biomarkers and immune infiltration in the synovial tissue of osteoarthritis by bioinformatics analysis[J]. *Peer J*, 2020, 8: e8390.
- [4] Chen HT, Ni QB, Li B, et al. Identification of differentially expressed genes in synovial tissue of osteoarthritis based on a more robust integrative analysis method[J]. *Clin Rheumatol*, 2021, 40(9): 3745-3754.
- [5] Latchman DS. Transcription factors: an overview[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 1997, 29(12): 1305-1312.
- [6] Tian HL. Detection of differentially expressed genes involved in osteoarthritis pathology[J]. *J Orthop Surg Res*, 2018, 13(1): 49.
- [7] Ye XG, Lu QL, Yang AF, et al. MiR-206 regulates the Th17/Treg ratio during osteoarthritis[J]. *Mol Med*, 2021, 27(1): 64.
- [8] Singh A, Patro PS, Aggarwal A. MicroRNA-132, miR-146a, and miR-155 as potential biomarkers of methotrexate response in patients with rheumatoid arthritis[J]. *Clin Rheumatol*, 2019, 38(3): 877-884.
- [9] Ko JY, Lee MS, Lian WS, et al. MicroRNA-29a counteracts synovitis in knee osteoarthritis pathogenesis by targeting VEGF[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 3584.
- [10] Nelson AE. Osteoarthritis year in review 2017: clinical[J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2018, 26(3): 319-325.
- [11] Ni Z, Shang XF, Tang GL, et al. Expression of miR-206 in human knee articular chondrocytes and effects of miR-206 on proliferation and apoptosis of articular chondrocytes[J]. *Am J Med Sci*, 2018, 355(3): 240-246.
- [12] Ma Y, Wu YZ, Chen JX, et al. miR-10a-5p promotes chondrocyte apoptosis in osteoarthritis by targeting HOXA1[J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2019, 14: 398-409.
- [13] Ding YJ, Wang LF, Zhao Q, et al. MicroRNA-93 inhibits chondrocyte apoptosis and inflammation in osteoarthritis by targeting the TLR4/NF- κ B signaling pathway[J]. *Int J Mol Med*, 2019, 43(2): 779-790.
- [14] Zhang M, Wang ZQ, Li BJ, et al. Identification of microRNA-363-3p as an essential regulator of chondrocyte apoptosis in osteoarthritis by targeting NRF1 through the p53-signaling pathway[J]. *Mol Med Rep*, 2020, 21(3): 1077-1088.
- [15] Zhu NQ, Zhang P, Du LL, et al. Identification of key genes and expression profiles in osteoarthritis by co-expressed network analysis[J]. *Comput Biol Chem*, 2020, 85: 107225.
- [16] Li ZY, Wang QY, Chen GY, et al. Integration of gene expression profile data to screen and verify hub genes involved in osteoarthritis[J]. *Biomed Res Int*, 2018, 2018: 9482726.
- [17] Smith MD, Wechalekar MD. The normal synovium[M]//Protein Purification and Analysis II. iConcept Press Ltd, 2014.
- [18] Noss EH, Brenner MB. The role and therapeutic implications of fibroblast-like synoviocytes in inflammation and cartilage erosion in rheumatoid arthritis[J]. *Immunol Rev*, 2008, 223: 252-270.
- [19] Della Beffa C, Slansky E, Pommerenke C, et al. The relative composition of the inflammatory infiltrate as an additional tool for synovial tissue classification[J]. *PLoS One*, 2013, 8(8): e72494.
- [20] Hayashi K, Piras V, Tabata S, et al. A systems biology approach to suppress TNF-induced proinflammatory gene expressions[J]. *Cell Commun Signal*, 2013, 11: 84.
- [21] Angel P, Karin M. The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1991, 1072(2/3): 129-157.
- [22] Huber R, Kirsten H, Näkki A, et al. Association of human FOS promoter variants with the occurrence of knee-osteoarthritis in a case control association study[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(6): 1382.
- [23] Shaulian E, Karin M. AP-1 in cell proliferation and survival[J]. *Oncogene*, 2001, 20(19): 2390-2400.
- [24] Burrage PS, Brinckerhoff CE. Molecular targets in osteoarthritis: metalloproteinases and their inhibitors[J]. *Curr Drug Targets*, 2007, 8(2): 293-303.
- [25] Chan CM, Macdonald CD, Litherland GJ, et al. Cytokine-induced MMP13 expression in human chondrocytes is dependent on activating transcription factor 3 (ATF3) regulation[J]. *J Biol Chem*, 2017, 292(5): 1625-1636.
- [26] Iezaki T, Ozaki K, Fukasawa K, et al. ATF3 deficiency in chondrocytes alleviates osteoarthritis development[J]. *J Pathol*, 2016, 239(4): 426-437.
- [27] Fukasawa K, Park G, Iezaki T, et al. ATF3 controls proliferation of osteoclast precursor and bone remodeling[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 30918.
- [28] James CG, Woods A, Underhill TM, et al. The transcription factor ATF3 is upregulated during chondrocyte differentiation and represses cyclin D1 and A gene transcription[J]. *BMC Mol Biol*, 2006, 7: 30.
- [29] Ivanavicius SP, Ball AD, Heapy CG, et al. Structural pathology in a rodent model of osteoarthritis is associated with neuropathic pain:

- increased expression of ATF-3 and pharmacological characterisation [J]. Pain, 2007, 128(3): 272-282.
- [30] Adães S, Ferreira-Gomes J, Mendonça M, et al. Injury of primary afferent neurons may contribute to osteoarthritis induced pain: an experimental study using the collagenase model in rats [J]. Osteoarthritis Cartilage, 2015, 23(6): 914-924.
- [31] Bonfante HD, Almeida CD, Abramo C, et al. CCL2, CXCL8, CXCL9 and CXCL10 serum levels increase with age but are not altered by treatment with hydroxychloroquine in patients with osteoarthritis of the knees [J]. Int J Rheum Dis, 2017, 20(12): 1958-1964.
- [32] Croker BA, Krebs DL, Zhang JG, et al. SOCS3 negatively regulates IL-6 signaling *in vivo* [J]. Nat Immunol, 2003, 4(6): 540-545.
- [33] Matsumoto A, Masuhara M, Mitsui K, et al. CIS, a cytokine inducible SH2 protein, is a target of the JAK-STAT5 pathway and modulates STAT5 activation [J]. Blood, 1997, 89(9): 3148-3154.
- [34] Liu X, Croker BA, Campbell IK, et al. Key role of suppressor of cytokine signaling 3 in regulating gp130 cytokine-induced signaling and limiting chondrocyte responses during murine inflammatory arthritis [J]. Arthritis Rheumatol, 2014, 66(9): 2391-2402.
- [35] Cho DC, Brennan HJ, Johnson RW, et al. Bone corticalization requires local SOCS3 activity and is promoted by androgen action *via* interleukin-6 [J]. Nat Commun, 2017, 8(1): 806.
- [36] Deopurkar R, Ghanim H, Friedman J, et al. Differential effects of cream, glucose, and orange juice on inflammation, endotoxin, and the expression of Toll-like receptor-4 and suppressor of cytokine signaling-3 [J]. Diabetes Care, 2010, 33(5): 991-997.
- [37] Sims NA. Influences of the IL-6 cytokine family on bone structure and function [J]. Cytokine, 2021, 146: 155655.
- [38] Gui T, He BS, Gan Q, et al. Enhanced SOCS3 in osteoarthritis may limit both proliferation and inflammation [J]. Biotech Histochem, 2017, 92(2): 107-114.
- [39] Yoshimura A, Ohkubo T, Kiguchi T, et al. A novel cytokine-inducible gene CIS encodes an SH2-containing protein that binds to tyrosine-phosphorylated interleukin 3 and erythropoietin receptors [J]. EMBO J, 1995, 14(12): 2816-2826.
- [40] Yasukawa H, Misawa H, Sakamoto H, et al. The JAK-binding protein JAB inhibits Janus tyrosine kinase activity through binding in the activation loop [J]. EMBO J, 1999, 18(5): 1309-1320.
- [41] Jiang MQ, He JY, Sun YX, et al. Leptin induced TLR4 expression *via* the JAK2-STAT3 pathway in obesity-related osteoarthritis [J]. Oxid Med Cell Longev, 2021, 2021: 7385160.
- [42] Vuolteenaho K, Koskinen A, Moilanen T, et al. Leptin levels are increased and its negative regulators, SOCS-3 and sOb-R are decreased in obese patients with osteoarthritis: a link between obesity and osteoarthritis [J]. Ann Rheum Dis, 2012, 71(11): 1912-1913.
- [43] de Andrés MC, Imagawa K, Hashimoto K, et al. Suppressors of cytokine signalling (SOCS) are reduced in osteoarthritis [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2011, 407(1): 54-59.
- [44] Yamazaki A, Edamura K, Tomo Y, et al. Variations in gene expression levels with severity of synovitis in dogs with naturally occurring stifle osteoarthritis [J]. PLoS One, 2021, 16(1): e0246188.
- [45] Patterson KI, Brummer T, O'Brien PM, et al. Dual-specificity phosphatases: critical regulators with diverse cellular targets [J]. Biochem J, 2009, 418(3): 475-489.
- [46] Camps M, Nichols A, Arkinstall S. Dual specificity phosphatases: a gene family for control of MAP kinase function [J]. FASEB J, 2000, 14(1): 6-16.
- [47] Theodosiou A, Ashworth A. MAP kinase phosphatases [J]. Genome Biol, 2002, 3(7): REVIEWS3009.
- [48] Hashizume M, Mihara M. High molecular weight hyaluronic acid inhibits IL-6-induced MMP production from human chondrocytes by up-regulating the ERK inhibitor, MKP-1 [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2010, 403(2): 184-189.
- [49] Pest MA, Pest CA, Bellini MR, et al. Deletion of dual specificity phosphatase 1 does not predispose mice to increased spontaneous osteoarthritis [J]. PLoS One, 2015, 10(11): e0142822.
- [50] Peng HZ, Yun Z, Wang W, et al. Dual specificity phosphatase 1 has a protective role in osteoarthritis fibroblast-like synoviocytes *via* inhibition of the MAPK signaling pathway [J]. Mol Med Rep, 2017, 16(6): 8441-8447.
- [51] Choi YJ, Yoo JH, Lee Y, et al. Calcium-phosphate crystals promote RANKL expression *via* the downregulation of DUSP1 [J]. Mol Cells, 2019, 42(2): 183-188.
- [52] Lin Y, Luo ZQ. Aberrant methylation patterns affect the molecular pathogenesis of rheumatoid arthritis [J]. Int Immunopharmacol, 2017, 46: 141-145.
- [53] Rockel JS, Bernier SM, Leask A. Egr-1 inhibits the expression of extracellular matrix genes in chondrocytes by TNF α -induced MEK/ERK signalling [J]. Arthritis Res Ther, 2009, 11(1): R8.
- [54] Yang W, Xu TJ, Qiu P, et al. Caveolin-1 promotes pituitary adenoma cells migration and invasion by regulating the interaction between EGR1 and KLF5 [J]. Exp Cell Res, 2018, 367(1): 7-14.
- [55] Sun XW, Huang H, Pan X, et al. EGR1 promotes the cartilage degeneration and hypertrophy by activating the Krüppel-like factor 5 and β -catenin signaling [J]. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2019, 1865(9): 2490-2503.
- [56] Zhang HY, Liu Q, Yang HX, et al. Early growth response 1 reduction in peripheral blood involving condylar subchondral bone loss [J]. Oral Dis, 2019, 25(7): 1759-1768.
- [57] Manfredini C, Paoletta F, Gabusi E, et al. From osteoarthritic synovium to synovial-derived cells characterization: synovial macrophages are key effector cells [J]. Arthritis Res Ther, 2016, 18: 83.
- [58] Giordano R, Petersen KK, Andersen HH, et al. Preoperative serum circulating microRNAs as potential biomarkers for chronic postoperative pain after total knee replacement [J]. Mol Pain, 2020, 16. Doi: 10.1744806920962925.
- [59] Nakasa T, Miyaki S, Okubo A, et al. Expression of microRNA-146 in rheumatoid arthritis synovial tissue [J]. Arthritis Rheum, 2008, 58(5): 1284-1292.
- [60] Yamasaki K, Nakasa T, Miyaki S, et al. Expression of MicroRNA-146a in osteoarthritis cartilage [J]. Arthritis Rheum, 2009, 60(4): 1035-1041.
- [61] Ali SA, Gandhi R, Potla P, et al. Sequencing identifies a distinct signature of circulating microRNAs in early radiographic knee osteoarthritis [J]. Osteoarthritis Cartilage, 2020, 28(11): 1471-1481.
- [62] Muddasani P, Norman JC, Ellman M, et al. Basic fibroblast growth factor activates the MAPK and NF κ B pathways that converge on Elk-1 to control production of matrix metalloproteinase-13 by human adult articular chondrocytes [J]. J Biol Chem, 2007, 282(43): 31409-31421.
- [63] Im HJ, Sharrocks AD, Lin X, et al. Basic fibroblast growth factor induces matrix metalloproteinase-13 *via* ERK MAP kinase-altered phosphorylation and sumoylation of Elk-1 in human adult articular chondrocytes [J]. Open Access Rheumatol, 2009, 1: 151-161.
- [64] Liu SC, Chuang SM, Hsu CJ, et al. CTGF increases vascular endothelial growth factor-dependent angiogenesis in human synovial fibroblasts by increasing miR-210 expression [J]. Cell Death Dis, 2014, 5(10): e1485.
- [65] Housmans BA, Neefjes M, Surtel DA, et al. Synovial fluid from end-stage osteoarthritis induces proliferation and fibrosis of articular chondrocytes *via* MAPK and RhoGTPase signaling [J]. Osteoarthritis Cartilage, 2022, 30(6): 862-874.

(编辑:薛泽玲)