

激素性股骨头坏死滑膜病变分子机制的实验研究

方伟华¹, 庄至坤², 彭鹏¹, 肖方骏¹, 杨晓强¹, 林锟¹, 何伟³, 魏秋实³, 何敏聪³

(1. 广州中医药大学第三临床医学院, 广东 广州 510006;

2. 泉州市正骨医院, 福建 泉州 362000;

3. 广州中医药大学第三附属医院, 广东 广州 510378)

摘要 目的:探讨激素性股骨头坏死(steroid-induced osteonecrosis of the femoral head, SONFH)滑膜病变的分子机制。**方法:**①转录组测序及生物信息学分析。收集 9 例接受全髋关节置换术的患者(SONFH 患者 3 例、髋骨关节炎患者 3 例和股骨颈骨折患者 3 例)术中切除的髋关节滑膜组织,进行转录组测序和生物信息学分析,筛选 SONFH 滑膜病变核心基因。②滑膜组织检测。根据标本来源将髋关节滑膜组织分为 SONFH 组、髋骨关节炎组和股骨颈骨折组。观察各组髋关节滑膜组织的组织形态,采用实时定量 PCR 检测 3 组髋关节滑膜组织中 SONFH 滑膜病变核心基因的 mRNA 相对表达量,采用蛋白质印迹法和免疫组织化学染色法检测 3 组髋关节滑膜组织中 SONFH 滑膜病变核心基因的蛋白相对表达量。采用免疫荧光染色法检测 SONFH 滑膜病变的靶细胞。③细胞验证。培养大鼠滑膜成纤维细胞,构建滑膜炎细胞模型。采用实时定量 PCR 及蛋白质印迹法检测空白细胞(空白细胞组)和滑膜炎模型细胞(模型细胞组)中 SONFH 滑膜病变核心基因的表达。**结果:**①转录组测序和生物信息学分析结果。经对不同患者来源的髋关节滑膜组织进行差异基因分析,共筛选出 1001 个与 SONFH 髋关节滑膜病变相关的基因,这些基因与免疫反应和外泌体有关,其中干扰素调节因子(interferon regulatory factor, IRF)4 和 IRF7 是 SONFH 髋关节滑膜病变的核心基因,两者均为参与 I 型干扰素应答的关键转录因子。②滑膜组织形态观察结果。苏木素-伊红染色显示,股骨颈骨折组髋关节滑膜组织形态正常,无细胞增生、肥大或间质水肿;髋骨关节炎组髋关节滑膜组织细胞增生,有少量新生血管和细胞聚集;SONFH 组髋关节滑膜组织细胞大量增殖和聚集,有新生血管。③滑膜组织中 SONFH 滑膜病变核心基因表达检测结果。SONFH 组髋关节滑膜组织中 IRF4、IRF7、干扰素- α (interferon- α , IFN- α)的 mRNA 相对表达量均高于股骨颈骨折组和髋骨关节炎组($P=0.000$, $P=0.000$, $P=0.000$; $P=0.001$, $P=0.000$, $P=0.036$),髋骨关节炎组髋关节滑膜组织中 IRF4、IRF7、IFN- α 的 mRNA 相对表达量均高于股骨颈骨折组($P=0.000$, $P=0.000$, $P=0.000$)。IRF4、IRF7、IFN- α 蛋白在 SONFH 组髋关节滑膜组织中高表达,SONFH 组髋关节滑膜组织中 IRF4、IRF7、IFN- α 的蛋白相对表达量均高于股骨颈骨折组和髋骨关节炎组($P=0.001$, $P=0.000$, $P=0.000$; $P=0.000$, $P=0.014$, $P=0.000$),髋骨关节炎组髋关节滑膜组织中 IRF4、IRF7、IFN- α 的蛋白相对表达量均高于股骨颈骨折组($P=0.002$, $P=0.005$, $P=0.000$)。④SONFH 滑膜病变靶细胞检测结果。SONFH 组髋关节滑膜组织中 IRF7、钙黏附蛋白 11(cadherin-11, CDH-11)的蛋白相对表达量均高于股骨颈骨折组和髋骨关节炎组($P=0.001$, $P=0.000$; $P=0.000$, $P=0.001$),髋骨关节炎组髋关节滑膜组织中 IRF7、CDH-11 的蛋白相对表达量高于股骨颈骨折组($P=0.001$, $P=0.000$)。滑膜成纤维细胞为 SONFH 滑膜病变的靶细胞。⑤细胞验证结果。模型细胞组 IRF4、IRF7、IFN- α 的 mRNA 和蛋白相对表达量均高于空白细胞组($P=0.001$, $P=0.002$, $P=0.000$; $P=0.001$, $P=0.007$, $P=0.000$)。**结论:**SONFH 滑膜病变与免疫炎症反应关系密切,滑膜成纤维细胞可能是 SONFH 滑膜病变的靶细胞,IRF4 和 IRF7 可能是其潜在的靶点。

关键词 股骨头坏死;糖皮质激素;滑膜炎;RNA 测序;成纤维细胞;干扰素 I 型

Molecular mechanisms of synovial lesions in steroid-induced osteonecrosis of the femoral head: an experimental study

FANG Weihua¹, ZHUANG Zhikun², PENG Peng¹, XIAO Fangjun¹, YANG Xiaoqiang¹, LIN Kun¹, HE Wei³, WEI Qiu-shi³, HE Mincong³

基金项目:国家自然科学基金项目(82274544, 82004392);广东省基础与应用基础研究基金项目(2023A151010551);国家中医药管理局高水平中医药重点学科建设项目(zyydzk-2023106);福建中医药大学中医骨伤科学学科开放课题资助项目(XGS2023008);毕节市科学技术局 2022 年度“揭榜挂帅”项目(毕科合重大专项[2022]1 号);广东省中医骨伤研究院开放课题重点项目(GYH202101-01, GYH202101-04)

通讯作者:何敏聪 E-mail: min-cong. he@ hotmail. com

1. The Third Clinical Medical College of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, Guangdong, China
2. Quanzhou Orthopedic-Traumatological Hospital, Quanzhou 362000, Fujian, China
3. The Third Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510378, Guangdong, China

ABSTRACT Objective: To investigate the molecular mechanisms of synovial lesions in steroid-induced osteonecrosis of the femoral head (SONFH). **Methods:** ①RNA sequencing(RNA-seq) and bioinformatics analysis. The hip synovial tissues were collected from patients with SONFH(3 ones), hip osteoarthritis(HOA)(3 ones) and femoral neck fracture(FNF)(3 ones), respectively, during the total hip arthroplasty for RNA-seq and bioinformatics analysis to screen the core genes of synovial lesions in SONFH. ②Synovial tissues detection. The hip synovial tissue specimens were divided into SONFH group, HOA group, and FNF group based on their sources, and then were sectioned and stained with hematoxylin-eosin(HE) for observing the morphology. Furthermore, the relative mRNA expression levels of core genes of SONFH-triggered synovial lesions in the hip synovial tissues were detected by using real-time quantitative PCR(RT-qPCR), and the relative protein expression levels of core genes of SONFH-triggered synovial lesions in the hip synovial tissues were detected by employing Western blotting and immunohistochemical staining, respectively. Additionally, the target cells of SONFH-triggered synovial lesions were detected by immunofluorescence staining. ③Cell validation. The rat synovial fibroblasts(SFs) were cultured to construct a synovitis-cell model, and the expression of core genes of SONFH-triggered synovial lesions in blank cells(blank cell group) and synovitis model cells(model cell group) were detected by using RT-qPCR and Western blotting, respectively. **Results:** ①The results of RNA-seq and bioinformatics analysis. One thousand and one SONFH-triggered hip synovial lesions-associated genes were screened out by analysis on differentially expressed genes(DEGs) in hip synovial tissues from different patients, and they were all related to immune response and exosomes, with interferon regulatory factor(IRF)4 and IRF7 identified as the core genes for SONFH-triggered hip synovial lesions, both of which were the key transcription factors in participating in type I interferon responses. ②The results of observation on morphology of synovial tissues. The result of HE staining showed that, in FNF group, the hip synovial tissues presented with a normal morphology, without cell proliferation, hypertrophy, or interstitial edema; the hip synovial tissues in HOA group exhibited cell proliferation, with a small amount of neovascularization and cell aggregation; while the marked changes, manifesting as a significant increase in cell proliferation and aggregation, with the neovascularization, were observed in hip synovial tissues of SONFH group. ③The results of detection on the expression of core genes of SONFH-triggered synovial lesions in synovial tissues. The relative mRNA expression levels of IRF4, IRF7 and interferon- α (IFN- α) in hip synovial tissues were higher in SONFH group compared to FNF group and HOA group($P=0.000$, $P=0.000$, $P=0.000$; $P=0.001$, $P=0.000$, $P=0.036$), and were higher in HOA group compared to FNF group($P=0.000$, $P=0.000$, $P=0.000$). The IRF4, IRF7 and IFN- α proteins were highly expressed in the hip synovial tissues in SONFH group. The relative protein expression levels of IRF4, IRF7 and IFN- α in hip synovial tissues were higher in SONFH group compared to FNF group and HOA group($P=0.001$, $P=0.000$, $P=0.000$; $P=0.000$, $P=0.014$, $P=0.000$), and were higher in HOA group compared to FNF group($P=0.002$, $P=0.005$, $P=0.000$). ④The results of detection on target cells of SONFH-triggered synovial lesions. The relative protein expression levels of IRF7 and cadherin-11(CDH-11) in hip synovial tissues were higher in SONFH group compared to FNF group and HOA group($P=0.001$, $P=0.000$; $P=0.000$, $P=0.001$), and were higher in HOA group compared to FNF group($P=0.001$, $P=0.000$). The SFs were identified as the target cells of SONFH-triggered synovial lesions. ⑤The results of cell verification. The relative mRNA and protein expression levels of IRF4, IRF7, and IFN- α were higher in model cell group compared to blank cell group($P=0.001$, $P=0.002$, $P=0.000$; $P=0.001$, $P=0.007$, $P=0.000$). **Conclusion:** The synovial lesions are closely related to immune-inflammatory responses in patients with SONFH. The SFs may be the target cells of SONFH-triggered synovial lesions, with IRF4 and IRF7 as its potential targets.

Keywords femur head necrosis; glucocorticoids; synovitis; RNA-seq; fibroblasts; interferon type I

股骨头坏死(osteonecrosis of the femoral head, ONFH)是一种常见的骨科疾病,其特征是股骨头塌陷和关节功能障碍^[1]。ONFH 主要影响年轻人,全球发病率呈上升趋势^[2]。研究表明,糖皮质激素的使用是非创伤性股骨头坏死的主要驱动因素^[3]。对于激素性股骨头坏死(steroid-induced osteonecrosis of the

femoral head, SONFH)的诊断和治疗,以往关注的首要目标是避免股骨头塌陷和保留髋关节功能,而往往忽略了髋关节滑膜病变。但临床在进行髋关节手术时,常发现 SONFH 患者的髋关节存在明显的滑膜增生和软骨破坏。Hatanaka 等^[4]研究发现,ONFH 患者的髋关节滑膜炎可在股骨头塌陷后发生,并随着股骨

头塌陷的进展而恶化。Rabquer 等^[5]研究发现, SONFH 患者的髌关节滑膜组织有 CD4⁺T 细胞、巨噬细胞、CD8⁺T 细胞等免疫细胞浸润。因此, 对于 SONFH 的诊治, 滑膜病变不可忽视。然而, 目前关于 SONFH 滑膜病变的研究很少, 其发生的分子机制仍未知。近年来, 随着基因技术的广泛应用, 转录组测序技术为在分子层面探索疾病的发生机制提供了可行性。为给 SONFH 的防治提供新思路, 我们基于转录组测序, 对 SONFH 滑膜病变的分子机制进行了研究。

1 材料与仪器

1.1 标本来源

髌关节滑膜组织来自 9 例接受全髌关节置换术的患者 (SONFH 患者 3 例、髌骨关节炎患者 3 例和股骨颈骨折患者 3 例, 患者年龄均 ≥ 18 岁, 均不合并乙型肝炎、肺结核、梅毒、艾滋病等传染性疾病, 均不合并类风湿关节炎、脊髓灰质炎、败血症后关节炎, 均无骨骼发育不良, 均对本研究方案知情同意并签署知情同意书)。大鼠滑膜成纤维细胞购自上海赛百慷生物技术股份有限公司。本研究实验方案经广州中医药大学第三附属医院医学伦理委员会审查通过, 伦理批件号: PJ-XS-20230523-002。

1.2 主要实验试剂和仪器

兔抗干扰素调节因子 (interferon regulatory factor, IRF)4、兔抗 IRF7、鼠抗 CDH-11 (美国 SAB 公司), 辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔抗体、柠檬酸钠抗原修复液、封闭山羊血清 (武汉博士德生物工程有限公司), 4% 多聚甲醛、乙二胺四乙酸脱钙液 (广州四和生物科技有限公司), 脂多糖 (美国 MCE 公司), Trizol 试剂 (美国赛默飞公司), RNA 6000 Nano LabChip 试剂盒 (美国安捷伦公司), PrimeScriptTM RT Master Mix 试剂盒、SYBR Green Pro Taq HS 预混型 qPCR 试剂盒 (湖南艾科瑞生物工程有限公司)。生物分析仪 2100 (美国安捷伦公司), 凝胶成像仪、PCR 仪器 (美国 BioRad 公司), P0100A 全景数字载玻片扫描仪 (匈牙利 3DHIESTECH 公司)。

2 方法

2.1 转录组测序及生物信息分析

2.1.1 RNA 提取及测序 用 Trizol 试剂提取 9 名患者髌关节滑膜组织的总 RNA, 具体实验步骤按照说明书进行操作。采用生物分析仪 2100 和 RNA 6000 Nano LabChip 试剂盒分析总 RNA 的数量和纯度, 选用 RNA 完整值 > 7.0 的 RNA 构建测序文库, 采用

Illumina NovaseqTM6000 基因测序仪进行 2×150 bp 对端测序。

2.1.2 生物信息分析 采用 DESeq2 软件对不同患者来源的髌关节滑膜组织进行差异基因分析, 将 $P < 0.05$ 和绝对倍数变化 > 2 的基因视为差异基因。利用 DAVID 数据库对差异基因进行功能富集分析。通过 STRING 数据库构建蛋白质相互作用网络, 交互作用分数设置为 0.900。采用 Cytoscape 3.9.1 软件中的 MCODE 插件对滑膜炎核心基因进行筛选和可视化。

2.2 滑膜组织检测

2.2.1 分组 根据标本来源将髌关节滑膜组织分为 SONFH 组、髌骨关节炎组和股骨颈骨折组。

2.2.2 组织形态观察 髌关节滑膜组织标本用 4% 多聚甲醛固定, 经脱钙、脱水后, 将标本用石蜡包埋、切片 (厚度 $5 \mu\text{m}$)。取组织标本切片进行苏木素-伊红染色。

2.2.3 核心基因表达检测 采用实时定量 PCR 检测 3 组髌关节滑膜组织中 SONFH 滑膜病变核心基因的 mRNA 相对表达量, 采用蛋白质印迹法和免疫组织化学染色法检测 3 组髌关节滑膜组织中 SONFH 滑膜病变核心基因的蛋白相对表达量。

2.2.4 滑膜病变靶细胞检测 采用免疫荧光染色法检测 SONFH 滑膜病变的靶细胞。

2.3 细胞验证

将购买的大鼠滑膜成纤维细胞进行培养、传代后分为空白细胞组和模型细胞组。空白细胞组不进行干预。模型细胞组用 $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的脂多糖干预 48 h ^[6], 构建滑膜炎细胞模型。采用实时定量 PCR 及蛋白质印迹法检测 2 组大鼠滑膜成纤维细胞中 SONFH 滑膜病变核心基因的表达。

2.4 数据统计分析

采用 SPSS26.0 统计学软件处理数据。3 组髌关节滑膜组织中各检测基因的 mRNA 和蛋白相对表达量的组间总体比较均采用单因素方差分析, 组间两两比较均采用 LSD-*t* 检验; 2 组大鼠滑膜成纤维细胞中各检测基因的 mRNA 和蛋白相对表达量的组间比较均采用 *t* 检验。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

3 结果

3.1 转录组测序及生物信息分析结果

所有样本测序的有效数据均大于 5 Gb, Q20、Q30

均大于 90%, 测序数据质量高(表 1)。经对不同患者来源的髋关节滑膜组织进行差异基因分析, 共筛选出 1001 个与 SONFH 髋关节滑膜病变相关的基因(图 1、图 2)。功能富集分析结果示, SONFH 髋关节滑膜病

变相关基因与免疫反应和外泌体有关(图 3)。SONFH 髋关节滑膜病变的核心基因是 IRF4 和 IRF7, 两者均为参与 I 型干扰素应答的关键转录因子(图 4)。

表 1 髋关节滑膜组织转录组测序质量

样本	RAW data		Valid Data		Valid Ratio	$\geq Q20/\%$	$\geq Q30/\%$	GC content/%
	Read	Base/Gb	Base	Base/Gb				
FNF ¹⁾ 1	44 053 442	6.61	42 668 762	6.40	96.86	99.92	96.80	49.50
FNF ¹⁾ 2	40 210 372	6.03	38 951 992	5.84	96.87	99.95	96.64	49.50
FNF ¹⁾ 3	43 892 024	6.58	42 683 778	6.40	97.25	99.93	96.51	47.50
HOA ²⁾ 1	43 521 568	6.53	41 936 948	6.29	96.36	99.93	96.66	48.50
HOA ²⁾ 2	38 523 906	5.78	37 328 474	5.60	96.90	99.93	96.82	49.00
HOA ²⁾ 3	41 992 370	6.30	40 470 960	6.07	96.38	99.93	96.89	48.50
SONFH ³⁾ 1	47 469 502	7.12	45 961 662	6.89	96.82	99.94	96.88	48.50
SONFH ³⁾ 2	44 236 830	6.64	43 081 940	6.46	97.39	99.94	96.76	48.50
SONFH ³⁾ 3	37 419 456	5.61	36 288 488	5.44	96.98	99.93	96.70	48.50

注:1)股骨颈骨折;2)髋骨关节炎;3)激素性股骨头坏死。

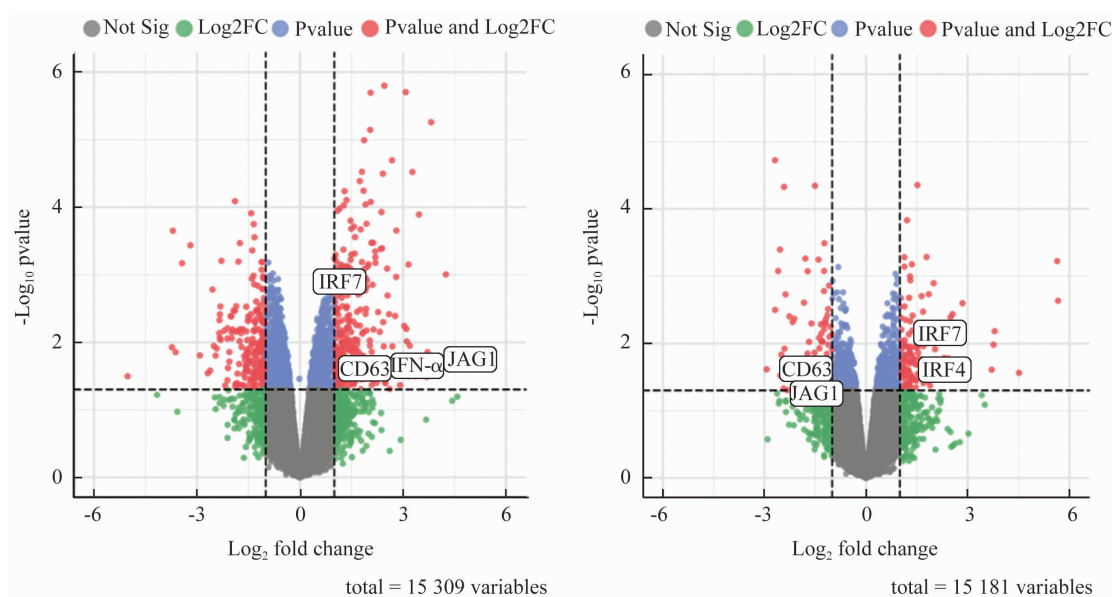


图 1 不同患者来源的髋关节滑膜组织差异基因分析火山图

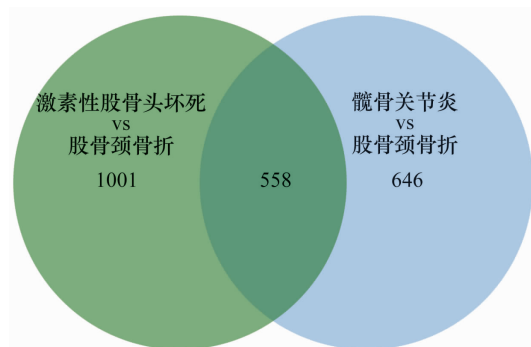


图 2 不同患者来源的髋关节滑膜组织差异基因分析韦恩图

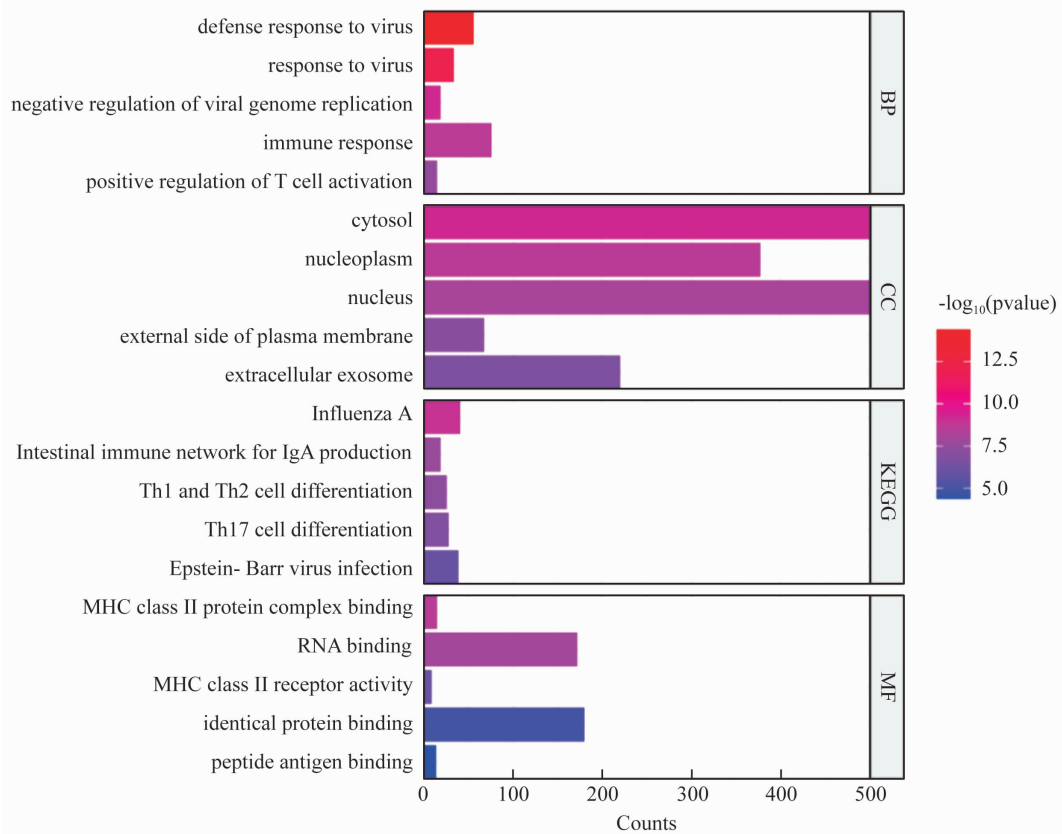


图 3 激素性股骨头坏死滑膜病变相关基因功能富集分析结果图

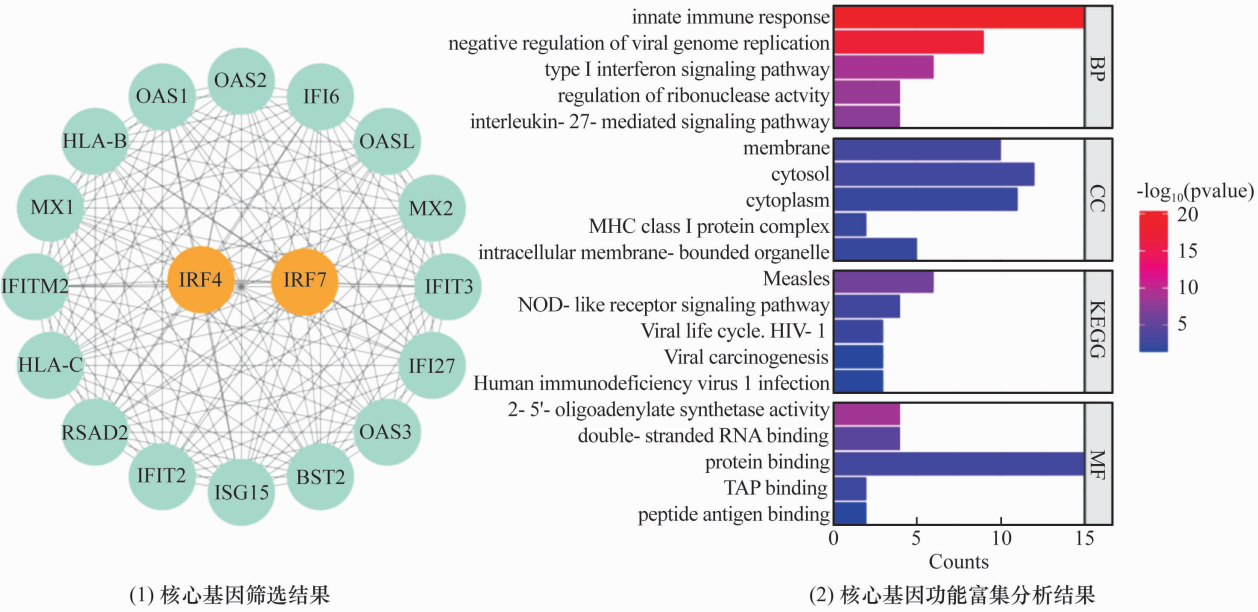


图 4 激素性股骨头坏死髋关节滑膜病变的核心基因筛选和功能富集分析结果图

3.2 滑膜组织形态观察结果

苏木素-伊红染色显示,股骨颈骨折组髋关节滑膜组织形态正常,无细胞增生、肥大或间质水肿;髋骨关节炎组髋关节滑膜组织细胞增生,有少量新生血管和细胞聚集;SONFH 组髋关节滑膜组织细胞大量增殖和聚集,有新生血管。见图 5。

3.3 滑膜组织中 SONFH 滑膜病变核心基因表达检测结果

3.3.1 mRNA 相对表达量检测结果 实时定量 PCR 引物序列见表 2。3 组髋关节滑膜组织中 IRF4、IRF7、干扰素-α (interferon-α, IFN-α) 的 mRNA 相对表达量的组间总体比较,差异均有统计学意义。SONFH

组髌关节滑膜组织中 IRF4、IRF7、IFN- α 的 mRNA 相对表达量均高于股骨颈骨折组和髌骨关节炎组 ($P=0.000, P=0.000, P=0.000; P=0.001, P=0.000, P=0.036$)。髌骨关节炎组髌关节滑膜组织中 IRF4、IRF7、IFN- α 的 mRNA 相对表达量均高于股骨颈骨折组 ($P=0.000, P=0.000, P=0.000$)。见表 3。

3.3.2 蛋白相对表达量检测结果 IRF4、IRF7、IFN- α 在 SONFH 组髌关节滑膜组织中高表达 (图 6、

图 7)。3 组髌关节滑膜组织中 IRF4、IRF7、IFN- α 的蛋白相对表达量的组间总体比较, 差异均有统计学意义; SONFH 组髌关节滑膜组织中 IRF4、IRF7、IFN- α 的蛋白相对表达量均高于股骨颈骨折组和髌骨关节炎组 ($P=0.001, P=0.000, P=0.000; P=0.000, P=0.014, P=0.000$); 髌骨关节炎组髌关节滑膜组织中 IRF4、IRF7、IFN- α 的蛋白相对表达量均高于股骨颈骨折组 ($P=0.002, P=0.005, P=0.000$)。见表 4。

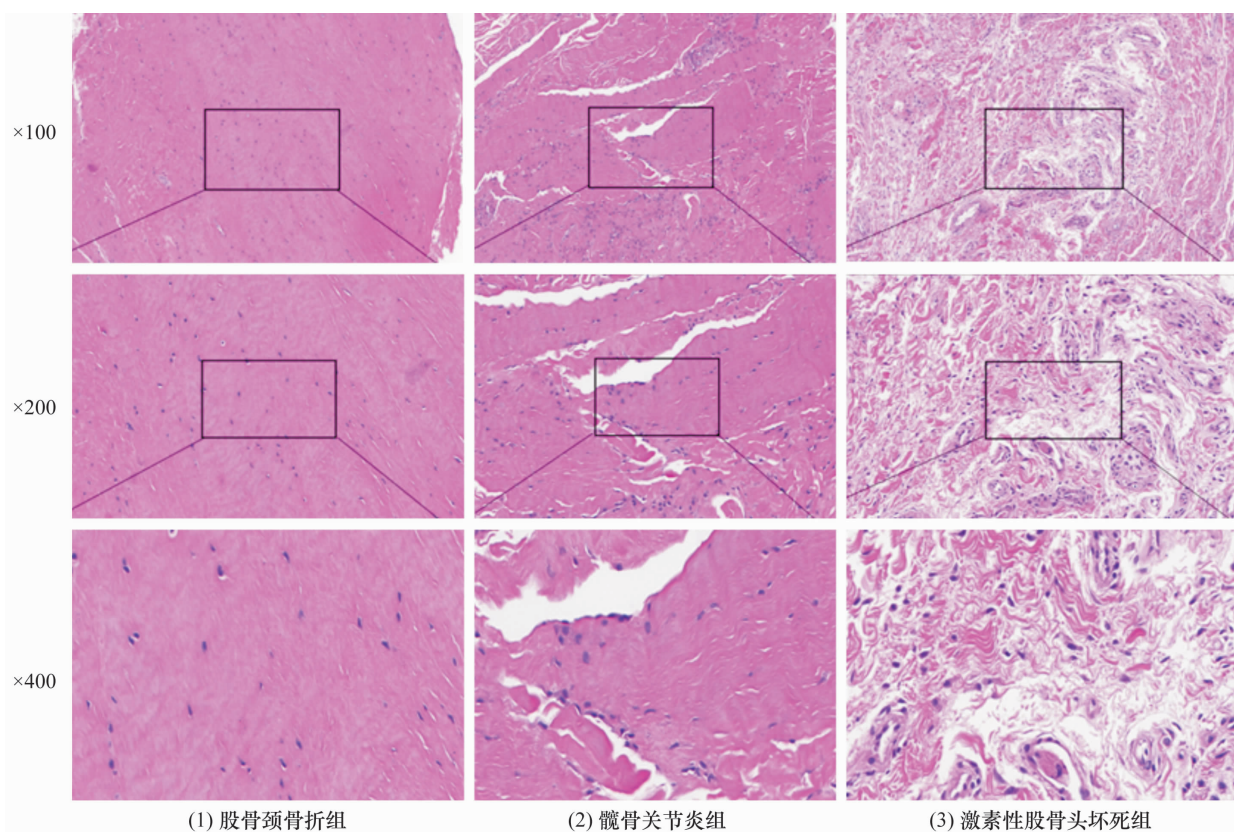


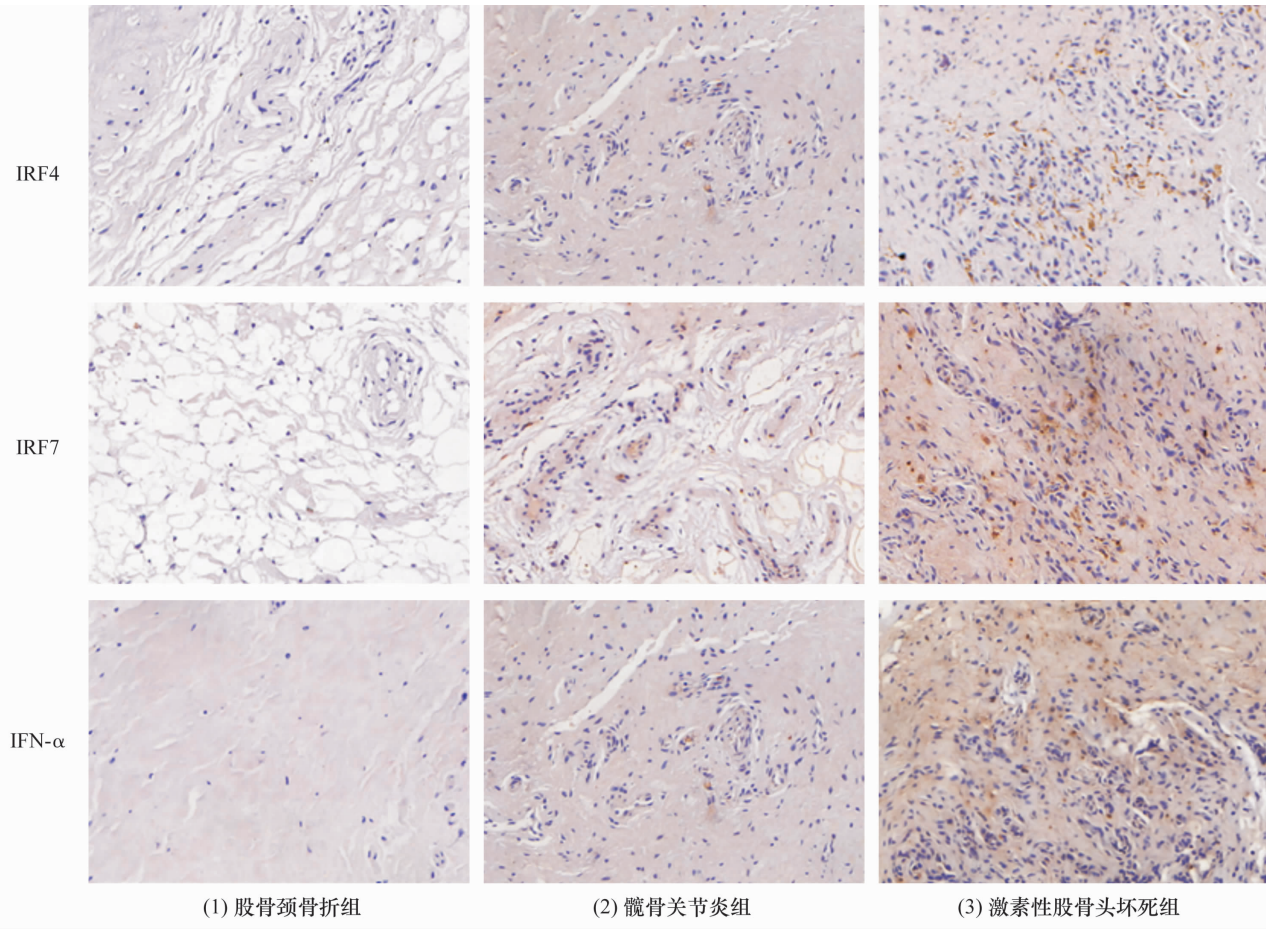
图 5 3 组髌关节滑膜组织苏木素-伊红染色图片

表 2 滑膜组织中激素性股骨头坏死滑膜病变核心基因实时定量 PCR 引物序列

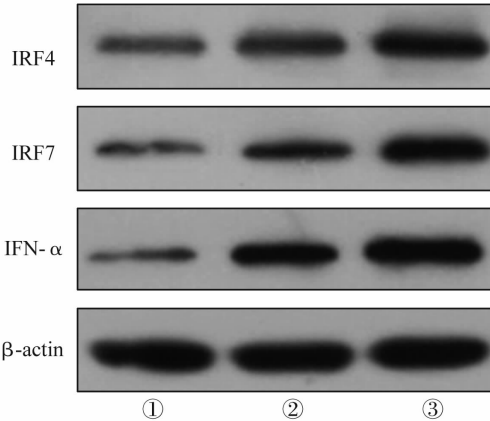
基因名称	上游引物序列(5' - 3')	下游引物序列(5' - 3')
干扰素调节因子 4	GCTGATCGACCAGATCGACAG	CGGTTGTAGTCCTGCTTGC
干扰素调节因子 7	GCTGGACGTGACCATCATGTA	GGGCCGTATAGGAACGTGC
干扰素- α	TTGTCAGAAGCCAGCGTTCAC	CTGCTGTCTAGGATGTGACCTGC
甘油醛-3-磷酸脱氢酶	GGCATCCTGGGCTACACTGA	GGAGTGGGTGTCGCTGTTG

表 3 3 组髌关节滑膜组织中干扰素调节因子 4、干扰素调节因子 7 和干扰素- α 的 mRNA 相对表达量

组别	样本量/例	干扰素调节因子 4($\bar{x} \pm s$)	干扰素调节因子 7($\bar{x} \pm s$)	干扰素- α ($\bar{x} \pm s$)
股骨颈骨折组	3	0.524 \pm 0.048	0.516 \pm 0.010	0.557 \pm 0.083
髌骨关节炎组	3	1.180 \pm 0.076	1.074 \pm 0.026	1.140 \pm 0.079
激素性股骨头坏死组	3	1.557 \pm 0.062	1.642 \pm 0.053	1.422 \pm 0.054
<i>F</i> 值		92.100	259.233	35.687
<i>P</i> 值		0.000	0.000	0.000



IRF4 为干扰素调节因子 4,IRF7 为干扰素调节因子 7,IFN-α 为干扰素-α。
 图 6 3 组髌关节滑膜组织中干扰素调节因子 4、干扰素调节因子 7 和干扰素-α 蛋白表达免疫组织化学染色结果 (× 100)



IRF4 为干扰素调节因子 4,IRF7 为干扰素调节因子 7,IFN-α 为干扰素-α,β-actin 为 β-肌动蛋白,
 ①为股骨颈骨折组,②为髌骨关节炎组,③为激素性股骨头坏死组。
 图 7 3 组髌关节滑膜组织中干扰素调节因子 4、干扰素调节因子 7 和干扰素-α 蛋白表达蛋白质印迹法检测结果

表 4 3 组髌关节滑膜组织中干扰素调节因子 4、干扰素调节因子 7 和干扰素-α 的蛋白相对表达量				
组别	样本量/例	干扰素调节因子 4($\bar{x} \pm s$)	干扰素调节因子 7($\bar{x} \pm s$)	干扰素-α($\bar{x} \pm s$)
股骨颈骨折组	3	0.517 ± 0.048	0.248 ± 0.007	0.464 ± 0.042
髌骨关节炎组	3	0.831 ± 0.023	0.577 ± 0.053	0.838 ± 0.063
激素性股骨头坏死组	3	1.552 ± 0.026	1.351 ± 0.050	1.128 ± 0.072
F 值		177.188	30.552	239.296
P 值		0.000	0.001	0.000

3.4 SONFH 滑膜病变靶细胞检测结果

SONFH 组髋关节滑膜组织中 IRF7、钙黏附蛋白 11 (cadherin-11, CDH-11) 的蛋白相对表达量均高于股骨颈骨折组和髋骨关节炎组 ($P=0.001, P=0.000; P=0.000, P=0.001$), 髋骨关节炎组髋关节滑膜组织中 IRF7、CDH-11 的蛋白相对表达量高于股骨颈骨折组 ($P=0.001, P=0.000$)。见图 8、表 5。滑膜成纤维细胞为 SONFH 滑膜病变的靶细胞。

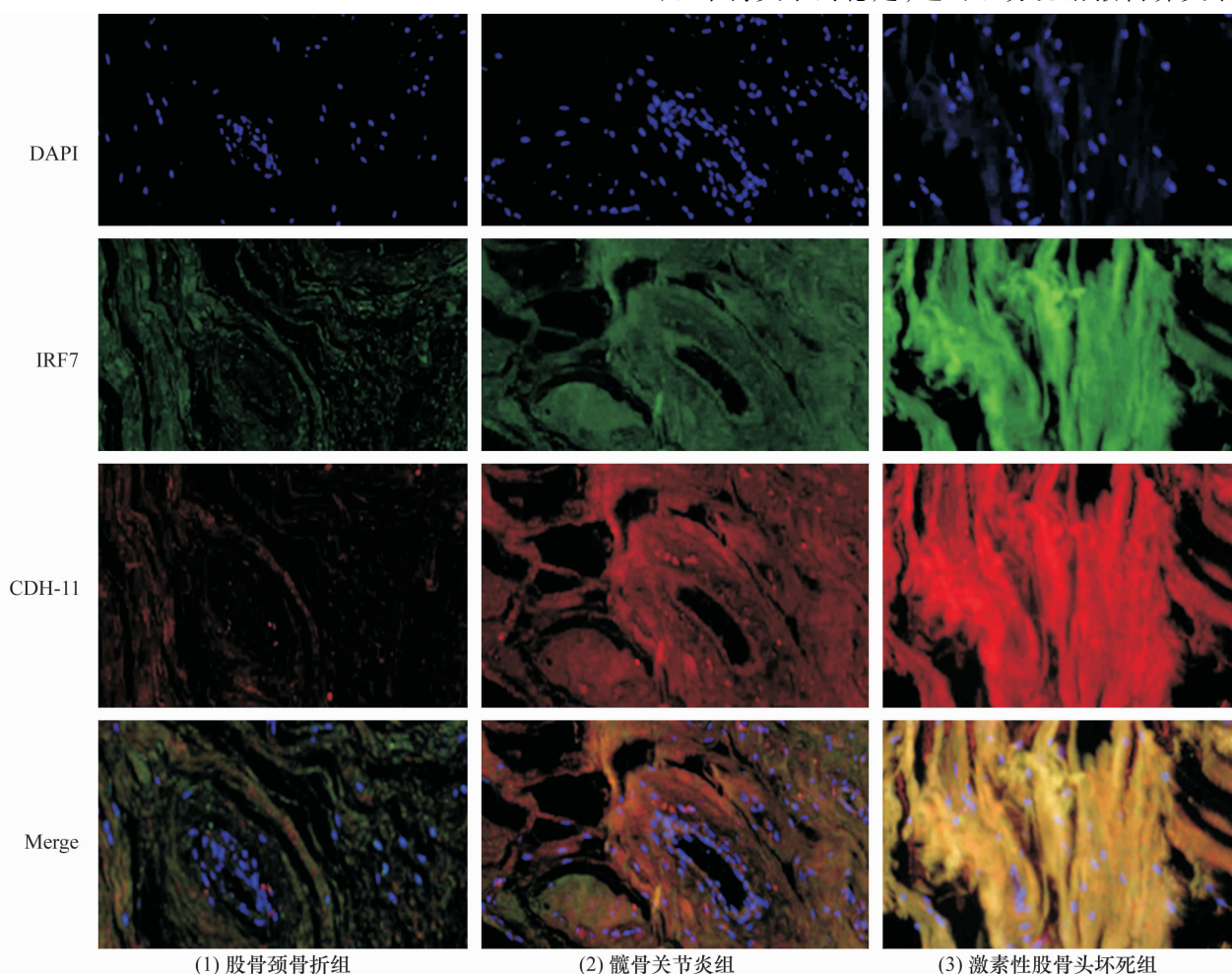
3.5 细胞验证结果

实时定量 PCR 引物序列见表 6。模型细胞组 IRF4、IRF7、IFN- α 的 mRNA 和蛋白相对表达量均高

于空白细胞组 ($P=0.001, P=0.002, P=0.000; P=0.001, P=0.007, P=0.000$)。见表 7、表 8、图 9。

4 讨论

糖皮质激素具有很强的抗炎和免疫抑制作用, 广泛应用于临床^[7]。然而, 糖皮质激素可引起骨质疏松和骨坏死等并发症^[8-9]。长期或大剂量应用糖皮质激素是非创伤性股骨头坏死最常见的风险^[10]。SONFH 可导致患者严重残疾且发病率逐年升高, 最终需进行人工髋关节置换手术, 给患者和社会带来沉重的经济负担^[11]。滑膜对于关节非常重要, 它不仅



DAPI 为 4',6-二脒基-2 苯基吡啶, IRF7 为干扰素调节因子 7, CDH-11 为钙黏附蛋白 11。

图 8 3 组髋关节滑膜组织中干扰素调节因子 7 和钙黏附蛋白 11 免疫荧光染色结果

表 5 3 组髋关节滑膜组织中干扰素调节因子 7 和钙黏附蛋白 11 的蛋白相对表达量

组别	样本量/例	干扰素调节因子 7 ($\bar{x} \pm s$)	钙黏附蛋白 11 ($\bar{x} \pm s$)
股骨颈骨折组	3	1.000 \pm 0.062	1.000 \pm 0.038
髋骨关节炎组	3	1.950 \pm 0.081	1.359 \pm 0.065
激素性股骨头坏死组	3	2.586 \pm 0.137	1.833 \pm 0.246
<i>F</i> 值		65.589	82.779
<i>P</i> 值		0.000	0.001

表 6 大鼠滑膜成纤维细胞核心基因实时定量 PCR 引物序列

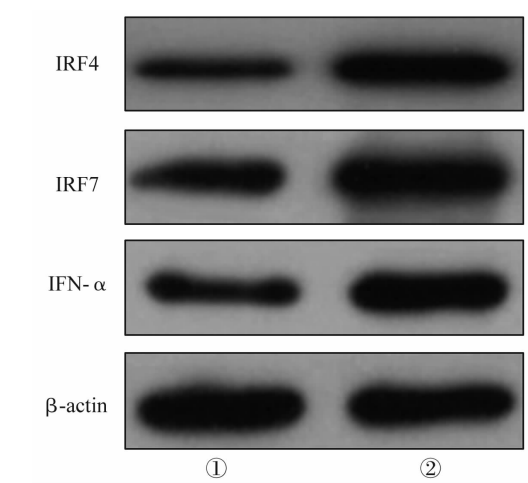
基因名称	上游引物序列(5' - 3')	下游引物序列(5' - 3')
干扰素调节因子 4	CTGTGTTTGTGCTGATGGTG	TCACTGTAGGAGCCCTGCTG
干扰素调节因子 7	CTTCAGCCCCAGAGACAGTG	CTCTGCTTTCACAGCCATCAC
干扰素-α	CCTGTGTGATGCAGGAACC	TCACCTCCCAGGCACTGA
甘油醛-3-磷酸脱氢酶	GGTGATGCTGGTGTGAGTA	GGAGATGATGACCCTTTTGCC

表 7 2 组大鼠滑膜成纤维细胞中干扰素调节因子 4、干扰素调节因子 7 和干扰素-α 的 mRNA 相对表达量

组别	样本量/孔	干扰素调节因子 4($\bar{x} \pm s$)	干扰素调节因子 7($\bar{x} \pm s$)	干扰素-α($\bar{x} \pm s$)
空白细胞组	3	0.520 ± 0.051	0.514 ± 0.027	0.629 ± 0.091
模型细胞组	3	1.469 ± 0.055	1.556 ± 0.134	1.488 ± 0.031
<i>t</i> 值		-12.594	-7.604	-8.896
<i>P</i> 值		0.001	0.002	0.000

表 8 2 组大鼠滑膜成纤维细胞中干扰素调节因子 4、干扰素调节因子 7 和干扰素-α 的蛋白相对表达量

组别	样本量/孔	干扰素调节因子 4($\bar{x} \pm s$)	干扰素调节因子 7($\bar{x} \pm s$)	干扰素-α($\bar{x} \pm s$)
空白细胞组	3	0.560 ± 0.047	0.403 ± 0.038	0.577 ± 0.051
模型细胞组	3	1.190 ± 0.108	0.920 ± 0.170	1.126 ± 0.025
<i>t</i> 值		-9.289	-5.138	-16.668
<i>P</i> 值		0.001	0.007	0.000



IRF4 为干扰素调节因子 4, IRF7 为干扰素调节因子 7, IFN-α 为干扰素-α, β-actin 为 β-肌动蛋白, ①为空白细胞组, ②为模型细胞组。

图 9 2 组大鼠滑膜成纤维细胞中干扰素调节因子 4、干扰素调节因子 7 和干扰素-α 蛋白表达蛋白质印迹法检测结果

骨^[12]。滑膜组织能引起关节腔内局部免疫反应,在关节退化中起到关键作用^[13]。滑膜成纤维细胞可分泌白细胞介素-6、趋化因子和促血管生成因子,加剧炎症和破骨细胞分化^[14]。我们在临床手术中发现,与髋骨关节炎和股骨颈骨折患者相比,SONFH 患者髋关节滑膜的增生与充血更加明显。转录组测序也

发现,SONFH 患者髋关节滑膜的基因表达与髋骨关节炎和股骨颈骨折患者存在明显差异,这说明 SONFH 滑膜病变发生的病理机制与其他两种疾病可能完全不同。ONFH 会导致关节周围骨坏死和股骨头软骨退变,最终导致关节塌陷和退行性关节炎。为筛选出 SONFH 滑膜病变的相关基因,避免股骨头软骨退变对研究结果的影响,我们纳入髋骨关节炎患者的髋关节滑膜样本作为对照。

本研究发现,SONFH 滑膜病变相关基因与 I 型干扰素信号通路及免疫反应关系密切,基因产物在执行功能时与细胞外泌体关系密切。I 型干扰素信号通路是 SONFH 滑膜病变与免疫炎症反应之间的一个关键通路。干扰素与先天性免疫系统和适应性免疫系统都存在密切联系^[15]。干扰素失调可引发一系列免疫反应,最终导致广泛和局部的炎症^[16]。I 型干扰素信号参与调控细胞代谢、增殖、凋亡和适应性免疫应答,能够诱导大量炎症因子和趋化因子的释放,对组织造成损害^[17]。IFN-α 是一种经典的 I 型干扰素,由干扰素调节因子家族成员转录后释放。外泌体来自多囊体与质膜的融合,在形态上有别于较大的分泌型中微粒^[18]。外泌体含有 mRNA、microRNA 和蛋白质,与多种疾病的发病机制有关,在抗原表达、炎症

形成、血管生成和细胞信号传导中发挥重要作用^[19]。SONFH 的滑膜病变主要以免疫炎症浸润为特征,而滑膜细胞外泌体可能参与其中。

IRF4、IRF7 是 I 型干扰素转录因子,它们能够诱导 I 型干扰素反应^[20]。IRF4、IRF7 是 SONFH 滑膜病变的核心基因。IRF4 在 I 型干扰素产生、Toll 样受体信号传导和辅助性 T 细胞分化中起着关键作用^[21-23]。IRF7 是 I 型干扰素基因表达的关键调节因子^[24],可在免疫细胞的分化和增殖以及炎症因子分泌方面发挥关键作用^[25-27]。IRF7 由包括滑膜成纤维细胞在内的多种细胞分泌,可能在 SONFH 滑膜病变中的作用更加显著。Tateda 等^[28]研究发现,抑制 IRF7 的活性可显著降低 SONFH 的严重程度。CDH-11 是滑膜成纤维细胞的特异性标志物,CDH-11 在 SONFH 髋关节滑膜中高表达,说明滑膜成纤维细胞可能是 SONFH 滑膜病变的靶细胞。

本研究结果表明,SONFH 滑膜病变与免疫炎症反应关系密切,滑膜成纤维细胞可能是 SONFH 滑膜病变的靶细胞,IRF4 和 IRF7 可能是其潜在的靶点。

参考文献

- [1] JIN H, LI L, YU W, et al. The efficacy of acupuncture and moxibustion for early and middle-stage osteonecrosis of the femoral head: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2021, 100(22): e26210.
- [2] HOPKINS C, GENANT H K. Editorial for guidelines for clinical diagnosis and treatment of osteonecrosis of the femoral head in adults (2019 version) [J]. *J Orthop Translat*, 2020, 21: A1.
- [3] ATILLA B, BAKIRCIOGLU S, SHOPE A J, et al. Joint-preserving procedures for osteonecrosis of the femoral head [J]. *EFORT Open Rev*, 2020, 4(12): 647-658.
- [4] HATANAKA H, MOTOMURA G, IKEMURA S, et al. Volume of hip synovitis detected on contrast-enhanced magnetic resonance imaging is associated with disease severity after collapse in osteonecrosis of the femoral head [J]. *Skeletal Radiol*, 2019, 48(8): 1193-1200.
- [5] RABQUER B J, TAN G J, SHAHEEN P J, et al. Synovial inflammation in patients with osteonecrosis of the femoral head [J]. *Clin Transl Sci*, 2009, 2(4): 273-278.
- [6] KORNICKA-GARBOWSKA K, GROBORZ S, LYNDY B, et al. Mitochondria transfer restores fibroblasts-like synovio-
- cytes (FLS) plasticity in LPS-induced, in vitro synovitis model [J]. *Cell Commun Signal*, 2022, 20(1): 137.
- [7] CRUZ-TOPE D, CIDLOWSKI J A. One hormone, two actions: anti-and pro-inflammatory effects of glucocorticoids [J]. *Neuroimmunomodulation*, 2015, 22(1/2): 20-32.
- [8] HMAMOUCI I, PARUK F, TABRA S, et al. Prevalence of glucocorticoid-induced osteoporosis among rheumatology patients in Africa: a systematic review and meta-analysis [J]. *Arch Osteoporos*, 2023, 18(1): 59.
- [9] PAVELKA K. Osteonecrosis [J]. *Baillieres best pract res clin rheumatol*, 2000, 14(2): 399-414.
- [10] YOON B H, JONES L C, CHEN C H, et al. Etiologic classification criteria of arthro femoral head osteonecrosis part 1: glucocorticoid-associated osteonecrosis [J]. *J Arthroplasty*, 2019, 34(1): 163-168.
- [11] MONT M A, ZYWIEL M G, MARKER D R, et al. The natural history of untreated asymptomatic osteonecrosis of the femoral head: a systematic literature review [J]. *J Bone Joint Surg Am*, 2010, 92(12): 2165-2170.
- [12] PAP T, DANKBAR B, WEHMEYER C, et al. Synovial fibroblasts and articular tissue remodelling: role and mechanisms [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2020, 101: 140-145.
- [13] DE LANGE-BROKAAR B J, IOAN-FACSINAY A, VAN OSCH G J, et al. Synovial inflammation, immune cells and their cytokines in osteoarthritis: a review [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2012, 20(12): 1484-1499.
- [14] PENG Y, ZHANG M, HU J. Non-coding RNAs involved in fibroblast-like synoviocyte functioning in arthritis rheumatoid: from pathogenesis to therapy [J]. *Cytokine*, 2024, 173: 156418.
- [15] OKAZAKI S, NISHITANI Y, NAGOYA S, et al. Femoral head osteonecrosis can be caused by disruption of the systemic immune response via the Toll-like receptor 4 signaling pathway [J]. *Rheumatology (Oxford)*, 2009, 48(3): 227-232.
- [16] THOMPSON C D, MATTA B, BARNES B J. therapeutic targeting of IRFs: pathway-dependence or structure-based? [J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 2622.
- [17] DURBIN R K, KOTENKO S V, DURBIN J E. Interferon induction and function at the mucosal surface [J]. *Immunol Rev*, 2013, 255(1): 25-39.
- [18] HE C, ZHENG S, LUO Y, et al. Exosome theranostics: biology and translational medicine [J]. *Theranostics*, 2018, 8(1): 237-255.

- 骨科杂志, 2020, 40(20): 1365 - 1376.
- [8] YOON B H, MONT M A, KOO K H, et al. The 2019 revised version of association research circulation osseous staging system of osteonecrosis of the femoral head[J]. J Arthroplasty, 2020, 35(4): 933 - 940.
- [9] SUGANO N, ATSUMI T, OHZONO K, et al. The 2001 revised criteria for diagnosis, classification, and staging of idiopathic osteonecrosis of the femoral head[J]. J Orthop Sci, 2002, 7(5): 601 - 605.
- [10] 魏秋实, 何伟, 张庆文, 等. 围塌陷期股骨头坏死不同影像学表现研究[J]. 中国修复重建外科杂志, 2021, 35(9): 1105 - 1110.
- [11] 张洪, 邹吉扬, 肖凯. 髋关节外科脱位——髋关节内手术的基本手术入路[J]. 中华外科杂志, 2014, 52(12): 915 - 918.
- [12] 雷志强, 曾平, 罗钧. 髋关节外科脱位治疗股骨头坏死的研究进展[J]. 广西医学, 2020, 42(4): 474 - 476.
- [13] 陈方, 刘修齐, 邓钰泓, 等. 髋外科脱位灯泡技术治疗早期股骨头坏死[J]. 中国矫形外科杂志, 2021, 29(13): 1219 - 1221.
- [14] 庄至坤, 吴昭克, 谢庆华, 等. 中药联合经髋关节外科脱位入路打压植骨支撑术治疗中青年 ARCO III 期股骨头坏死 22 例[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2017, 25(11): 46 - 48.
- [15] 盛东, 宋琼, 张庆文, 等. 经髋关节外科脱位入路自体髂骨瓣打压植骨治疗中青年 ARCO II、III 期股骨头缺血性坏死[J]. 中国骨与关节损伤杂志, 2021, 36(2): 153 - 155.
- [16] 郑萍, 李炜明, 翁绳健, 等. 髋关节外科脱位技术联合手术治疗股骨头坏死的中短期疗效观察[J]. 中国骨与关节损伤杂志, 2020, 35(2): 148 - 150.
- [17] 吴泽文, 张延伟, 谢家辉, 等. 脱位头颈开窗植骨术治疗围塌陷期股骨头坏死的疗效及随访影像学结果分析[J]. 河北医学, 2020, 26(3): 498 - 502.
- [18] 孙海忠, 韦标方. 髋关节外科脱位打压植骨术与髓芯减压支撑植骨术治疗 ARCO III 期股骨头缺血性坏死疗效比较[J]. 中国修复重建外科杂志, 2019, 33(5): 531 - 536.
- [19] 傅维民, 刘保一, 王本杰, 等. 激素性股骨头坏死的保髋治疗策略及疗效[J]. 中华骨科杂志, 2019, 39(23): 1424 - 1431.
- [20] 王春生, 蒋武强, 张栓平, 等. 无症状股骨头坏死病情进展及相关因素分析[J]. 中华外科杂志, 2019, 57(11): 807 - 811.
- [21] 欧阳飞, 陈瑜, 石磊. 股骨头坏死非手术治疗研究进展[J]. 国际骨科学杂志, 2024, 45(1): 15 - 18.
- [22] 黄泽青, 刘予豪, 方汉军, 等. 基于深度迁移学习模型实现股骨头坏死与其他髋部疾病的 X 线片鉴别诊断[J]. 中华骨科杂志, 2023, 43(1): 72 - 80.
- [23] 陈浩, 薛鹏, 席洪钟, 等. 基于 DR 的深度学习模型预测非血管化腓骨移植术的保髋疗效[J]. 临床放射学杂志, 2024, 43(7): 1170 - 1175.
- [24] 周宇东, 马小雨, 蔡兴博, 等. 人工智能在股骨头坏死诊疗中的应用与展望[J]. 云南医药, 2024, 45(2): 70 - 72.

(收稿日期: 2024-05-03 本文编辑: 时红磊)

(上接第 58 页)

- [19] NOONIN C, THONGBOONKERD V. Exosome-inflammasome crosstalk and their roles in inflammatory responses[J]. Theranostics, 2021, 11(9): 4436 - 4451.
- [20] JEFFERIES C A. Regulating IRFs in IFN driven disease[J]. Front Immunol, 2019, 10: 325.
- [21] TAMURA T, YANAI H, SAVITSKY D, et al. The IRF family transcription factors in immunity and oncogenesis[J]. Annu Rev Immunol, 2008, 26: 535 - 584.
- [22] LOHOFF M, MAK T W. Roles of interferon-regulatory factors in T-helper-cell differentiation[J]. Nat Rev Immunol, 2005, 5(2): 125 - 135.
- [23] CHUNG Y, CHANG S H, MARTINEZ G J, et al. Critical regulation of early Th17 cell differentiation by interleukin-1 signaling[J]. Immunity, 2009, 30(4): 576 - 587.
- [24] SHARMA S, TENOEVER B R, GRANDVAUX N, et al. Triggering the interferon antiviral response through an IKK-related pathway[J]. Science, 2003, 300(5622): 1148 - 1151.
- [25] HONDA K, YANAI H, NEGISHI H, et al. IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses[J]. Nature, 2005, 434(7034): 772 - 777.
- [26] VAN BON L, COSSU M, RADSTAKE T R. An update on an immune system that goes awry in systemic sclerosis[J]. Curr Opin Rheumatol, 2011, 23(6): 505 - 510.
- [27] SIMONS K H, DE VRIES M R, DE JONG R C M, et al. IRF3 and IRF7 mediate neovascularization via inflammatory cytokines[J]. J Cell Mol Med, 2019, 23(6): 3888 - 3896.
- [28] TATEDA K, OKAZAKI S, NAGOYA S, et al. The suppression of TRIM21 and the accumulation of IFN- α play crucial roles in the pathogenesis of osteonecrosis of the femoral head[J]. Lab Invest, 2012, 92(9): 1318 - 1329.

(收稿日期: 2024-04-09 本文编辑: 杨雅)