

利用机器学习鉴定并验证骨关节炎中潜在的双硫死亡相关基因

余辉^{1*}, 任明星¹, 杨生^{1,2,3#}

¹重庆医科大学口腔医学院, 重庆

²重庆市口腔疾病与生物医学重点实验室, 重庆

³重庆市高等教育口腔生物医学工程市级重点实验室, 重庆

收稿日期: 2024年3月17日; 录用日期: 2024年4月11日; 发布日期: 2024年4月17日

摘要

骨关节炎(Osteoarthritis, OA)是一种普遍影响中老年人群的慢性炎性疾病, 其典型表现为软骨退行性变、关节炎以及功能受损。面对目前缺乏有效治疗手段的现状, 迫切需要更为全面的理论指导。双硫死亡, 作为一种新近发现的细胞死亡方式, 在多种疾病中均有涉及, 其与骨关节炎的关联尚未明确。本研究基于已报道的双硫死亡相关基因, 运用GEO数据库中的三组数据集(GSE55235, GSE55457, GSE82107), 采用多元机器学习技术将骨关节炎分为两种亚型。研究识别出九个潜在的双硫死亡相关关键差异表达基因(hubDEGs), 其中APOD、EDNRB、FOXC2、JUN、LRCH1和MAFF在骨关节炎患者中呈下调趋势, 而NUDT1、PNMAL1和ZNF668则呈上调趋势。深入探究发现, 这些hubDEGs与骨关节炎中免疫细胞浸润的变化密切相关, 主要表现为嗜酸细胞和Th2细胞浸润的减少, 以及iDC、巨噬细胞、NK细胞、Treg细胞、Tfh细胞和Th1细胞浸润的增加。利用GSE89408作为独立验证数据集, 结合qRT-PCR实验验证了这九个基因在双硫死亡与骨关节炎关联中的关键作用。此外, 本研究还构建了一个TF-mRNA-miRNA网络, 鉴定出可能的干预靶点, 包括CTCF、SP1、hsa-miR-29和hsa-miR-424。这项研究首次揭示了骨关节炎与双硫死亡之间的潜在联系, 并识别出参与骨关节炎中双硫死亡过程的关键基因和靶点, 为骨关节炎的临床诊断和治疗提供了新颖视角。

关键词

双硫死亡, 骨关节炎, 机器学习, 免疫

Identification and Validation of Disulfidptosis-Related Genes in Osteoarthritis by Machine Learning

Hui She^{1*}, Mingxing Ren¹, Sheng Yang^{1,2,3#}

*第一作者。

#通讯作者。

¹College of Stomatology, Chongqing Medical University, Chongqing

²Chongqing Key Laboratory of Oral Diseases and Biomedical Sciences, Chongqing

³Chongqing Municipal Key Laboratory of Oral Biomedical Engineering of Higher Education, Chongqing

Received: Mar. 17th, 2024; accepted: Apr. 11th, 2024; published: Apr. 17th, 2024

Abstract

Osteoarthritis (OA) is a chronic inflammatory disease that afflicts a large population of middle-aged people, manifesting as cartilage degeneration, joint inflammation, and functional impairment. Currently, effective therapeutic interventions are lacking, which calls for more comprehensive theoretical guidance. Disulfidptosis, a newly discovered form of cell death implicated in various diseases, may be related to OA, but this has not been explored before. Based on previously reported disulfidptosis-related genes, this study used three datasets from the GEO database (GSE55235, GSE55457, GSE82107) and applied various machine learning methods to classify OA into two subtypes. Nine potential disulfidptosis-related hub of Differentially Expressed Genes (hubDEGs) were identified, among which APOD, EDNRB, FOXC2, JUN, LRCH1, and MAFF were down-regulated, and NUDT1, PNMAL1, and ZNF668 were up-regulated. Further exploration revealed that hubDEGs were associated with altered immune cell infiltration in OA, marked by decreased infiltration of eosinophils and Th2 cells, and increased infiltration of iDC, macrophages, NK cells, Treg cells, Tfh cells, and Th1 cells. GSE89408, as an independent dataset, and qRT-PCR confirmed the critical role of these nine genes in the association between disulfidptosis and OA. Moreover, a TF-mRNA-miRNA network was constructed, identifying potential intervention targets, such as CTCF, SP1, hsa-miR-29, and hsa-miR-424. This study is the first to reveal a possible link between OA and disulfidptosis, and to uncover key genes and targets involved in disulfidptosis in OA, providing novel insights for the clinical diagnosis and treatment of OA.

Keywords

Disulfidptosis, Osteoarthritis, Machine Learning, Immune Infiltration

Copyright © 2024 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

骨关节炎(Osteoarthritis, OA)是一种以软骨退化、骨赘形成、滑膜炎症等为病理特征并导致关节结构和功能的损害,引起关节疼痛、僵硬、活动受限和畸形的退行性疾病。其受多种因素影响,如年龄、性别、遗传、体重、运动、创伤等[1][2]。2019年,全球有5.28亿骨关节炎患者,其中73%超过55岁[3]。随着人口老龄化,骨关节炎将对更多老年人的生活质量和社会医疗服务造成更大负担。然而现有的治疗方法主要是缓解症状、减轻炎症、保护关节和改善功能,不能逆转或阻止软骨的损失[4]。骨关节炎的发生与炎症环境下以软骨细胞为代表的多种细胞损伤和死亡密切相关,然而骨关节炎中细胞的死亡方式及其与免疫的关系尚不明确,迫切需要完善的骨关节炎病理机制来指引潜在的治疗方向。

目前,已发现细胞焦亡[5][6]、铁死亡[7][8]、铜死亡[9]等细胞死亡与骨关节炎的相关性,他们主要依赖于ROS来影响骨关节炎。然而,最近有报道表明乳酸盐作为代谢物通过将葡萄糖代谢分流到戊糖磷

酸途径来增加还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH)水平, 并且作为信号传导分子通过人软骨细胞中的受体 HCARI 激活 PI3K/Akt 信号传导途径来上调 NADPH 氧化酶 4 (NOX4)从而促进软骨细胞凋亡及软骨基质降解[10]。还发现胱氨酸水平与骨关节炎的严重程度呈正相关[11], 其通过半胱氨酸/GSH/GPX 4 (磷脂过氧化氢谷胱甘肽过氧化物酶)轴诱导软骨损伤[8]。S. Lambrecht, M. Pharm 等人还在骨关节炎患者的关节软骨细胞中观察到了波形蛋白细胞骨架的实质性改变[12]。这些特征提示了骨关节炎与一种新的细胞死亡方式——双硫死亡的联系。

双硫死亡是一种在葡萄糖匮乏状态下迅速耗竭, 导致无法被还原为半胱氨酸的胱氨酸等二硫化物异常积累[13], 从而诱发二硫化物应激导致细胞死亡的新方式, 其机制与肌动蛋白细胞骨架、细胞伪足等高度相关[14]。然而, 关于骨关节炎中的双硫死亡理论尚为空白, 需要进一步的探索。

在本研究中, 我们首次利用机器学习的方法筛选出骨关节炎中与双硫死亡相关的关键生物标志物并结合结果探讨了其影响骨关节炎的可能途径, 也初步探索了这些生物标志物同免疫浸润的可能联系。同时利用验证集及 qRT-PCR 初步证明了结果的可靠性, 还通过构建 TF-mRNA-miRNA 网络预测了潜在的调控靶点。这些结论可能揭示了骨关节炎与双硫死亡之间的联系, 并将为骨关节炎的临床诊疗提供一种新的独特视角。

2. 材料与方法

2.1. 相关基因数据来源

从 Gene Expression Omnibus (GEO)数据库中下载原始数据 GSE55235 [15]、GSE55457 [15]、GSE82107 [16]、GSE89408 [17]。其中, GSE55235 芯片数据包含 10 个骨关节炎样本和 10 个对照样本, GSE55457 芯片数据包含 10 个骨关节炎样本和 10 个对照样本, GSE82107 芯片数据包含 10 个骨关节炎样本和 7 个对照样本。GSE55235 和 GSE55457 数据集在 GPL96 平台上测序, GSE82107 则在 GPL570 平台上测序(表 1)。对上述三个数据集使用 R 包“sva” [18]和“limma” [19]进行合并并去除批次效应, 得到了包含 30 个骨关节炎样本和 27 个对照样本的整合数据集(NewGSE)。GSE89408 中包含 22 个骨关节炎样本和 28 个对照样本, 其将作为验证集以验证分析结果的可靠性。

Table 1. Original data sets

表 1. 原始数据集

资料编号	平台信息	骨关节炎组	对照组	物种
GSE55235	GPL96	10	10	智人
GSE55457	GPL96	10	10	智人
GSE82107	GPL570	10	7	智人
GSE89408	GPL11154	22	28	智人

双硫死亡相关基因(Disulfidptosis-Related Genes, DSRG)由 Liu 等人[14]在近期提出, 在我们的研究中, 纳入了 12 个 DSRG, 包括 SLC7A11、SLC3A2、RPN1、NCKAP1、WASF2、RAC1、NUBPL、NDUFA11、LRPPRC、OXSM、NDUFS1、GYS1。

2.2. 主成分分析(Principal Components Analysis, PCA) [20]

主成分分析是一种多变量数据降维和可视化方法, 用于揭示数据中的模式和关系。我们分别使用了合并前后的数据集矩阵用于执行 PCA。PCA 是通过 R 包“FactoMineR” [21]来进行的, 该分析计算了数

据中的主成分。生成 PCA 图时使用了 R 包“factoextra”的函数，帮助我们理解样本之间的相似性和差异性。

2.3. 基于 DSRGs 的骨关节炎亚型鉴定

无监督聚类是一种用于发现数据内部模式和结构的分析方法。使用 R 中的“ConsensusClusterPlus”包[22]来执行无监督聚类分析，这个包通过多次对数据进行随机重采样和聚类来确定最佳的聚类数目，参数设置为 $\text{maxK}=9$, $\text{reps}=50$, $\text{pItem}=0.8$, $\text{pFeature}=1$, $\text{clusterAlg}=\text{"pam"}$, $\text{distance}=\text{"euclidean"}$, $\text{seed}=123456$ 。最佳聚类结果基于 DSRG，这些基因在聚类分析中用于识别样本之间的相似性和差异性。DSRGs 的选择是为了更好地捕捉骨关节炎样本之间的分型特征，从而划分骨关节炎亚型。

2.4. 双硫死亡亚型间的差异表达基因(SubDEGs)鉴定

使用整合数据集中的骨关节炎两亚型的样本，通过 limma 包进行差异基因分析，以识别不同亚型之间的差异表达基因。在分析过程中，我们设定了以下阈值： $|\log\text{FC}| > 0.5$ ，表示基因在不同条件之间的表达变化具有生物学上的显著性。调整后的 $p < 0.05$ ，用于控制多重检验的错误率，确保鉴定出的 SubDEGs 具有统计显著性。这些阈值的选择有助于筛选出最具有生物学意义的差异表达基因。利用“ggplot2”包[23]绘制火山图和“pheatmap”包作出热图用于显示差异基因表达的结果。

2.5. 双硫死亡相关差异表达基因(DSR-DEGs)鉴定

具体分析代码参数同“SubDEG”。使用“limma”包进行，以确定整合数据集中骨关节炎样本和对照样本之间的差异表达基因(DEG)，以研究 DSRGs 的表达水平对骨关节炎的影响。再将 DEGs 与 SubDEGs 取交集即可得到 DSR-DEGs。

2.6. 基因集变异分析(Gene Set Variation Analysis, GSEA) [24]

使用 R 包“GSEA”执行 GSEA 分析，用于评估基因集在不同样本或条件之间的变异性的方法，以揭示与生物学过程、通路或功能相关的差异。此处将聚类所得骨关节炎两亚型作为依据，结合 KEGG 及 Reactome 数据库[25]进行分析。 $|\log\text{FC}| > 0.1$ 且 $p < 0.05$ 的差异通路被认为是显著的，再利用“pheatmap”包作出热图。

2.7. GO (Gene Ontology) [26]功能富集分析

使用 R 包“clusterProfiler”[27]来执行 GO 功能富集分析，是一种用于识别基因集合中显著富集的生物学过程(BP)、细胞组分(CC)和分子功能(MF)的方法。从公共数据库或文献中获取基因注释数据，用于将基因与其对应的 GO 术语相关联。 $p < 0.05$ 被认为是显著富集的。

2.8. KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) [28]通路富集分析

使用 R 包“clusterProfiler”来执行 KEGG 通路富集分析。这个包提供了函数来确定基因集合中是否富集了与 KEGG 通路相关的生物通路。 $p < 0.05$ 被认为是显著富集。

2.9. 关键基因(hubDEGs)的筛选

特征基因的筛选是本研究中的关键步骤，用于识别与目标变量相关且最重要的基因。使用了三种不同的机器学习算法(LASSO 回归、随机森林、SVM 支持向量机)来进行特征基因的筛选。在 LASSO 回归中，使用了“kernlab”包[29]，通过 L1 范数正则化来减小模型中不重要的特征的系数；使用“randomForest”

包[30]进行随机森林计算,通过评估特征的重要性得分来确定哪些特征对预测任务最关键;利用“kernlab”包判断 SVM 的特征重要性或支持向量来确定哪些特征对分类任务最关键。最后再将三者的结果基因集取交集,得到 hubDEGs。使用受试者工作特征曲线(ROC)和曲线下面积(AUC)估计 hubDEGs 的诊断效力,且 $p < 0.05$ 被认为是显著的。

2.10. 细胞培养

使用 THP-1 细胞专用培养基(Procell, CM-0233)在 T25 培养瓶中培养 THP-1 细胞(Procell, CL-0233)至密度为 200 万细胞/ml、体积为 5 ml,将细胞接种于 12 孔板中,50 万细胞/孔,共 6 孔(对照组及骨关节炎组各 3 孔)。12 h 后加入 150 nM 的 PMA (Solarbio, P6741)诱导 24 h,使 THP-1 细胞分化为巨噬细胞,此后换液,在骨关节炎组中加入 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LPS (Sigma, L2880)刺激 24 h。收取细胞样品。

2.11. 实时荧光定量聚合酶链式反应(qRT-PCR)

从 THP-1 细胞中提取总 RNA,使用 RNAeasy™ Plus 动物 RNA 分离试剂盒带旋转柱(Beyotime, R0032),严格按照生产商的说明书操作。取 0.5 毫克 RNA,利用 PrimeScript RT Master Mix (TAKARA, RR036)进行逆转录,同样遵循生产商的指导。采用 TB Green Premix Ex Taq II (TAKARA, RR820L)进行 qRT-PCR,以检测 mRNA 表达。

2.12. 统计分析

研究中的所有统计分析均使用 R 软件(版本 4.3.0)进行。对于所有图:*表示 $p < 0.05$,**表示 $p < 0.01$,***表示 $p < 0.001$ 。

3. 结果

3.1. 利用 DSRGs 将骨关节炎分为 A、B 两种亚型

对整合数据集去批次前后的样本进行 PCA 主成分分析(图 1A-B)。

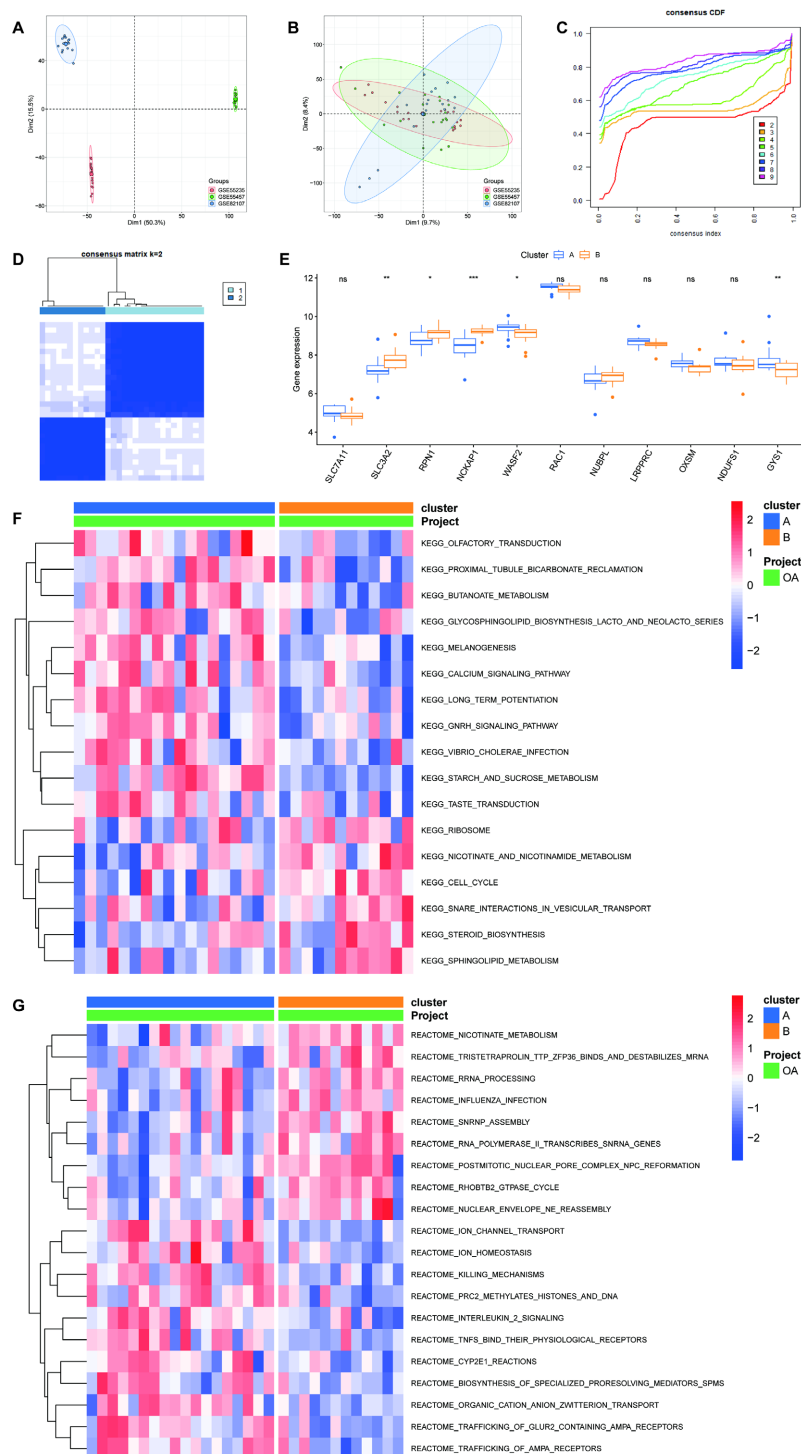
利用 DSRG,对 30 个骨关节炎样本进行无监督聚类,结果显示当骨关节炎被分为 2 种亚型时具有最佳的分类效果(图 1C-D),因此通过 DSRG 我们在骨关节炎中得到了与双硫死亡相关的 A、B 两种亚型。

对 A、B 两种亚型的骨关节炎,我们作出了 A、B 两亚型 DSRG 的表达差异可视化图,从结果中可以看到 SLC3A2、RPN1 和 NCKAP1 在 B 亚型中的表达显著高于 A 亚型;而 WASF2 和 GYS1 则是在 A 亚型中的表达显著高于 B 亚型(图 1E)。

使用 KEGG 及 Reactome 数据库,对 A、B 两亚型的所有基因进行 GSVA,这是一种非参数、无监督的算法,它可以反映出 A、B 两亚型之间基因表达模式更本质的不同,以帮助我们认识两亚型之间的生物学功能差异。在 KEGG 通路富集中,A 亚型主要集中于丁酸、淀粉和蔗糖代谢,钙信号通路,下丘脑分泌的促性腺激素释放激素(GnRH)信号通路等;B 亚型则主要看到在烟酸、烟酰胺以及细胞分裂相关功能等通路上的活跃(图 1F)。同 KEGG 相印证的是,在 Reactome 中,我们发现了类似的现象,即在 B 亚型中,烟酸、烟酰胺等代谢活动以及细胞分裂等相关活动有显著的增强;而在 A 亚型中,离子通道活跃了起来,与之相关联的 IL-2、TNF 受体等的信号介导及转导也得到了富集(图 1G)。

3.2. 各差异表达基因分析

为了筛选出与骨关节炎关系最为密切的,且与双硫死亡相关的关键基因。取 A、B 两亚型间及骨关节炎、对照间的差异表达基因交集。



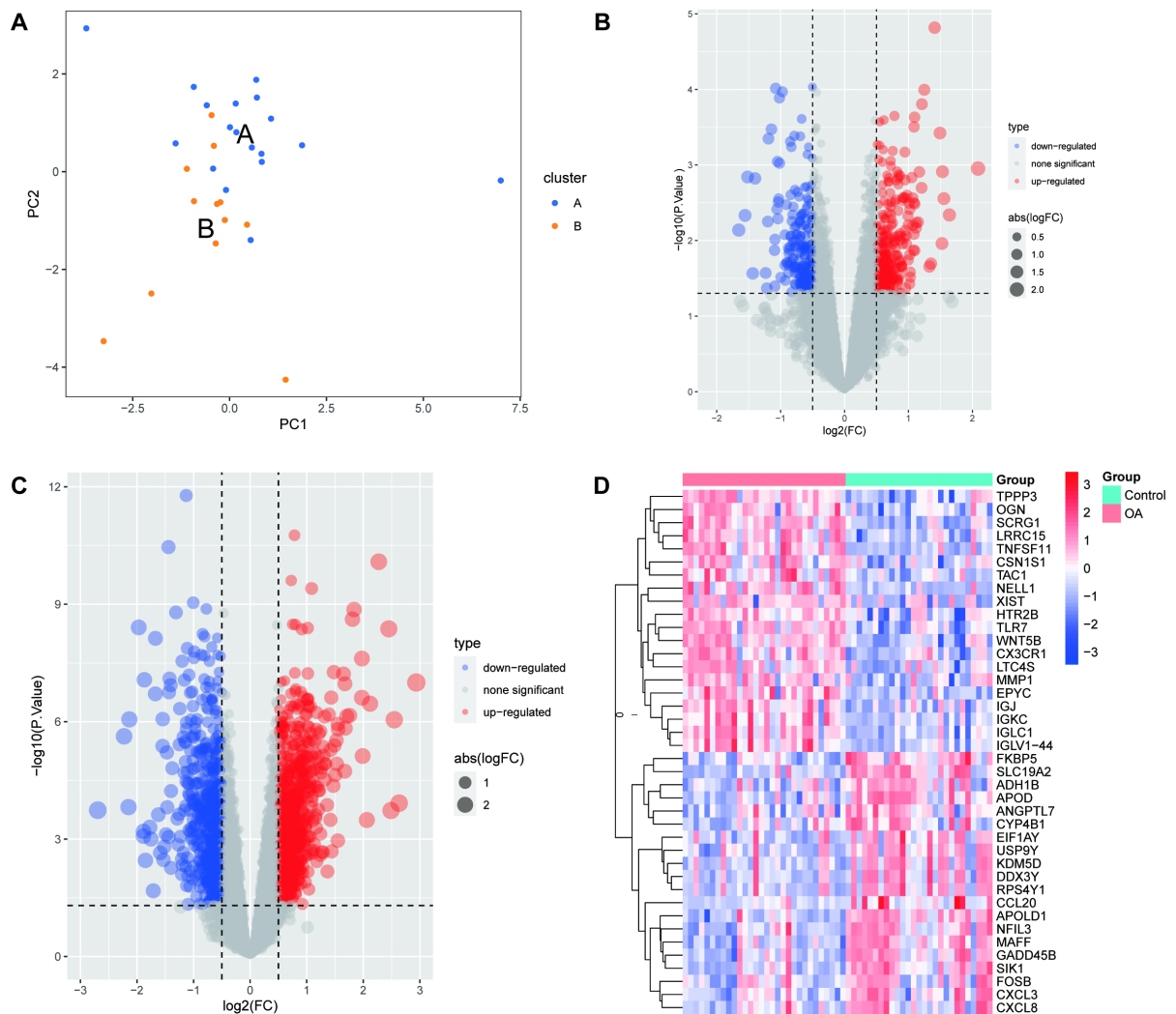
(A) 批效应移除前的 PCA 分析。(B) 批效应移除后的 PCA 分析。(C-D) 结合 DSRGs, 使用无监督聚类方法将骨关节炎分为两种亚型。(E) 骨关节炎患者 DSRGs 的总表达箱线图: 蓝色代表 A 亚型样本, 黄色代表 B 亚型样本, 水平轴表示基因, 垂直轴表示基因表达水平。(F) 结合 KEGG 数据库生成的 A 和 B 亚型的 GSVA 差异热图, 红色代表高表达, 蓝色代表低表达。(G) 结合 Reactome 数据库生成的 A 和 B 类群的 GSVA 差异热图, 红色代表高表达, 蓝色代表低表达。

Figure 1. Using DSRGs to divide OA into two subtypes A and B, moreover analyzing the differences in DSRGs and GSVA between the two

图 1. 利用 DSRGs 将骨关节炎分为 A、B 两种亚型, 并分析两者 DSRGs 和 GSVA 的差异

首先,通过PCA主成分分析的结果(图2A)可以看出,此前,我们通过DSRG利用“ConsensusClusterPlus”包将骨关节炎分为2种亚型的结果是较为可靠的。查看火山图结果(图2B)可得,在SubDEG中取交集可以得到471个差异基因。

为了对骨关节炎及对照组进行差异基因分析,以便同上述结果进行交叉分析。我们作出火山图(图2C),筛选出差异基因共3866个,再作出差异表达基因热图(图2D)展示出对照组与骨关节炎组前40个显著差异表达基因。



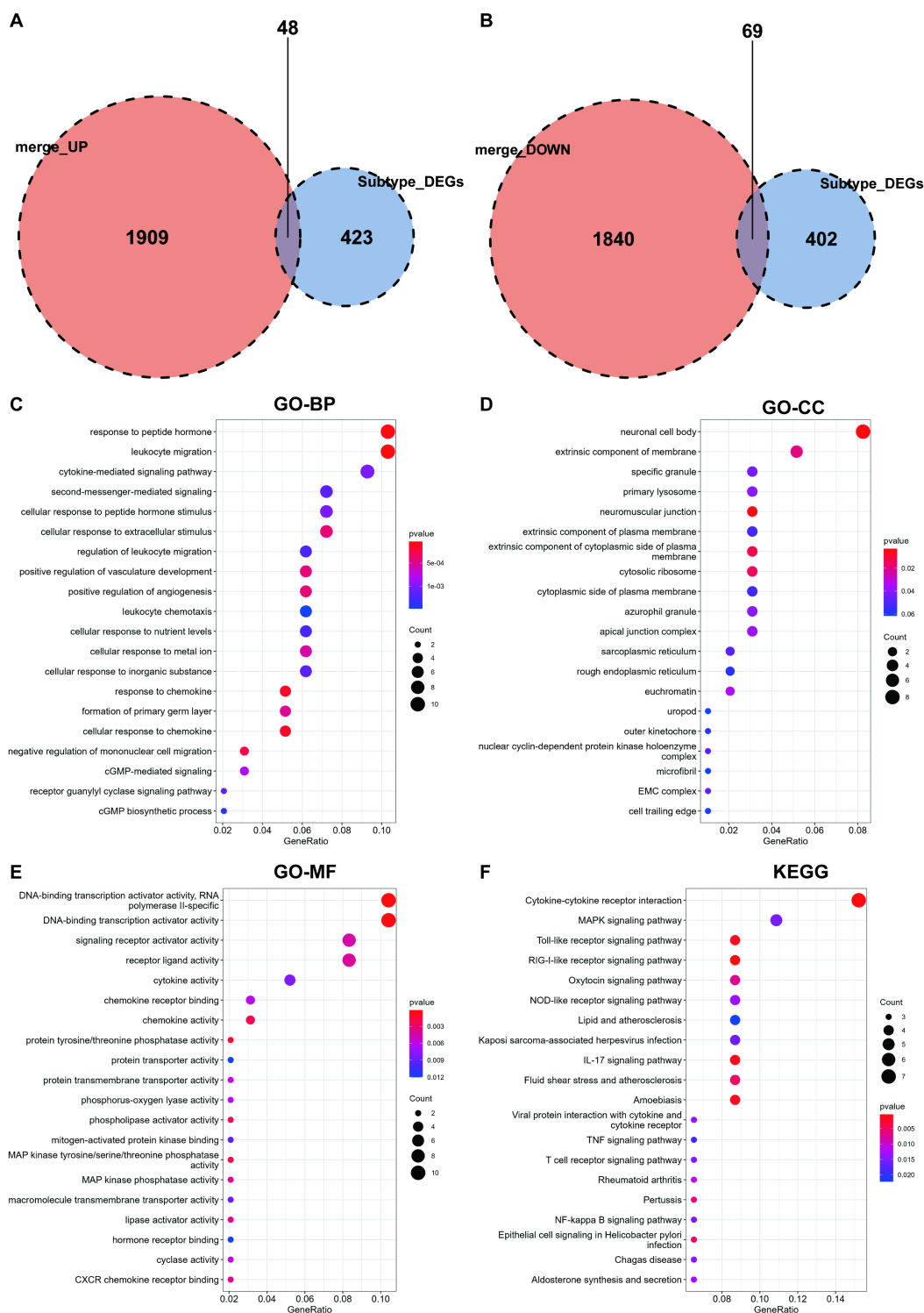
(A) 将训练集中骨关节炎组样本分为A和B亚型后的PCA分析, A亚型为蓝色, B亚型为黄色。(B) SubDEGs火山图,横坐标为 $\log_2\text{FoldChange}$,纵坐标为 $-\log_{10}$ (调整后P值)。红色节点表示上调的DEGs,蓝色节点表示下调的DEGs,灰色节点表示没有显著差异表达的基因。(C) DEGs火山图,横坐标为 $\log_2\text{FoldChange}$,纵坐标为 $-\log_{10}$ (调整后P值)。红色节点表示上调的DEGs,蓝色节点表示下调的DEGs,灰色节点表示没有显著差异表达的基因。(D) DEGs差异热图,红色代表高表达,蓝色代表低表达。

Figure 2. The analysis of differentially expressed genes between cluster A and B and between OA and Control

图 2. 不同差异表达基因在A和B亚型间以及骨关节炎与对照组间的分析

3.3. DSR-DEGs 分析

我们作出Venn图分别将DEG中上下调的基因同SubDEG作交集,获得48个上调基因及69个下调

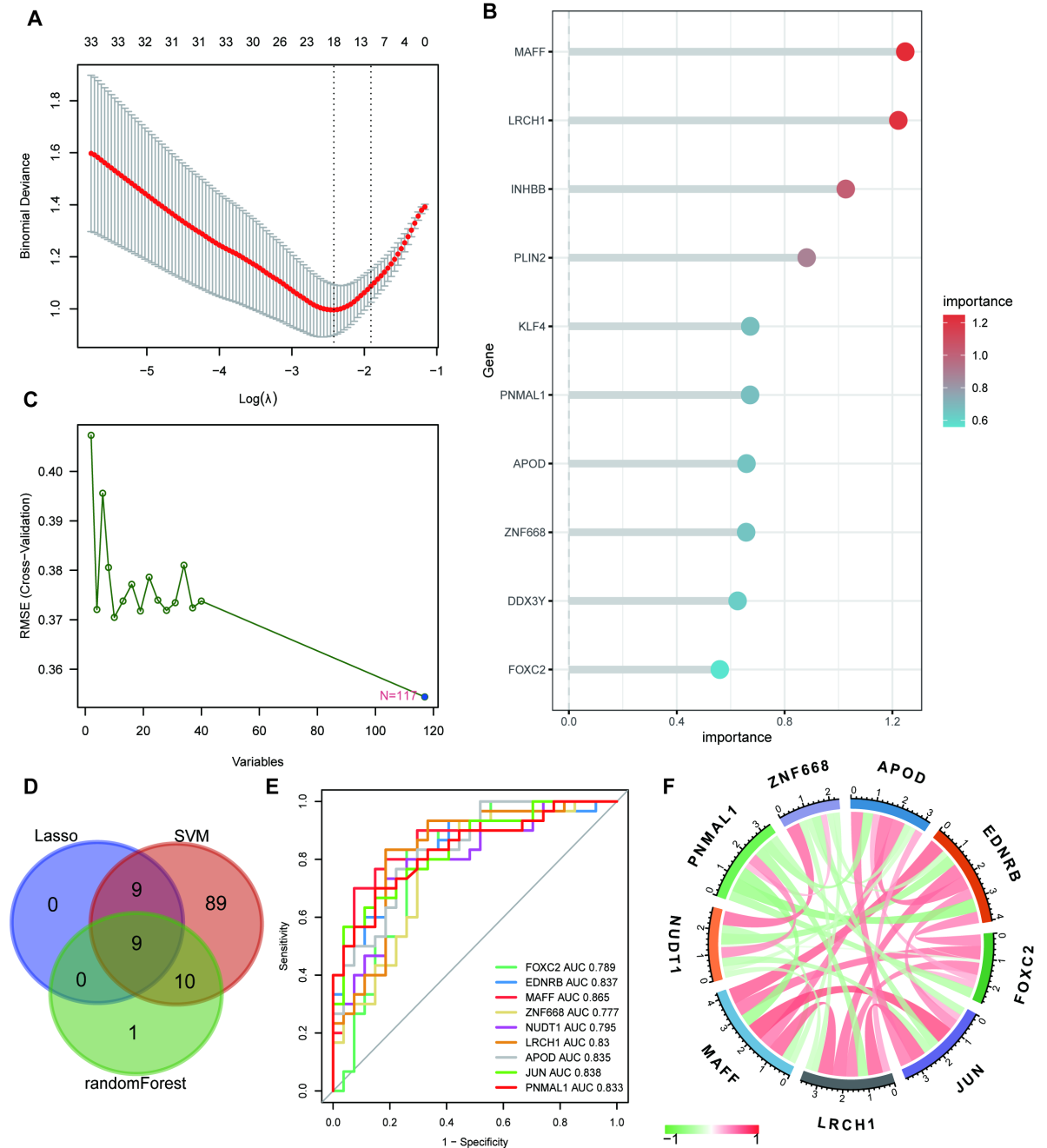


(A) SubDEGs 与上调 DEGs 的文氏图：蓝色代表 SubDEGs，黄色代表上调 DEGs。(B) SubDEGs 与下调 DEGs 的文氏图：蓝色代表 SubDEGs，黄色代表下调 DEGs。(C-E) GSEA-GO 分析：水平坐标是基因比例；垂直坐标显示 GO 术语；颜色表示 $-\log_{10}(p)$ 值；节点大小表示在 GO 术语中富集的基因数量。(F) GSEA-KEGG 分析：水平坐标是基因比例；垂直坐标显示 KEGG 途径；节点大小表示途径中富集的基因数量；节点颜色表示 $-\log_{10}(p)$ 值。

Figure 3. Enrichment analysis of SubDEGs
图 3. SubDEGs 的富集分析

基因(图 3A-B)。接下来, 利用这 117 个基因组成的 DSR-DEG 完成了 GO 及 KEGG 的富集分析, 以期找到骨关节炎中与双硫死亡相关的功能及通路差异。

从 GO 富集结果看, 在生物学过程中的差异主要体现在细胞迁移趋化及 cGMP 介导的信号转导及其生物合成中(图 3C); 在细胞组分中的差异则主要是神经肌肉接头、肌浆网、微纤维、单元后缘等与肌动



(A) 通过 LASSO 回归筛选差异表达的关键基因。(B) 骨关节炎患者 SubDEGs 特征的 RF 图。(C) 通过 SVM 筛选差异表达的关键基因。(D) hubDEGs 的文氏图: 蓝色代表 LASSO, 绿色代表 RF, 红色代表 SVM。(E) 9 个基因标志物在骨关节炎诊断中的 ROC 曲线。(F) 9 个 hubDEGs 每对之间的关系, 红色代表正相关, 绿色代表负相关。

Figure 4. Screening and validation of hubDEGs from SubDEGs using machine learning
图 4. 利用机器学习的方法, 从 SubDEGs 中筛选并验证 hubDEGs

蛋白细胞骨架相关的组分(图 3D);而在分子功能中,MAPK 信号通路与酪氨酸的代谢及 CXCR 趋化因子受体结合的富集(图 3E)。从 KEGG 富集分析结果上看,MAPK 信号通路、Toll 样受体信号通路、NOD 样受体信号通路、IL-17 信号通路、TNF 信号通路、NF- κ B 信号通路、类风湿关节炎、醛固酮合成分泌等的富集(图 3F)。

3.4. 利用机器学习筛选 hubDEGs

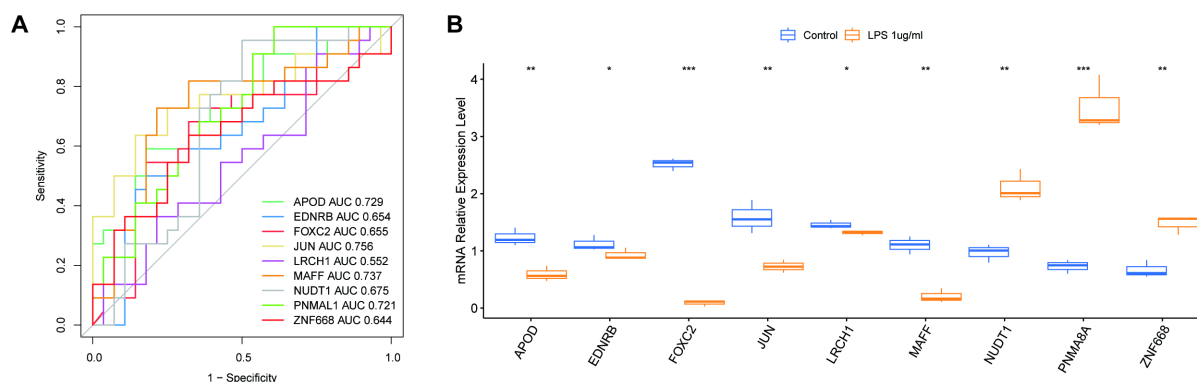
为了筛选出骨关节炎中与双硫死亡相关最为关键的基因,以便为骨关节炎理论及临床干预提供更精确的指导,我们将上述 117 个基因通过特征选择的三种机器学习方法进行筛选,再将三种方法筛选出来的结果取交集,得到 hubDEG。其结果如下,通过 LASSO 回归(图 4A)、随机森林(图 4B)、SVM 支持向量机(图 4C),分别得到 18 个、20 个(随机森林的前 20 结果,图中仅展示出前 10)、117 个,取交集,得到 9 个关键基因(图 4D),其中 APOD、EDNRB、FOXC2、JUN、LRCH1 和 MAFF 在骨关节炎患者中呈下调趋势,而 NUDT1、PNMAL1 和 ZNF668 则呈上调趋势。

我们还绘制了整合数据集中 9 个 hubDEGs 预测骨关节炎的 ROC 曲线(图 4E)。结果,这 9 个 hubDEGs 在预测骨关节炎方面表现出色。

同时,我们对 9 个基因之间的相关性作出了可视化,以便探索 hubDEGs 之间的联系(图 4F)。

3.5. HubDEGs 的验证

这些关键差异表达基因(hubDEGs)在骨关节炎中与双硫死亡至关重要。为了验证它们与骨关节炎的相关性,我们使用了一个外部数据集(GSE89408)作为验证集。9 个基因的 ROC 曲线分析表明其对骨关节炎预测能力较为出色,揭示了它们作为临床生物标志物诊断骨关节炎的潜力(图 5A)。我们还诱导了一个巨噬细胞(来自 THP-1 的分化)炎症细胞模型,qRT-PCR 结果显示,与对照组相比,hubDEGs 的 mRNA 表达水平在统计上显示出显著且与先前的分析结果一致的差异(图 5B)。



(A) 在骨关节炎诊断中 9 个基因标志物的 ROC 曲线。(B) 在 150nM PMA 诱导后, THP-1 细胞在 LPS 刚性作用 24 小时后,通过 qRT-PCR 测量的 hubDEGs 的 mRNA 相对表达水平(每组 n = 3)。

Figure 5. Validation of hubDEGs

图 5. 验证 hubDEGs

4. 讨论

骨关节炎是一种多发于中老年人群的以软骨退化、关节炎症和关节功能障碍为特征的炎性疾病,其严重影响患者的生活质量,且为社会带来较大负担[3]。骨关节炎表现多样且缺乏有效的临床治疗手段,因而迫切需要更为完善的理论机制[4]。近期,发现了一种与二硫化物应激导致的新的细胞死亡方式称为

双硫死亡, 其与诸多疾病进展密切相关且与炎性疾病存在联系[31], 但目前, 双硫死亡与炎性疾病的关系尚不明确, 在骨关节炎中更是一片空白。

为了阐明双硫死亡与骨关节炎的可能联系, 及其与免疫浸润间的关系, 首先我们利用近期发现的双硫死亡基因(SLC7A11, SLC3A2, RPN1, NCKAP1, WASF2, RAC1, NUBPL, NDUFA11, LRPPRC, OXSM, NDUFS1, GYS1)将骨关节炎分为 A、B 两种亚型, 发现 SLC3A2、RPN1 和 NCKAP1 在 B 亚型中的表达显著高于 A 亚型; WASF2 和 GYS1 在 A 亚型中的表达显著高于 B 亚型(图 2E)。SLC3A2 编码的跨膜蛋白在转运氨基酸的同时, 通过调节胞内钙水平影响软骨细胞的生存和凋亡[32]; 尽管目前还没有直接证据表明 RPN1 基因与骨关节炎有关, 但由于 RPN1 参与了内质网应激, 它可能通过未折叠蛋白反应(Unfolded Protein Response, UPR)影响到软骨细胞的功能和代谢[33] [34]; 此外, SLC3A2 和 RPN1 都参与了蛋白质 N-糖基化的过程, 这是一种重要的翻译后修饰方式, 影响蛋白质的稳定、折叠和功能。NCKAP1 与 WASF2 作为 WAVE 复合物的组成部分, 通过与 Arp2/3 复合物相互作用调节伪足形成, 进而影响细胞的形态、运动和功能, 值得注意的是, 这种伪足的形成可以促进双硫死亡[35]; GYS1 基因编码糖原合成酶, 其活性受其氨基(N)和羧基(C)末端的磷酸化水平的调控, 当 6-磷酸葡萄糖发生变构时, 这种磷酸化抑制被解除[36] [37]。

以上述分型结果为前提, 取 A、B 两亚型间及骨关节炎、对照间的差异表达基因交集, 得到了 117 个基因(其中 48 个上调, 69 个下调)。通过富集分析, 我们发现在骨关节炎中许多与双硫死亡相关的功能富集。涉及到的有, 葡糖基转移酶活性、烟酸和烟酰胺代谢、肌动蛋白及细胞骨架的变化、细胞迁移黏附趋化及伪足形成等。说明双硫死亡的确参与了骨关节炎的进展过程。

此外, 富集结果显示 MAPK 信号通路、Toll 样受体信号通路、NOD 样受体信号通路、IL-17 信号通路、TNF 信号通路、NF- κ B 信号通路富集。

基于富集分析结果结合相关文献, 我们得知 NADPH 是还原胱氨酸所必需的辅因子, 也是双硫死亡的关键因素[13] [14]。NADPH 主要来源于葡萄糖 - 戊糖磷酸途径, 而这个途径受到多种信号通路的调节。例如, MAPK 信号通路可以通过激活转录因子 AP-1, 促进葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G6PD)的表达, G6PD 是葡萄糖 - 戊糖磷酸途径的限速酶[38] [39]。Toll 样受体信号通路和 TNF 信号通路也可以通过激活 NF- κ B 信号通路, 增加 G6PD 的表达[40] [41] [42] [43] [44]。IL-17 信号通路可以通过激活 STAT3 信号通路[45] [46], 增加 6-磷酸葡萄糖脱氢酶(6PGD)的表达[47], 6PGD 是葡萄糖 - 戊糖磷酸途径的另一个关键酶。因此, 这些信号通路可能通过增加 NADPH 的产生, 抵抗双硫死亡。

此外, ROS 作为生物体内常见且重要的氧化物, 会导致 NADPH 等还原剂的减少, 从而导致二硫化物积累, 可能是双硫死亡的重要诱因[13] [14]。ROS 主要来源于线粒体呼吸链和 NADPH 氧化酶(NOX)等氧化应激源。而这些氧化应激源受到多种信号通路的调节。例如, MAPK 信号通路可以通过激活 c-Jun 和 c-Fos 等转录因子, 促进 NOX 的表达和活性[39] [48]。Toll 样受体信号通路和 TNF 信号通路也可以通过激活 NF- κ B 信号通路, 增加 NOX 的表达和活性[48] [49]。IL-17 信号通路可以通过激活 STAT3 信号通路, 增加 NOX2 和 NOX4 的表达[50] [51]。NOD 样受体信号通路可以通过形成 NLRP3 炎性小体, 激活 caspase-1 和 IL-1 β 等细胞因子, 增加线粒体 ROS 的产生[52]。因此, 这些信号通路可能通过增加 ROS 的产生, 促进双硫死亡。

这些信号通路之间可能存在一种平衡或拮抗的关系, 一方面通过增加 NADPH 的产生来抵抗双硫死亡, 另一方面通过增加 ROS 的产生来促进双硫死亡。当这种平衡被打破时, 例如在葡萄糖匮乏或 ROS 过量的情况下, 双硫死亡就会发生。不过, 这些都仅仅是我们通过分析结果所作的推测, 尚且需要更为可靠的实验验证。

为了确定骨关节炎中更为关键的与双硫死亡相关的潜在基因, 我们通过三种特征选择的机器学习方

法 LASSO 回归、SVM、RF, 筛选出了 9 个 hubDEG, 分别是 APOD、EDNRB、FOXC2、JUN、LRCH1、MAFF、NUDT1、PNMAL1、ZNF668。他们是潜在的通过调控双硫死亡而影响骨关节炎进展的基因。

APOD 是一种载脂蛋白, 主要参与脂质运输和细胞应激反应[53] [54], 影响细胞死亡的方式。而 FOXC2 是一种转录因子, 能够促进细胞的迁移变化, 与伪足形成相关[55] [56]。EDNRB 是一种内皮素受体, 主要参与血管生成和血管平滑肌收缩。EDNRB 的表达受到 JUN 的调控[57], 而 JUN 能够影响 GLUT1 的表达, 从而影响细胞对葡萄糖的摄取和利用[58] [59]。LRCH1 编码一种钙调蛋白同源蛋白, 主要参与细胞骨架的重塑和细胞极性的建立[60] [61]。LRCH1 和 NCKAP1 之间可能存在一定的联系, 因为二者都是与肌动蛋白相关的蛋白, 可以调节肌动蛋白丝的组装和稳定。而 NUDT1 是一种核苷酸水解酶, 能够水解 NADPH 和其他氧化型核苷酸[62] [63] [64]。至于 PNMAL1 和 ZNF668, 可能需要更多的研究来明确它们与双硫死亡的确切联系。

不光是验证集的 ROC 分析, 我们的 qRT-PCR 结果也通过 THP-1 细胞建立的模型证实了 hubDEGs 表达水平与对照组存在着显著的统计学差异, 这初步证明了 9 个基因在双硫死亡与骨关节炎联系中的关键性。

这些结论提供了一个理论框架, 为未来更深入地研究这些基因及免疫特征乃至潜在的调控靶点在双硫死亡和参与骨关节炎进展中的作用提供了方向。未来需要更多的实验研究, 以验证这些结论并揭示这些基因及免疫浸润特征、靶点通过双硫死亡影响骨关节炎的确切作用和机制。

基金项目

这项研究得到了国家自然科学基金(项目编号 U23A20447, 82171010)的支持。

参考文献

- [1] Hunter, D.J. and Bierma-Zeinstra, S. (2019) Osteoarthritis. *The Lancet*, **393**, 1745-1759. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)30417-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)30417-9)
- [2] Bortoluzzi, A., Furini, F. and Scirè, C.A. (2018) Osteoarthritis and Its Management-Epidemiology, Nutritional Aspects and Environmental Factors. *Autoimmunity Reviews*, **17**, 1097-1104. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2018.06.002>
- [3] Long, H., Liu, Q., Yin, H., et al. (2022) Prevalence Trends of Site-Specific Osteoarthritis from 1990 to 2019: Findings from the Global Burden of Disease Study 2019. *Arthritis & Rheumatology*, **74**, 1172-1183. <https://doi.org/10.1002/art.42089>
- [4] Grässel, S. and Muschter, D. (2020) Recent Advances in the Treatment of Osteoarthritis. *F1000Research*, **9**, Article 325. <https://doi.org/10.12688/f1000research.22115.1>
- [5] An, S., Hu, H., Li, Y., et al. (2020) Pyroptosis Plays a Role in Osteoarthritis. *Aging and Disease*, **11**, 1146-1157. <https://doi.org/10.14336/AD.2019.1127>
- [6] Shen, P., Jia, S., Wang, Y., et al. (2022) Mechanical Stress Protects Against Chondrocyte Pyroptosis through Lipoxin A4 via Synovial Macrophage M2 Subtype Polarization in an Osteoarthritis Model. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, **153**, Article 113361. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.113361>
- [7] Yao, X., Sun, K., Yu, S., et al. (2021) Chondrocyte Ferroptosis Contribute to the Progression of Osteoarthritis. *Journal of Orthopaedic Translation*, **27**, 33-43. <https://doi.org/10.1016/j.jot.2020.09.006>
- [8] Zhang, S., Xu, J., Si, H., et al. (2022) The Role Played by Ferroptosis in Osteoarthritis: Evidence Based on Iron Dyshomeostasis and Lipid Peroxidation. *Antioxidants*, **11**, Article 1668. <https://doi.org/10.3390/antiox11091668>
- [9] Wang, W., Chen, Z. and Hua, Y. (2023) Bioinformatics Prediction and Experimental Validation Identify a Novel Cu-proptosis-Related Gene Signature in Human Synovial Inflammation during Osteoarthritis Progression. *Biomolecules*, **13**, Article 127. <https://doi.org/10.3390/biom13010127>
- [10] Huang, Y.F., Wang, G., Ding, L., et al. (2023) Lactate-Upregulated NADPH-Dependent NOX4 Expression via HCAR1/PI3K Pathway Contributes to ROS-Induced Osteoarthritis Chondrocyte Damage. *Redox Biology*, **67**, Article 102867. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2023.102867>
- [11] Sasaki, E., Yamamoto, H., Matsuta, R., et al. (2022) Metabolomics of Osteoarthritis with Synovitis in Middle Aged

- Women from the Iwaki Health Promotion Project. *Osteoarthritis and Cartilage*, **30**, S96-S97. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2022.02.122>
- [12] Lambrecht, S., Verbruggen, G., Verdonk, P.C.M., *et al.* (2008) Differential Proteome Analysis of Normal and Osteoarthritic Chondrocytes Reveals Distortion of Vimentin Network in Osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*, **16**, 163-173. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2007.06.005>
- [13] Liu, X., Olszewski, K., Zhang, Y., *et al.* (2020) Cystine Transporter Regulation of Pentose Phosphate Pathway Dependency and Disulfide Stress Exposes a Targetable Metabolic Vulnerability in Cancer. *Nature Cell Biology*, **22**, 476-486. <https://doi.org/10.1038/s41556-020-0496-x>
- [14] Liu, X., Nie, L., Zhang, Y., *et al.* (2023) Actin Cytoskeleton Vulnerability to Disulfide Stress Mediates Disulfidptosis. *Nature Cell Biology*, **25**, 404-414. <https://doi.org/10.1038/s41556-023-01091-2>
- [15] Woetzel, D., Huber, R., Kupfer, P., *et al.* (2014) Identification of Rheumatoid Arthritis and Osteoarthritis Patients by Transcriptome-Based Rule Set Generation. *Arthritis Research & Therapy*, **16**, Article No. R84. <https://doi.org/10.1186/ar4526>
- [16] Broeren, M.G.A., De Vries, M., Bennink, M.B., *et al.* (2016) Functional Tissue Analysis Reveals Successful Cryopreservation of Human Osteoarthritic Synovium. *PLOS ONE*, **11**, e0167076. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167076>
- [17] Guo, Y., Walsh, A.M., Fearon, U., *et al.* (2017) CD40L-Dependent Pathway Is Active at Various Stages of Rheumatoid Arthritis Disease Progression. *Journal of Immunology*, **198**, 4490-4501. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1601988>
- [18] Leek, J.T., Johnson, W.E., Parker, H.S., *et al.* (2023) sva: Surrogate Variable Analysis. <https://bioconductor.org/packages/sva>
- [19] Ritchie, M.E., Phipson, B., Wu, D., *et al.* (2015) Limma Powers Differential Expression Analyses for RNA-Sequencing and Microarray Studies. *Nucleic Acids Research*, **43**, e47. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv007>
- [20] Greenacre, M., Groenen, P.J.F., Hastie, T., *et al.* (2022) Principal Component Analysis. *Nature Reviews Methods Primers*, **2**, Article No. 100. <https://doi.org/10.1038/s43586-022-00184-w>
- [21] Lê, S., Josse, J. and Husson, F. (2008) FactoMineR: An R Package for Multivariate Analysis. *Journal of Statistical Software*, **25**, 1-18. <https://doi.org/10.18637/jss.v025.i01>
- [22] Wilkerson, M.D. and Hayes, D.N. (2010) ConsensusClusterPlus: A Class Discovery Tool with Confidence Assessments and Item Tracking. *Bioinformatics*, **26**, 1572-1573. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq170>
- [23] Villanueva, R.A.M. and Chen, Z.J. (2019) Ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis (2nd Ed.). *Measurement: Interdisciplinary Research and Perspectives*, **17**, 160-167. <https://doi.org/10.1080/15366367.2019.1565254>
- [24] Hänzelmann, S., Castelo, R. and Guinney, J. (2013) GSVA: Gene Set Variation Analysis for Microarray and RNA-Seq Data. *BMC Bioinformatics*, **14**, Article No. 7. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-14-7>
- [25] Jassal, B., Matthews, L., Viteri, G., *et al.* (2020) The Reactome Pathway Knowledgebase. *Nucleic Acids Research*, **48**, D498-D503. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz1031>
- [26] Ashburner, M., Ball, C.A., Blake, J.A., *et al.* (2000) Gene Ontology: Tool for the Unification of Biology. *Nature Genetics*, **25**, 25-29. <https://doi.org/10.1038/75556>
- [27] Wu, T., Hu, E., Xu, S., *et al.* (2021) ClusterProfiler 4.0: A Universal Enrichment Tool for Interpreting Omics Data. *The Innovation*, **2**, Article 100141. <https://doi.org/10.1016/j.xinn.2021.100141>
- [28] Kanehisa, M., Furumichi, M., Tanabe, M., *et al.* (2017) KEGG: New Perspectives on Genomes, Pathways, Diseases and Drugs. *Nucleic Acids Research*, **45**, D353-D361. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1092>
- [29] Karatzoglou, A., Smola, A., Hornik, K., *et al.* (2004) Kernlab—An S4 Package for Kernel Methods in R. *Journal of Statistical Software*, **11**, 1-20. <https://doi.org/10.18637/jss.v011.i09>
- [30] Liaw, A. and Wiener, M. (2002) Classification and Regression by randomForest. *The R Journal*, **2**, 18-22.
- [31] Zheng, P., Zhou, C., Ding, Y., *et al.* (2023) Disulfidptosis: A New Target for Metabolic Cancer Therapy. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, **42**, Article No. 103. <https://doi.org/10.1186/s13046-023-02675-4>
- [32] Liu, H., Deng, Z., Yu, B., *et al.* (2022) Identification of SLC3A2 as a Potential Therapeutic Target of Osteoarthritis Involved in Ferroptosis by Integrating Bioinformatics, Clinical Factors and Experiments. *Cells*, **11**, Article 3430. <https://doi.org/10.3390/cells11213430>
- [33] Elsasser, S., Gali, R.R., Schwickart, M., *et al.* (2002) Proteasome Subunit Rpn1 Binds Ubiquitin-Like Protein Domains. *Nature Cell Biology*, **4**, 725-730. <https://doi.org/10.1038/ncb845>
- [34] You, K., Wang, L., Chou, C.H., *et al.* (2021) QRICH1 Dictates the Outcome of ER Stress through Transcriptional Control of Proteostasis. *Science*, **371**, eabb6896. <https://doi.org/10.1126/science.abb6896>

- [35] Cao, Q., Hong, A., Shen, R., *et al.* (2023) Disulfidptosis-Related NCK Associated Protein 1 as a Potential Biomarker for Multiple Tumor Types: A Pan-Cancer Analysis Based on Public Databases. <https://www.researchsquare.com>
- [36] Shi, M., Wang, J., Xiao, Y., *et al.* (2018) Glycogen Metabolism and Rheumatoid Arthritis: The Role of Glycogen Synthase 1 in Regulation of Synovial Inflammation via Blocking AMP-Activated Protein Kinase Activation. *Frontiers in Immunology*, **9**, Article 1714. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2018.01714>
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01714>
- [37] Mccorvie, T.J., Loria, P.M., Tu, M., *et al.* (2022) Molecular Basis for the Regulation of Human Glycogen Synthase by Phosphorylation and Glucose-6-Phosphate. *Nature Structural & Molecular Biology*, **29**, 628-638.
<https://doi.org/10.1038/s41594-022-00799-3>
- [38] Kohan, A.B., Talukdar, I., Walsh, C.M., *et al.* (2009) A Role for AMPK in the Inhibition of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase by Polyunsaturated Fatty Acids. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **388**, 117-121.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.07.130>
- [39] Yen, W.C., Wu, Y.H., Wu, C.C., *et al.* (2020) Impaired Inflammasome Activation and Bacterial Clearance in G6PD Deficiency Due to Defective NOX/P38 MAPK/AP-1 Redox Signaling. *Redox Biology*, **28**, Article 101363.
<https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101363>
- [40] Kawai, T. and Akira, S. (2007) Signaling to NF- κ B by Toll-Like Receptors. *Trends in Molecular Medicine*, **13**, 460-469. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2007.09.002>
- [41] Zhang, G. and Ghosh, S. (2001) Toll-Like Receptor-Mediated NF- κ B Activation: A Phylogenetically Conserved Paradigm in Innate Immunity. *The Journal of Clinical Investigation*, **107**, 13-19. <https://doi.org/10.1172/JCI11837>
- [42] Schütze, S., Wiegmann, K., Machleidt, T., *et al.* (1995) TNF-Induced Activation of NF- κ B. *Immunobiology*, **193**, 193-203. [https://doi.org/10.1016/S0171-2985\(11\)80543-7](https://doi.org/10.1016/S0171-2985(11)80543-7)
- [43] Wang, C.Y., Mayo, M.W. and Baldwin, A.S. (1996) TNF- and Cancer Therapy-Induced Apoptosis: Potentiation by Inhibition of NF- κ B. *Science*, **274**, 784-787. <https://doi.org/10.1126/science.274.5288.784>
- [44] Hayden, M.S. and Ghosh, S. (2014) Regulation of NF- κ B by TNF Family Cytokines. *Seminars in Immunology*, **26**, 253-266. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2014.05.004>
- [45] Gu, F.M., Li, Q.L., Gao, Q., *et al.* (2011) IL-17 Induces AKT-Dependent IL-6/JAK2/STAT3 Activation and Tumor Progression in Hepatocellular Carcinoma. *Molecular Cancer*, **10**, Article No. 150.
<https://doi.org/10.1186/1476-4598-10-150>
- [46] Hu, Z., Luo, D., Wang, D., *et al.* (2017) IL-17 Activates the IL-6/STAT3 Signal Pathway in the Proliferation of Hepatitis B Virus-Related Hepatocellular Carcinoma. *Cellular Physiology and Biochemistry*, **43**, 2379-2390.
<https://doi.org/10.1159/000484390>
- [47] Sun, M., Sheng, H., Wu, T., *et al.* (2021) PIKE-A Promotes Glioblastoma Growth by Driving PPP Flux through Increasing G6PD Expression Mediated by Phosphorylation of STAT3. *Biochemical Pharmacology*, **192**, Article 114736.
<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2021.114736>
- [48] Piao, Y.J., Seo, Y.H., Hong, F., *et al.* (2005) Nox 2 Stimulates Muscle Differentiation via NF- κ B/INOS Pathway. *Free Radical Biology and Medicine*, **38**, 989-1001. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2004.11.011>
- [49] Pérez, L., Vallejos, A., Echeverria, C., *et al.* (2019) OxHDL Controls LOX-1 Expression and Plasma Membrane Localization through a Mechanism Dependent on NOX/ROS/NF- κ B Pathway on Endothelial Cells. *Laboratory Investigation*, **99**, 421-437. <https://doi.org/10.1038/s41374-018-0151-3>
- [50] Manea, A., Tanase, L.I., Raicu, M., *et al.* (2010) JAK/STAT Signaling Pathway Regulates Nox1 and Nox4-Based NADPH Oxidase in Human Aortic Smooth Muscle Cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, **30**, 105-112.
<https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.109.193896>
- [51] Braunersreuther, V., Montecucco, F., Ashri, M., *et al.* (2013) Role of NADPH Oxidase Isoforms NOX1, NOX2 and NOX4 in Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, **64**, 99-107.
<https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2013.09.007>
- [52] Tschopp, J. and Schroder, K. (2010) NLRP3 Inflammasome Activation: The Convergence of Multiple Signalling Pathways on ROS Production? *Nature Reviews Immunology*, **10**, 210-215. <https://doi.org/10.1038/nri2725>
- [53] Snelling, S., Sinsheimer, J.S., Carr, A., *et al.* (2007) Genetic Association Analysis of LRCH1 as an Osteoarthritis Susceptibility Locus. *Rheumatology*, **46**, 250-252. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/kel265>
- [54] Sanchez, D. and Ganfornina, M.D. (2021) The Lipocalin Apolipoprotein D Functional Portrait: A Systematic Review. *Frontiers in Physiology*, **12**, Article 738991. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.738991>
- [55] Li, C., Ding, H., Tian, J., *et al.* (2016) Forkhead Box Protein C2 Promotes Epithelial-Mesenchymal Transition, Migration and Invasion in Cisplatin-Resistant Human Ovarian Cancer Cell Line (SKOV3/CDDP). *Cellular Physiology and Biochemistry*, **39**, 1098-1110. <https://doi.org/10.1159/000447818>

-
- [56] Lin, F., Li, X., Wang, X., *et al.* (2022) Stanniocalcin 1 Promotes Metastasis, Lipid Metabolism and Cisplatin Chemoresistance via the FOXC2/ITGB6 Signaling Axis in Ovarian Cancer. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, **41**, Article No. 129. <https://doi.org/10.1186/s13046-022-02315-3>
- [57] Stobdan, T., Zhou, D., Ao-Ieong, E., *et al.* (2015) Endothelin Receptor B, a Candidate Gene from Human Studies at High Altitude, Improves Cardiac Tolerance to Hypoxia in Genetically Engineered Heterozygote Mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **112**, 10425-10430. <https://doi.org/10.1073/pnas.1507486112>
- [58] Zhou, J., Deo, B.K., Hosoya, K., *et al.* (2005) Increased JNK Phosphorylation and Oxidative Stress in Response to Increased Glucose Flux through Increased GLUT1 Expression in Rat Retinal Endothelial Cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, **46**, 3403-3410. <https://doi.org/10.1167/iovs.04-1064>
- [59] Jiang, X., Deng, X., Wang, J., *et al.* (2022) BPIFB1 Inhibits Vasculogenic Mimicry via Downregulation of GLUT1-Mediated H3K27 Acetylation in Nasopharyngeal Carcinoma. *Oncogene*, **41**, 233-245. <https://doi.org/10.1038/s41388-021-02079-8>
- [60] Spector, T.D., Reneland, R.H., Mah, S., *et al.* (2006) Association between a Variation InLRCH1 and Knee Osteoarthritis: A Genome-Wide Single-Nucleotide Polymorphism Association Study Using DNA Pooling. *Arthritis & Rheumatism*, **54**, 524-532. <https://doi.org/10.1002/art.21624>
- [61] Liu, C., Xu, X., Han, L., *et al.* (2020) LRCH1 Deficiency Enhances LAT Signalosome Formation and CD8+ T Cell Responses against Tumors and Pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **117**, 19388-19398. <https://doi.org/10.1073/pnas.2000970117>
- [62] Koenig, A. and Buskiewicz-Koenig, I.A. (2022) Redox Activation of Mitochondrial DAMPs and the Metabolic Consequences for Development of Autoimmunity. *Antioxidants & Redox Signaling*, **36**, 441-461. <https://doi.org/10.1089/ars.2021.0073>
- [63] Vitry, G., Paulin, R., Grobs, Y., *et al.* (2021) Oxidized DNA Precursors Cleanup by NUDT1 Contributes to Vascular Remodeling in Pulmonary Arterial Hypertension. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, **203**, 614-627. <https://doi.org/10.1164/rccm.202003-0627OC>
- [64] Agarwal, S. and De Jesus Perez, V.A. (2021) In Defense of the Nucleus: NUDT1 and Oxidative DNA Damage in Pulmonary Arterial Hypertension. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, **203**, 541-542. <https://doi.org/10.1164/rccm.202009-3706ED>