Vol.16 No.4 Dec. 2018

DOI:10.12113/j.issn.1672-5565.201805001

通过构建竞争性内源 RNA 网络识别潜在的 椎间盘疾病相关 circRNA

陈佳新,宋 超,张玥欣,尹佳琦,李姗珊,李春权*,张 建* (哈尔滨医科大学 大庆校区信息学院,黑龙江 大庆 163319)

摘 要:环状 RNA(circRNA)可以通过竞争性结合微小 RNA(miRNA),从而降低 miRNA 对其他靶标 RNAs 的抑制作用,进而间接调控其表达水平。这种竞争性关系代表了一种全新的基因调控机制,在癌症生理和发展中起重要作用。我们运用生物信息学的方法,对基因表达谱、circRNA 探针谱重注释处理,并且结合 MiRanda 算法预测的 miRNA 靶点信息构建了竞争性内源 RNA(ceRNA)网络,发现了五个与疾病相关的重要模块。其中通过 hsa-miR-17-3p 介导的 CD74 与 hsa_circ_0001320,通过 hsa-let-7a-2-3p 介导的 PAPSS2 与 hsa_circ_0000077 两组 ceRNA 关系在椎间盘变性中起到重要的分子调控作用,从而成为潜在的临床标志物。进一步地,通过对靶基因的功能注释预测了这两个 circRNA 的生物学功能,其中明显与椎间盘炎症反应和骨发育相关,为临床基因检测预测疾病和药物靶点治疗提供依据并且也为椎间盘疾病的科学研究提供思路。

关键词:竞争性内源 RNA(ceRNA);椎间盘变性;ceRNA 网络;环状 RNA

中图分类号:Q752 文献标志码:A 文章编号:1672-5565(2018)04-246-09

Identification of potential intervertebral disc disease-related circRNAs by constructing competing endogenous RNA networks

CHEN Jiaxin, SONG Chao, ZHANG Yuexin, YIN Jiaqi, LI Shanshan, LI Chunquan*, ZHANG Jian* (Department of Medical Informatics, Harbin Medical University (Daqing), Daqing 163319, Heilongjiang, China)

Abstract: CircRNAs can reduce the inhibitory effect of miRNA on other target RNAs and indirectly regulate its expression level by competitive binding of small RNAs to miRNAs. This competitive relationship represents a novel gene regulation mechanism that plays an important role in cancer physiology and development. Using the bioinformatics method, we reannotated the gene expression profile and circRNA probe profile. With the miRNA target information predicted by the MiRanda algorithm, we constructed a competitive endogenous RNAs network and found five important modules related to the disease. The relations of the two ceRNAs, i. e. CD74 and hsacirc0001320 mediated by hsa-miR-17-3p and PAPSS2 and hsa_circ_0000077 mediated by hsa-let-7a-2-3p, play an important role in regulating the degeneration of intervertebral disc and thus become a potential clinical marker. Further, we predicted the biological functions of the two circRNAs by annotating the function of the target gene, which was significantly related to the inflammatory reaction of the intervertebral disc and bone development. It provides basis for clinical gene detection to predict disease and drug target therapy, as well as ideas for scientific research of intervertebral disc disease.

Keywords: Intervertebral; Disc degeneration; CeRNA network; CircRNA

环状 RNA(circRNA)是一类特殊的非编码 RNA 分子,呈封闭环状结构,不受 RNA 外切酶影响,相对

收稿日期:2018-05-03;修回日期:2018-05-21.

基金项目:黑龙江省大学生创新创业训练计划基金(No.201610226041).

作者简介: 陈佳新, 女, 本科生, 研究方向: 基因表达调控分析。 E-mail: 2986446306@ qq.com.

^{*}通信作者:李春权,男,教授,研究方向:复杂疾病相关的代谢通路重构、分析和识别。E-mail:lcqbio@163.com; 张建,男,副教授,研究方向:系统生物学网络构建与分析。E-mail:hmudqzj@163.com.

于线性 RNA 分子更加稳定不容易降解^[1]。近年在功能上的研究表明, circRNA 分子含有大量的microRNA(miRNA)结合位点,在细胞中起到 miRNA海绵的作用从而消除或减弱 miRNA 对其靶基因的抑制,提高靶基因的表达水平,这种调控模式被称为竞争性内源 RNA(ceRNA)^[2]。ceRNA 是一种全新的基因表达调控模式,涉及许多 RNA 分子,包括mRNA、circRNA 和 miRNA 等。有研究表明,ceRNA 在肿瘤的发生发展中起着重要作用。

椎间盘变性是腰背痛和坐骨神经痛最常见的原因,而椎间盘退化的主要原因是年龄的增长,然而近年来椎间盘退化的发病群体却有年轻化的趋势^[3]。目前治疗椎间盘退化的方法包括药物治疗、物理治疗和外科手术,但这些都不是最理想的。因此,我们在基因分子的层面上做出假设:在椎间盘变性疾病中,circRNA和mRNA之间存在潜在的ceRNA关系,我们可以通过调节RNA之间的竞争性关系来准确高效地预诊治疗椎间盘变性。

通过 miRNA 桥梁构建了一个包含 mRNA 与circRNA 两类节点的 ceRNA 网络,利用聚类分析、模块挖掘等生物信息学方法进行网络分析并且从网络中挖掘出与疾病相关的重要模块,利用 Gene Ontology(GO)基因功能注释、KEGG 通路富集等方法对 circRNA 的功能进行了预测。为了探索重要模块中的蛋白编码基因与 circRNA 的分子功能,在NCBI PubMed 中搜集大量文献来证明重要模块中基因的功能及作用。在 ceRNA 表达调控关系的基础上推测出 circRNA 潜在的生物学意义和功能,从根本上预测椎间盘变性中基因表达水平和分子调控机制,为椎间盘变性相关药物的开发和临床预诊治疗提供了重要的分子标志物。

1 实验材料与方法

1.1 数据来源及处理

在 NCBI GEO 数据库中下载了人类椎间盘变性疾病的芯片表达谱数据(GSE67567),其中包含同样本的 mRNA 和 circRNA 的表达谱。总共 10 个样本,包括五个正常样本和五个髓核退化疾病样本。其中mRNA 表达谱来自 GPL15314 Arraystar Human LncRNA microarray V2.0 (Agilent_033010 Probe Name version)平台,circRNA 表达谱来自 GPL19978 Agilent-069978 Arraystar Human CircRNA microarray V1 平台。在 GENCODE 数据库中下载人类编码蛋白转录序列 Fasta 格式文件,并且在 Circbase 数据库中下载人类 circRNA 的序列文件。运用 blast 软件

对 mRNA 序列与芯片探针序列进行了比对,得到探针-mRNA 的对应关系后进行平台转换后得到基因的表达谱。与此同时,对 circRNA 的探针表达谱进行平台转换得到 circRNA 表达谱。

1.2 构造竞争性内源 RNA(ceRNA)网络

在 mirbase 数据库上下载人类成熟的 miRNA 序列,利用 miRanda^[4] 软件预测 miRNA-mRNA,与circRNA-miRNA 的的靶向关系。Score 选取默认值>140,Energy 选取更为严谨的域值<0。

1.2.1 ceRNA 关系预测

这两类关系对中的 miRNA 进行超几何检验。 具体计算公式如下:

$$P\text{-value} = 1 - \sum_{i=0}^{r-1} \frac{\left(\frac{t}{i}\right)\left(\frac{m-t}{n-i}\right)}{\left(\frac{m}{n}\right)}$$

其中m代表人类 miRNA 总数, t 表示与 mRNA 相互作用的 miRNA 的数目, n 表示与 circRNA 相互作用的 miRNA 的数目, r 表示 mRNA 与 circRNA 之间共享的 miRNA 数目。通过对 mRNA 与 miRNA 的 靶向关系对和 circRNA 与 miRNA 的关系对做超几何检验,我们得到 ceRNA 对(p <0.05)。

研究发现 circRNA 的过量表达会降低游离 miRNA 分子的数目,进而导致 miRNA 下游靶基因 的高表达^[5]。共表达是一种发现调控关系的常用 方法,我们在正常样本和疾病样本中分别计算 mRNA 与 circRNA 的 pearson 相关性,得到 2 539 352 个边对关系和对应的 Pearson 相关系数 cor 值。考虑到算法的统计学意义和网络的规模等因素,我们认为 mRNA 与 circRNA 在疾病与正常样本中变化程度大于 0.5 的关系对符合共表达关系。数学公式如下:

$$\mid cor(case) - cor(control) \mid > 0.5$$

根据最新研究结果, circRNA 和 mRNA 之间共表达的增加或缺失可能是导致疾病的原因,所以我们同样假设这种竞争关系可以导致椎间盘变性疾病的发生^[2]。

为了使网络更加趋向于疾病特异性和相关性,既考虑到了通过 Pearson 相关性构成的共表达网络,又兼顾到了 miRanda 预测的 miRNA 潜在靶点构成的 ceRNA 网络,选取他们关系对的交集构成 mRNA 与 circRNA 的 ceRNA 二步网络进行网络功能与拓扑分析,为后续的研究做基础。

1.3 模块挖掘与功能注释通路富集

运用 cytoscape 3.2.0 插件 jActiveModules 进行模块挖掘,参数选取默认值(Number of Modules:5, Overlap Threshold:0.8)。并且使用了 cytoscape3.2.0

插件 ClueGO 对模块中包含的基因 GO 功能注释和 KEGG 通路富集。

方法流程图见图 1.

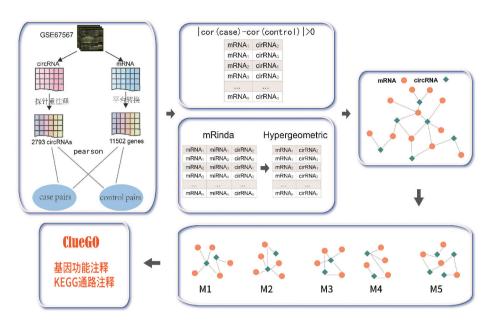


图1 方法流程图

Fig.1 Method flowchart

2 结果分析

2.1 表达谱处理和分析

运用 blast 软件对 mRNA 序列和芯片探针序列 进行了比对,进行平台转换后我们得到含有 11 502 个编码基因的表达谱。同时对 circRNA 的探针表达 谱进行平台转换得到含有 2 793 个 circRNA 的表达 谱。我们通过聚类分别对 mRNA 的表达谱和 circRNA 的表达谱进行进一步分析,结果表明两个 表达谱在疾病和正常样本中的差异性明显,样本数 据较好,见图 2。

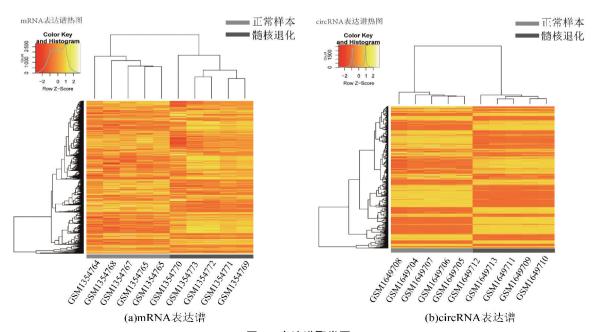


图 2 表达谱聚类图

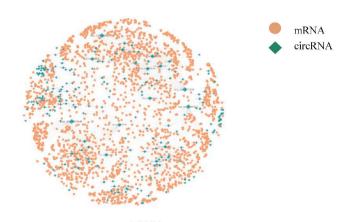
Fig.2 Clustering map of expression profile

注:最下方浅灰色条代表正常样本,深灰色条代表髓核退化样本。颜色由浅入深代表表达量的标准化数值大小。

2.2 网络分析结果

通过以上算法生成了一个由 mRNA 与 circRNA 两类节点组成的二步网络。网络包含 2 349 个 mRNA, 264 个 circRNA,5 705 个 ceRNA 关系对。其中有两类节点,黄色圆形为 mRNA,蓝绿色菱形为 circRNA。我们构建的网络服从幂率分布(见图3(b))。

对网络进行拓扑属性分析,其中包括度分布、网络介数、最短路径和网络亲密度。由图 3(a)可见网络服从幂率分布,说明网络中存在一小部分的基因或者 circRNA 连接着大部分节点,网络连通性较强,同时也说明这小部分节点在网络调控中起重要作用。



(a) ccRNA网络图

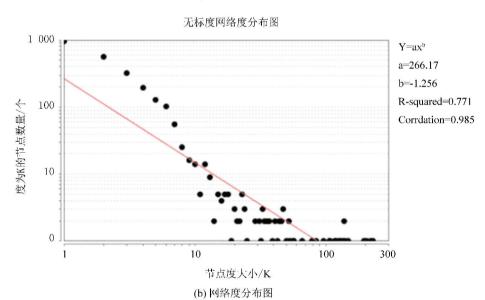


图 3 网络分析图

Fig.3 Network analysis chart

2.3 识别 ceRNA 网络重要模块

使用 cytoscape 3.2.0 的 jActiveModules 插件进行模块挖掘,发现了五个 circRNA 与 mRNA 连接紧密的模块。模块的规模都很相似,模块节点数为 32-70,边为 37-132。利用 Cytoscape 的 ClueGO 插件分别对每一个模块中的所有基因进行功能注释和通路富集,选取了 P 值<0.05 的 GOTerm 和 Pathway。其中主要包含了几类生物学过程:相关炎症反应、骨发育和损伤、蛋白质结构和稳定性等等。

2.4 模块展示与分析

2.4.1 模块一

模块一(见图 4(a))包括 36 个节点、45 条边,

包含了 19 个 mRNA 和 7 个 circRNA。其中编码蛋白的基因富集到蛋白质稳定期(见图 4(c))。通过对椎间盘蛋白质组学差异分析,我们发现正常人和腰椎间盘退变患者的蛋白质种类存在显著差异,腰椎间盘退变患者的蛋白质含量也随着病变程度的加深而逐渐减少^[6]。同时我们也发现了内源性凋亡信号通路的调控,研究表明人椎间盘髓核细胞的凋亡具有内在性和外源性^[7]。同时椎间盘变性与骨的发育相关,此模块也富集到了骨发育功能^[8-9]。

因 PAPSS2 是 AR brachyolmia 的疾病基因,并 且 PAPSS2 突变可以产生从 brachyolmia 到脊椎干骺 发育不良的表型分级。PAPS 是体内活性硫酸根供 体,它的合成需要在 PAPS 合成酶(PAPss)的催化下进行,PAPS 合成酶 2(PAPSS2)的突变与大骨节病、骨关节炎等多种骨骼疾病的发生发展有关^[10-16]。在此模块中,GARS 与 PAPSS2 同时富集到骨发育的生物学过程。基于 ceRNA 理论,推断GARS 基因与 PAPSS2 及他们靶向的 circRNAs(has_circ_0013204, has_circ_0000077, has_circ_0073027, has_circ_0001234, has_circ_0007311),可能通过ceRNA 调控关系诱发椎间盘变性等骨疾病^[17]。发现模块二中的 PAPSS2 与 has_circ_0000077 的竞争性调控机制改变了共表达的强度从而影响了基因的

表达和相应蛋白的功能。在正常样本中他们的共表达相关值为-0.633 56,在疾病状态下他们的表达相关值为 0.642 102,在正常和疾病中体现了明显的共表达差异,并且由于竞争性关系从负相关变为正相关也暗示了竞争性 RNA 调控机制的表达趋势。并且他们的超几何 P 值统计学显著为 1.02×10⁻⁶, FDR矫正值为 7.913×10⁻³,证明了通过 hsa-let-7a-2-3p^[18]介导的 PAPSS2 与 has_cire_0000077 之间紧密的ceRNA 关系(见图 4(b))。其中得到 PAPSS2 基因的 Foldchange 值为 1.899 515 547 在疾病中显著上调。

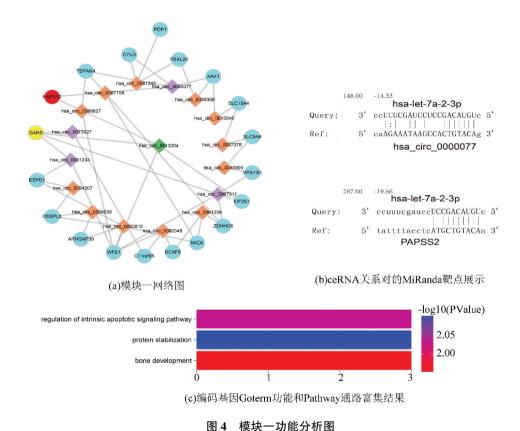


Fig.4 Functional analysis chart for Module 1

注:图(a)中文献证明已知疾病相关基因用红色圆形节点表示;把富集到相同生物学过程的基因用黄色圆形节点表示;把黄色和红色节点的一步邻居 circRNAs 用紫色菱形节点表示并且把它们共同的一步邻居用绿色菱形节点表示;其他的基因用蓝色圆形节点表示,circRNA 用橙色菱形节点表示。图 4(b)举例一个 ceRNA 关系对的 MiRanda 靶点展示。图 4(c)模块中颜色代表 P 值大小。彩图见电子版(http://swxxx.alljournals.cn/ch/index.aspx.2018 年第 4 期)。

2.4.2 模块二

模块二(见图 5(a))包括 41 个节点、44 条边,包含了 22 个 mRNA 和 19 个 circRNA。我们发现了"转化生长因子 β 受体信号通路、淋巴细胞分化正调节、白细胞分化正调节、T 细胞选择阳性、跨质膜导入、白细胞活化负调节、细胞酰胺代谢过程负调节等生物学过程(P值<0.05)。转化生长因子 β1可以改善退变的椎间盘细胞活性,从而刺激胶原基因表达来延缓椎间盘组织的退变,因此对退变早期

的椎间盘尤其是髓核具有修复功能,可逆转椎间盘的退变^[19]。也有实验证实腺病毒载体介导人转化生长因子 β1 基因转染退行性变的椎间盘细胞能够有效提高髓核细胞内转化生长因子 β1 含量,阻逆椎间盘退行性变^[20-22]。

同时椎间盘变性还伴随着相关的炎症和免疫反应,许多文献都指出在腰椎椎间盘突出症中,髓核边缘有明显的炎症和自身免疫反应,在破裂型间盘突出中有比较明显的免疫炎症反应,这种反应的主要

特征是巨噬细胞浸润^[23];髓核组织暴露于自身免疫系统中可以激活 T、B 细胞,引起自身免疫反应,血管内皮生长因子参与了退变椎间盘新生血管的形成,并可能在椎间盘突出与腰腿痛机制中与 T、B 细胞协同作用引起自身免疫反应;髓核边缘有散在的炎性细胞和较多巨噬细胞,但小血管增生和 T 淋巴细胞浸润不明显,提示有炎性反应,但自身免疫反应不如椎间盘突出症明显^[24-25]。这两种免疫调控机制分别与淋巴细胞分化的正向调节、白细胞分化的正向调节、阳性 T 细胞选择有密切联系^[26-30]。

其中参与这些与免疫炎症相关的生物学过程的基因 CD74 已经被文献证实参与了椎间盘内部调控过程。文献[31-34]中解释说明 MIF / CD74 途径可以代表治疗椎间盘退变的关键靶标, MIF 可以通过 CD74 促进炎症反应, 因为用其拮抗剂 ISO-1 抑制 MIF 的功能可以减轻 MIF 诱导的炎症反应并且发挥有效的治疗效果, 以此来减轻椎间盘疾病患者的疼痛,缩短疾病的治愈周期[34-40]。与 CD74 同时富集到几个重要的免疫炎症相关通路的 PRKCZ 基因和他们靶向的 circRNAs (has_circ_0000077, has_circ_0081342, has_circ_0000389, has_circ_0000815) 很可

能同时作用,遵循 ceRNA 的竞争调控关系来引发椎间盘疾病(见图 5(c))。

药物方面有文献证实烟酰胺有助于减轻压力对椎间盘的损伤,能够促进压力损伤后的椎间盘恢复。烟酰胺可以抑制 IL-1β 诱导的椎间盘细胞凋亡,改善 IL-1β 导致的椎间盘能量代谢障碍,烟酰胺可以促进髓核细胞的增殖并抑制白细胞介素 1β 诱导的髓核细胞凋亡,通过对烟酰胺的负调控来影响椎间盘的变性^[41-43]。

模块二中的 CD74 与 has_circ_0001320 也同样可能通过 ceRNA 的关系改变了共表达关系的强度。在正常样本中他们的共表达相关值为 0.868 441,在疾病状态下他们的表达相关值为 -0.049 57。在正常和疾病中同样有着明显的共表达差异,并且由于竞争性关系从负相关变为正相关同样暗示了竞争性RNA 调控机制的表达趋势。他们的超几何 P 值统计学显著为 2.62×10⁻⁶, FDR 矫正值为 0.015 134,表明通过 hsa-miR-17-3p^[44]介导的 CD74 与 has_circ_0001320 有着潜在的 ceRNA 关系(图 5(b))。CD74 基因的 Foldchange 值为 0.389 194 149 在疾病中显著下调。

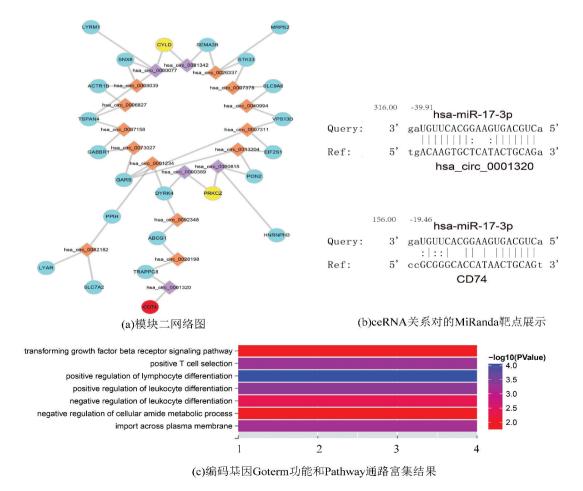


图 5 模块二功能分析图
Fig.5 Functional analysis chart for Module 2

图 5(a)为模块二网络图,我们把文献证明已知疾病相关基因用红色圆形节点表示;把富集到相同生物学过程的基因用黄色圆形节点表示;把黄色和红色节点的一步邻居 circRNAs 用紫色菱形节点表示并且把它们共同的一步邻居用绿色菱形节点表示;其他的基因用蓝色圆形节点表示,circRNA 用橙色菱形节点表示。图 5(b)举例一个 ceRNA 关系对的 MiRanda 靶点展示。图 5(c)模块中所有编码基因 Goterm 功能和 Pathway 通路富集结果,颜色代表 P 值大小。

3 讨论及结论

- 1)没有约束差异基因是为了排除常规差异分析方法的不确定性,以免影响实验结果。取而代之的是分析 circRNA 和 mRNA 之前差异的共表达相关性,从而更准确的分析两者的竞争性关系。
- 2)通过 cytoscape 的一个网络模块挖掘插件识别出了五个与椎间盘变性高度相关的功能模块并且在功能模块中通过网络拓扑关系发现疾病潜在的编码基因和 circRNA。
- 3)改进了单一的共表达方法,更关注于基因在 疾病和差异样本中差异的共表达调控关系。
- 4) 为椎间盘疾病的预测、药物靶点治疗和 cireRNA 功能的探索提供了新思路。

参考文献(References)

- [1] JECK W R, SHARPLESS N E. Detecting and characterizing circular RNAs [J]. Nature Biotechnology, 2014, 32 (5): 453-61. DOI: 10.1038/nbt.2890.
- [2] XU J, LI Y, LU J, et al. The mRNA related ceRNA-ceR-NA landscape and significance across 20 major cancer types
 [J]. Nucleic Acids Research, 2015, 43 (17): 8169-8182.
 DOI: 10.1093/nar/gkv853.
- [3]裴仁全. 椎间盘变性的 MRI 诊断[J]. 实用放射学杂志, 1996,(12):743-746. PEI Renquan. MRI diagnosis of disc degeneration[J]. Jour-

nal of Applied Radiology, 1996, (12):743-746.

- [4]杨立涛, 杜义安, 俞鹏飞, 等. 肿瘤相关 hsa-miR-95-3p 的靶基因预测及生物信息学分析[J]. 肿瘤学杂志 2016,22(5): 374-379. YANG Litao, DU Yian, YU Pengfei, et al. Target gene prediction and bioinformatics analysis of tumor-related hsa-miR-95-3p[J]. Journal of Oncology, 2016,22(5): 374-379.
- [5] HANSEN T B, KJEMS J, DAMGAARD C K. Circular RNA and miR-7 in cancer [J]. Cancer Research, 2013,73(18): 5609. DOI: 10.1158/0008-5472.

- [6]危伟浪,杨俊龙,杜曼莉. 椎间盘突出患者椎间盘蛋白质组学差异比较[J]. 延边医学,2014,(34):89-91. WEI Weilang, YANG Junlong, DU Manli. Comparison of proteomics differences in patients with disc herniation[J]. Yanbian Medical Science, 2014,(34):89-91.
- [7]王海强. MicroRNA-155 调控在人椎间盘退变中的作用研究[D]. 西安: 第四军医大学, 2011. DOI: 10. 7666/d. d219973.
 - WANG Haiqiang. The role of MicroRNA-155 regulation in human intervertebral disc degeneration [D]. Xi'an: Fourth Military Medical University, 2011. DOI: 10.7666/d.d219973.
- [8]周思儒,谢杨丽,黄俊兰,等.FGFR3 在成年期小鼠椎间盘稳态维持中的作用研究[C].天津:中华医学会第五次中青年骨质疏松和骨矿盐疾病学术会议论文集,2013.
 - ZHOU Siru, XIE Yangli, HUANG Junlan, et al. The role of FGFR3 in the maintenance of intervertebral disc in adult mice[J]. Tianjin: Proceedings of the Fifth Young and Middle-aged Osteoporosis and Bone Mineral Disease Conference of the Chinese Medical Association, 2013.
- [9] 周建武. BMPs 在小鼠椎间盘发育中差异表达谱及对椎间盘细胞影响的研究[D].重庆:重庆医科大学,2013. ZHOU Jianwu. Differential expression profile of BMPs in mouse intervertebral disc development and its effect on intervertebral disc cells [D]. Chongqing: Chongqing Medical University,2013.
- [10] VENKATACHALAM K V. Human 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate (PAPS) synthase: Biochemistry, molecular biology and genetic deficiency [J]. IUBMB Life, 2003, 55(1): 1-11. DOI:10.1080/1521654031000072148.
- [11] STELZER C, BRIMMER A, HERMANNS P, et al. Expression profile of Papss2 (3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate synthase 2) during cartilage formation and skeletal development in the mouse embryo [J]. Developmental Dynamics, 2007, 236 (5): 1313 1318. DOI: 10.1002/dvdy.21137.
- [12] IIDA A, SIMSEK-KIPER P O, MIZUMOTO S, et al. Clinical and radiographic features of the autosomal recessive form of brachyolmia caused by PAPSS2 mutations[J]. Human Mutation, 2013,34(10): 1381-6. DOI:10.1002/humu.22377.
- [13] WANG W, YUAN P. PAPSS2 promotes alkaline phosphates activity and mineralization of osteoblastic MC3T3-E1 cells by crosstalk and smads signal pathways [J]. PloS One, 2014, 22(8): e43475. DOI: 10.1371/journal.pone. 0043475.
- [14] HANDA A, THAM E, WANG Z, et al. Autosomal recessive brachyolmia: Early radiological findings [J]. Skeletal Radiology, 2016, 45 (11): 1557 1560. DOI: 10.1007/s00256-016-2458-8.

- [15] CHIBON F, PRIMOIS C, BRESSIEUX J M, et al. Contribution of PTEN large rearrangements in Cowden disease: A multiplex amplifiable probe hybridisation (MAPH) screening approach [J]. Journal of Medical Genetics, 2008, 45 (10): 657-665. DOI:10.1136/jmg.2008.058131.
- [16] FORD-HUTCHINSON A F, ALI Z, SEERATTAN R A, et al. Degenerative knee joint disease in mice lacking 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate synthetase 2 (Papss2) activity: A putative model of human PAPSS2 deficiency-associated arthrosis [J]. Osteoarthritis and Cartilage, 2005, 13 (5): 418–425. DOI:10.1016/j.joca.2004.12.011.
- [17] MIYAKE N, ELCIOGLU N H, IIDA A, et al. PAPSS2 mutations cause autosomal recessive brachyolmia [J]. Journal of Medical Genetics, 2012,49(8): 533-538. DOI:10. 1136/jmedgenet-2012-101039.
- [18] EGUCHI T, WATANABE K, HARA E S, et al. OstemiR: A novel panel of microrna biomarkers in osteoblastic and osteocytic differentiation from mesencymal stem cells [J]. PloS One, 2013, 8 (3): e58796. DOI: 10.1371/journal. pone.0058796.
- [19] 许建文, 熊昌源. 转化生长因子 β1 与椎间盘退变的相关研究[J]. 中国组织工程研究, 2008, 12(20): 3935-3938.
 - XU Jianwen, XIONG Changyuan. Relationship between transforming growth factor β 1 and disc degeneration [J]. Study on Tissue Engineering in China , 2008, 12 (20): 3935–3938.
- [20]杨旸,何晓峰,李彦豪,等. 椎间盘退变的形态学分型中转化生长因子-β1 表达的临床意义[J]. 南方医科大学学报,2012,32(6):897-900.
 - YANG Yang, HE Xiaofeng, LI Yanhao, et al. Clinical significance of transforming growth factor- β 1 expression in morphological classification of intervertebral disc degeneration [J]. Journal of Southern Medical University, 2012,32 (6): 897–900.
- [21] 邵增务, 詹子睿, 熊晓芊, 等. 腺病毒介导转化生长因子 β1 基因阻逆兔椎间盘退行性变的实验[J]. 中国组织工程研究,2005,9(34):99-101.
 - SHAO Zengwu, ZHAN Zirui, XIONG Xiaoqian, et al. Adenovirus-mediated transforming growth factor β 1 gene inhibits the degeneration of intervertebral disc in rabbits [J]. Research on Tissue Engineering in China, 2005, 9 (34): 99–101.
- [22]戴启宇,杨廷桐,于芳芳,等. 退行性变椎间盘组织转 化生长因子 β1 基因的表达[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(24): 4495-4501.DAI Qiyu, YANG Tingtong, YU Fangfang, et al. Expres
 - sion of transforming growth factor β 1 gene in degenerative disc tissue [J]. Research on Tissue Engineering in China, 2013,17(24): 4495–501.
- [23]张威, 赵平. 脊柱关节手法对大鼠椎间盘炎症模型中炎

- 性因子的表达的影响[C]. 上海:中华中医药学会第十 五次中医推拿学术年会论文集,2014.
- ZHANG Wei, ZHAO Ping. Effect of spinal joint manipulation on the expression of inflammatory factors in rat intervertebral disc inflammation model [C]. Shanghai: The 15th Annual Meeting of Chinese Traditional Medicine Massage, 2014.
- [24]李庆庆, 茹选良, 桂先革, 等. 髓核中炎症因子与椎间 盘退变的相关性分析研究[C]. 杭州:浙江省骨科学学 术年会论文集,2014.
 - LI Qingqing, RU Xuanliang, GUI Xiange, et al. Correlation between inflammatory factors and disc degeneration in nucleus pulposus [C]. Hangzhou: Zhejiang Province Orthopaedics Academic Annual Meeting, 2014.
- [25]汪国宏,吴建贤,王明丽,等. 椎间盘源性腰痛的免疫 学及局部炎症机制研究[C]. 上海:中华医学会第九次 全国物理医学与康复学学术会议论文集,2007.
 - WANG Guohong, WU Jianxian, WANG Mingli, et al. Study on immunology and local inflammatory mechanism of discogenic low back pain [C]. Shanghai: Proceedings of the Ninth National Physical Medicine and Rehabilitation Conference of the Chinese Medical Association, 2007.
- [26] VAN RI, VAN LH, BOSBOOM WM, et al. Expression of accessory molecules for T-cell activation in peripheral nerve of patients with CIDP and vasculitic neuropathy [J]. Brain: A Journal of Neurology, 2000, 123 (10): 2020 2029.
- [27] BENEDEK G, ZHU W, LIBAL N, et al. A novel HLA-DRalpha1-MOG-35-55 construct treats experimental stroke [J]. Metabolic Brain Disease, 2014, 29 (1): 37 45. DOI:10.1007/s11011-013-9440-0.
- [28] MOMOI A, TOBA K, KAWAI K, et al. Cutaneous lymphoblastic lymphoma of putative plasmacytoid dendritic cell-precursor origin: Two cases [J]. Leukemia Research, 2002,26(7): 693-698.
- [29] MA M, LUO S, CHEN X, et al. Immune system-related differentially expressed genes, transcription factors and microRNAs in post-menopausal females with osteopenia [J]. Scandinavian Journal of Immunology, 2015, 81(3): 214–220. DOI:10.1111/sji.12266.
- [30] TEMPLETON J P, FREEMAN N E, NICKERSON J M, et al. Innate immune network in the retina activated by optic nerve crush[J]. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 2013, 54(4): 2599-2606. DOI:10.1167/iovs.12-11175.
- [31] CHANG H, SMALLWOOD P M, WILLIAMS J, et al. Intramembrane proteolysis of astrotactins [J]. The Journal of Biological Chemistry, 2017, 292 (8): 3506-3516. DOI: 10.1074/jbc.M116.768077.
- [32] SERKE S, ABE Y, KIRSCH A, et al. Phenotyping of peripheral blood hemopoietic progenitor cells-in vitro cultures

- using CD34-/CD33-immunomagnetic purging[J]. European Journal of Haematology, 1991, 47(5): 361-366.
- [33] DESPLATS P, DUMAOP W, SMITH D, et al. Molecular and pathologic insights from latent HIV-1 infection in the human brain[J]. Neurology, 2013, 80(15): 1415-1423. DOI:10.1212/WNL.0b013e31828c2e9e.
- [34] FAN H, KAO W, YANG Y H, et al. Macrophage migration inhibitory factor inhibits the antiinflammatory effects of glucocorticoids via glucocorticoid-induced leucine zipper [J]. Arthritis & Rheumatology, 2014,66(8): 2059-2070. DOI:10.1002/art.38689.
- [35] XIONG C, HUANG Y, KANG H, et al. Macrophage inhibition factor-mediated CD74 signal modulate inflammation and matrix metabolism in the degenerated cartilage endplate chondrocytes by activating extracellular signal regulated kinase 1/2[J]. Spine, 2017,42(2): E61-E70. DOI: 10.1097/BRS.0000000000001726.
- [36] RAN G, SANTOS L L, NGO D, et al. Macrophage migration inhibitory factor is essential for osteoclastogenic mechanisms in vitro and in vivo mouse model of arthritis [J]. Cytokine, 2015,72(2): 135-145. DOI:10.1016/j.cyto. 2014.11.015.
- [37] HERRERO L J, SHENG K C, JIAN P, et al. Macrophage migration inhibitory factor receptor CD74 mediates alphavirus-induced arthritis and myositis in murine models of alphavirus infection [J]. Arthritis and Rheumatism, 2013, 65(10): 2724-2736. DOI:10.1002/art.38090.
- [38] LENG L, METZ C N, FANG Y, et al. MIF signal transduction initiated by binding to CD74[J]. The Journal of Experimental Medicine, 2003, 197 (11): 1467 1476. DOI:10.1084/jem.20030286.
- [39] XIONG C, HUANG B, CUN Y, et al. Migration inhibitory factor enhances inflammation via CD74 in cartilage end plates with Modic type 1 changes on MRI[J]. Clinical Orthopaedics and Related Research, 2014, 472 (6): 1943-

- 1954. DOI:10.1007/s11999-014-3508-v.
- [40] MUN S H, WON H Y, HERNANDEZ P, et al. Deletion of CD74, a putative MIF receptor, in mice enhances osteoclastogenesis and decreases bone mass [J]. Journal of Bone and Mineral Research: the Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research, 2013, 28(4): 948-959. DOI:10.1002/jbmr.1787.
- [41]徐蔚蔚, 邵增务, 熊蠡茗, 等. 烟酰胺对体外培养兔椎间盘细胞凋亡及能量代谢相关基因表达的影响[J]. 华中科技大学学报(医学版),2009,38(2):141-145. XU Weiwei, SHAO Zengwu, XIONG Liming, et al. Effects of nicotinamide on apoptosis and energy metabolism related gene expression in cultured rabbit intervertebral disc cells in vitro[J]. Journal of Huazhong University of Science and Technology (Medical Edition), 2009,38(2):141-145.
- [42] 周建国, 杨述华, 杨操, 等. 烟酰胺对压力诱发兔腰椎 间盘退变的保护作用[J]. 中国组织工程研究, 2009, 13(33): 6448-6453. ZHOU Jianguo, YANG Shuhua, YANG Cao, et al. Protec-
 - ZHOU Jianguo, YANG Shuhua, YANG Cao, et al. Protective effect of nicotinamide on pressure-induced degeneration of lumbar intervertebral disc in rabbits [J]. Study on Tissue Engineering in China, 2009,13(33):6448-6453.
- [43]熊晓芊,杨述华,邵增务,等.烟酰胺对椎间盘聚集蛋白聚糖的调控作用[J].中国中医骨伤科杂志,2005,13(5):1-4.
 - XIONG Xiaoqian, YANG Shuhua, SHAO Zengwu, et al. Effect of nicotinamide on intervertebral disc aggregation proteoglycan [J]. Chinese Journal of Orthopaedics and Trauma, 2005,13(5): 1-4.
- [44] DERNOWSEK J A, PEREIRA M C, FORNARI T A, et al. Posttranscriptional interaction between mir-450a-5p and mir-28-5p and stat1 mrna triggers osteoblastic differentiation of human mesenchymal stem cells[J]. Journal of Cellular Biochemistry, 2017,118(11): 4045-4062. DOI:10. 1002/jcb.26060.