

综述

基因芯片表达谱在椎间盘退变领域应用的研究进展

Research progress of gene and protein pattern in intervertebral disc degeneration

于彬, 李新华, 陈兆雄, 巴兆玉, 刘忠汉, 袁静, 祝建光, 吴德升

(同济大学附属东方医院脊柱外科 200120 上海市)

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2017.07.13

中图分类号: R681.5, Q786 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2017)-07-0652-05

椎间盘退变是指椎间盘自然老化、退化的生理病理过程, 它是一系列脊柱退行性疾病的病理基础, 可引起椎管狭窄、脊柱节段不稳、骨赘形成, 导致腰腿痛、椎间盘突出及神经根或脊髓压迫。对椎间盘退变引起的脊柱疾患可采用保守或手术治疗。脊柱融合术是目前治疗椎间盘退变引起的椎间盘突出、椎管狭窄等相关疾病的“金标准”, 但会改变脊柱生物力学结构, 加速邻近节段退变, 甚至有再次手术的风险。因此, 明确椎间盘退变发病机制, 对相关疾病的诊断和治疗具有重要意义。20 世纪 60 年代起, 国内外学者开始研究椎间盘退变的病因, 但至今确切机制仍不清楚。有研究^[1]表明, 椎间盘退变过程中出现许多细胞事件的异常, 如椎间盘髓核细胞凋亡数量增加、各种炎症因子和基质金属蛋白酶类表达量增多等^[2]。这一系列变化提示椎间盘内特定分子基因表达失调, 进而导致各层次调节因素发生变化^[3]。

基因芯片技术是伴随着人类基因组计划而实施的生命科学领域当中的前沿性生物技术之一, 具有高集成、高通量、微型化、多样化以及自动化等特点。目前基因芯片已经在基因的表达分析、疾病的基因诊断、药物的基因组学等诸多领域发挥着重要的作用, 在未来的生物技术中具有巨大的应用前景。随着基因芯片及其相关衍生技术的发展, 很多疾病通过此方法找到了其特异的疾病诊断标志物或者其致病的关键基因, 为生命科学和人类战胜疾病做了很大的贡献^[4]。

本世纪初, 基因与蛋白芯片, 逐渐被运用于椎间盘退变领域的相关研究, 为椎间盘退变的发病机制研究带来巨大的推动作用。目前, 基因芯片技术在椎间盘退变领域应用仍然处于初级阶段, 尚无相关文献在相关领域进行总结, 为了使今后研究方向更加明确, 本文对目前在椎间盘退变领域运用 mRNA 与蛋白芯片方法在进行椎间盘发病

机制分析的相关研究进行综述, 为研究相关基因或者蛋白在椎间盘退变中的作用提供理论依据, 为阐述椎间盘退变的发病机制提供新的思路。

1 小鼠的椎间盘蛋白表达谱分析

McCann^[5]对 14 周龄小鼠的椎间盘用液相色谱法进行蛋白组学分析, 总共发现 1940 种蛋白。这些蛋白根据细胞结构来分, 主要分为与细胞膜、细胞器、大分子复合物、细胞外区域蛋白相关蛋白。根据其参与的生物学功能不同, 主要可以分为与代谢相关、细胞生长相关、发育相关蛋白。根据蛋白参与代谢途径不同可以分为催化活性类蛋白, 分子黏附类蛋白等。作者在小鼠椎间盘蛋白表达谱中找到 14 个被证实的与椎间盘发育相关的基因。比如 Wnt 诱导信号通路蛋白 1 (Wnt inducible signaling pathway protein 1, WISP1)、丝裂素活化蛋白激酶磷酸酶 1 (Dusp1 specificity phosphatase 1, Dusp1)、活化 T 细胞核因子 5 (nuclear factor of activated T-cells 5, NFAT5) 基因分别与之前报道过人的椎间盘中与发育相关的 WISP2、Dusp27、NFAT1 基因相对应^[6]。作者也在蛋白的表达谱中发现了富含半胱氨酸的分泌型酸性蛋白 (secreted protein acidic and rich in cysteine, Sparc)、利尿钠肽受体 3 (natriuretic peptide receptor 3, Npr3) 等椎间盘特异表达蛋白。有研究表明, Sparc 基因敲除小鼠会导致椎间盘楔形样变, 出现终板硬化和钙化^[7]; Npr3 突变的小鼠会出现髓核缺如或变薄, 小鼠出生到 21d 常常出现背侧纤维环钙化^[8]。同时, 作者也发现一些基因在小鼠与人的表达有显著差异, 比如层粘连蛋白在人的椎间盘内高度表达, 但是在作者的小鼠椎间盘内几乎没检测到^[9]。可以看出小鼠的椎间盘与人的椎间盘既存在区别也存在联系。目前国内外许多椎间盘的研究均在小鼠身上进行, 对小鼠椎间盘进行的表达谱分析研究并且与正常人的椎间盘的相关表达基因进行对比, 有利于椎间盘发育与退变研究, 为椎间盘退变的种属区别的方面提供新的依据与方向。

2 人椎间盘基因芯片表达谱分析

第一作者简介: 女 (1981-), 主治医师, 医学博士, 研究方向: 脊柱外科

电话: (021)38804518-22025 E-mail: yubin200445@sina.com

通讯作者: 吴德升 E-mail: eastspinesci@163.com

2.1 人的退变椎间盘与正常椎间盘的差异表达基因分析

Chen 等^[9]利用基因芯片的方法比较不同椎间盘退变程度的基因表达差异,发现 2 个基因在椎间盘退变 II 级与 III 级之间存在明显差异;8 个基因在 II 级和 IV 级之间存在显著差异。通过构建差异基因网络分析,Chen 等发现丝裂原激活的蛋白家族和 Rho 家族基因在椎间盘的进展中发挥重要作用,尤其是丝裂原激活的蛋白家族中的有丝分裂原活化蛋白激酶 6 (Mitogen-activated protein kinase kinase 6, MAP2K6) 和 Rho 家族中的 Rho 相关结构域 BTB 蛋白质 2 (Rho-related BTB domain-containing 2, RHOBTB2) 基因。MAP2K6 基因的磷酸化主要与炎症、环境应力,应力介导的细胞周期停滞,转录激活密切相关,MAP2K6 基因在磷酸化后还能通过上调 P38 丝裂原活化蛋白激酶 (P38 mitogen activated protein kinase, P38MAPK) 导致 MAPK 相关信号通路的激活。另外,MAP2K6 基因同时也是激活 Wnt/ β -catenin 通路的关键分子,目前,该信号通路被认为与椎间盘退变密切相关。RHOBTB2 基因是 Rho 家族重要组成部分。Rho 家族是参与细胞形状,运动能力,收缩性密切相关的表面受体作用的重要调节分子。Freeman 等^[10]发现 RHOBTB2 基因在细胞的有丝分裂期发挥重要作用。短期内过表达 RHOBTB2 基因能加速细胞周期的进程和促进细胞增殖,但是长期过表达该基因则对细胞的增殖不利。Chen 等还通过基因网络分析也发现, RHOBTB2 基因主要参与调控椎间盘细胞的细胞周期,细胞凋亡,细胞骨架和细胞膜运输等功能。

Ji 等^[11]用基因芯片的方法比较正常与退变椎间盘的基因表达情况,发现有 243 个基因在退变椎间盘表现为上调,351 个基因表现为下调。Ji 等发现钙调节信号相关分子在退变的椎间盘内表达显著增多。生物信息学分析显示:黏附连接相关功能信号通路、钙转运信号通路、notch 信号通路、胰腺分泌相关因子参与的相关信号通路和脂类代谢信号通路可能在椎间盘退变中发挥重要作用。另外,作者发现有数个基因在退变椎间盘内表达显著升高,比如转录因子激活蛋白-2 α (transcription factor AP-2 alpha, TFAP2A), E2F4, 特异蛋白 3 (specificity protein 3, SP3), 磷酸化酪氨酸蛋白激酶 (proto-oncogene tyrosine-protein kinase, FYN), PRKCD, YWHAB, YWHAZ 和雄激素受体 (androgen receptor, AR) 基因等。在高表达的基因中,TFAP2A 被认为是与 DNA 复制和脂肪细胞分化密切相关的转录因子。在斑马鱼体内,敲除 TFAP2A 可以使斑马鱼的肌肉退变萎缩,使斑马鱼体内出现白细胞浸润^[12]。E2F4 则是在退变神经元的进行增殖调节的转录调节因子^[13]。通过转录因子的靶向网络分析,Ji 等^[11]认为 TFAP2A、E2F4、SP3 和 AR 可以通过激活丝裂原激活的蛋白家族、血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF)、P53 相关基因来介导椎间盘退变;P53 主要是调节椎间盘细胞的增殖与凋亡,VEGF 主要是在白介素刺激下表现上调,其与退变椎间盘血管生成与长入密切相关。

Yang 等^[14]分别分析了纤维环与髓核在退变的椎间盘与正常椎间盘的基因芯片。总共发现 326 个基因在纤维环表达有差异,35 个基因在髓核组织中表达有差异。在髓核组织中,差异基因主要参与细胞的翻译、黏附、死亡过程的调节,其中还有与骨骼系统的发育密切相关的基因。在纤维环中,差异基因主要是参与血管系统发育、骨骼系统的发育、酶相关受体蛋白的信号通路等过程。Yang 等发现 III 型胶原蛋白 A1 (collagen type III alpha 1, COL3A1) 是髓核和纤维环内最常见的差异基因。目前研究发现, COL3A1 与多种疾病的发生密切相关,比如,动脉瘤、血管相关的并发症、肾脏疾病等。研究表明 COL3A1 与骨骼系统的生物学过程密切相关,其异常表达可能与腰椎的运动相关^[15]。他的观点获得 Videman 等的研究的支持,Videman^[16]认为包括 COL3A1 在内的数个基因在椎间盘退变中有重要作用。但是,O'connell 等^[17]的研究表明,COL3A1 的表达与腰椎的运动没有关系,他认为 COL3A1 可能和数个基因共同作用发挥对椎间盘退变的调节作用。O'connell 等还发现,核糖体蛋白的基因编码 (RPL8, RPS16, 和 RPS23) 在退变的椎间盘中存在高表达。COL3A1 是近年来椎间盘退变研究的热门基因之一^[14],其在椎间盘退变的作用目前仍然不清楚,作者运用基因芯片方法发现其在退变的椎间盘内存在差异表达不仅验证基因芯片作为椎间盘退变研究的科学性与可靠性,同时还通过生物信息学分析,找出了 COL3A1 可能发挥作用的相关信号通路分子,这为 COL3A1 在椎间盘的研究指明了方向。

胡明等^[18]运用基因芯片和生物信息学方法对人退变的椎间盘与非退变的椎间盘分析发现,在退变椎间盘内有 358 个基因表达明显下调,298 个基因显著上调。在对差异的表达基因进行分析后发现,在退变椎间盘组织中参与细胞凋亡相关的基因,上皮细胞膜蛋白基因,细胞外基质,细胞骨架和运动蛋白相关编码基因表达明显增加。其中 I 型胶原相关基因、III 型胶原相关基因、V 型胶原相关基因表达明显上调,VI 型胶原相关基因、IX 型胶原相关基因表达明显下调,提示在退变椎间盘组织中胶原类型发生很大的变化,其反映退变椎间盘存在椎间盘退变和修复的动态过程。胡明等还发现有许多信号转导相关基因在退变椎间盘组织中呈现差异表达,其中与细胞因子相关的高表达的主要基因有转化生长因子 β 受体 I (transforming growth factor beta receptor-I, TGF- β RI)、成纤维细胞生长因子受体 1 (type 1 fibroblast growth factor receptor, FGFR1)、FGFR2;表达降低的有 EGFR。

曲志刚^[19]运用基于自然语言处理方法的文本挖掘技术对已有的数据库样本分析,发现总共有 555 个基因在退变椎间盘中高表达。其中无孢蛋白 (Asporin) 在退变椎间盘内表达最高。Asporin 常表达于软骨细胞外基质中,并且发现其与骨关节疾病有着密切关系^[20],最近的研究^[21]发现,Asporin 能抑制椎间盘的退化。高温相关丝氨酸蛋白酶 A1 (high-temperature requirement protein A1, HTRA1) 是一

个高度保守的丝氨酸蛋白酶,该作者发现其在退化的椎间盘组织中处于高表达状态^[22]。组织蛋白 K (Cathepsin K) 是一个半胱氨酸蛋白酶,在椎间盘由Ⅱ级向Ⅲ级退化过程中富集表达最为显著^[23]。作者对高表达的基因进行功能富集分析发现这些差异基因与膜结合小泡钙离子结合蛋白和胞外基质密切相关。蛋白相互作用分析显示这些差异表达的基因包括纤连蛋白基因和 β -连环蛋白基因。纤连蛋白 1 (fibronectin 1, FN1)、COL2A1 和 β -连环素 (β -catenin, CTNNB1) 是连接度最高的三个基因。早期的研究也表明, FN1 的断裂碎片 (FN-f) 在腰椎间盘退变性疾病的发生过程中逐渐积聚。COL11A1、COL1A2、COL3A1 和 COL2A1 四个基因在椎间盘退变组织中也表达上调。COL2A1 参与一系列的功能调控,在软骨和骨的相关疾病的发生发展中起着相当重要的作用,研究表明 COL2A1 与骨性关节炎密切相关^[24]。作者还通过小鼠基因数据库 (mouse genome informatics, MGI) 中 MP 与突变基因的关系谱,得到腰椎间盘退变性疾病的 36 个突变基因,并利用 DAVID 在线工具对 36 个基因的 GO 生物学过程进行富集分析发现,36 个突变基因的生物学过程主要集中在骨骼系统发育、骨骼系统形态变化、胚胎发育、胚胎形态变化、胚胎骨骼系统形态变化等通路。作者还通过对网络进行了模块分析,得到了以叉头框蛋白 (fork-head box protein C2, Foxc2)、硫酸乙酰肝素蛋白多糖 2 (heparan sulfate proteoglycan 2, HSPG2) 和蛋白聚糖 (aggrecan, Acan) 为中心基因的网络模块。Foxc2 被认为是在早期组织器官的形成中发挥重要作用的基因^[25], Foxc2 与椎间盘的关系目前相关的研究还比较少,作者通过相关功能分析,认为 MAPK 信号通路和免疫系统相关的通路 NOD 样受体信号通路与 Foxc2 有关。Hspg2 全称为硫酸类肝素蛋白多糖,相关的报道其与迟发型运动障碍有关,很多研究表明^[26], Hspg2 与椎间盘突出的发生密切相关。Acan 蛋白是聚集蛋白聚糖/多功能蛋白聚糖家族成员的一员。Acan 编码的基因是细胞外基质蛋白的重要组成部分,在参与软骨组织的构成及抵抗软骨对压力的防御方面发挥重要的作用。

2.2 正常与退变的椎间盘蛋白芯片结果及分析

Ye 等^[27]通过比较与分析体外培养正常与退变的椎间盘细胞的蛋白芯片发现,在退变的椎间盘纤维环细胞中有 3 个蛋白表达升高,7 个蛋白表达下降。表达升高的蛋白分别是分子量为 71kD 的热休克蛋白、6-磷酸葡萄糖酶脱氢酶-1、钙粘蛋白 2,3; 下调的蛋白包括鸟嘌呤核苷酸结合蛋白 G、超氧化物歧化酶歧化酶、跨膜蛋白 51、腺苷受体 A3、26s 的蛋白酶调节亚基-8、LPPR2、FAR1。6-磷酸葡萄糖酶脱氢酶-1 的表达升高表明退变的椎间盘纤维环细胞存在过氧化的时期; GNAI2、鸟嘌呤核苷酸结合蛋白 G、腺苷受体 A3 的表达降低表明纤维环细胞的 G 蛋白跨膜转运系统在椎间盘退变时受到严重的影响。

目前认为细胞的增殖与凋亡异常,炎症因子和蛋白水解酶类的表达增多,血管生成与长入均为椎间盘退变中

比较典型的变化,上述基因芯片与表达谱的结果不仅是对上述结果的基因水平进行佐证^[3]。同时我们也发现一些新的基因与蛋白在退变与正常椎间盘表达中和在不同的椎间盘退变水平均存在显著差异表达,例如上述相关研究中提到的: TFAP2A、E2F4、SP3、AR、MAP2K6、COL11A1、COL1A2、COL3A1、COL2A1、Asporin、Foxc2、Hspg2 和 Acan 等基因或者相关的信号通路。虽然如此,但是基因芯片的结果往往存在一定的假阳性率,需要 PCR、Western 等常规与经典的分子生物学技术进行进一步的验证,但这些基因的发现为椎间盘的后续研究提供新的方向与思路。

3 干预后椎间盘细胞的基因芯片表达谱结果及分析

3.1 渗透压改变后椎间盘细胞的基因芯片表达谱结果及分析

渗透压^[28]是与椎间盘退变关系密切的因素,长期保持高渗状态可以诱导椎间盘退变。Jiang 等^[29]比较 9 个经过高渗处理与 7 个等渗条件下的椎间盘细胞的基因芯片结果发现,在高渗处理的椎间盘细胞有 45 个基因存在差异表达,其中 21 个基因上调,24 个下调基因。作者发现 PSMB5 与 PSMA4 的表达在高渗处理的椎间盘内显著上调。之前有研究发现 PSMB5 与 PSMA4 是决定细胞的存活的关键基因;在此样本中发现其表达的上调,可以推断细胞在经历高渗处理后,细胞活性、性质等发生了很大改变。APEX 被认为是在 DNA 修复中发挥重要作用的基因,作者也发现它在处理组存在显著上调,这表明椎间盘细胞在经过高渗处理后可能发生了 DNA 的损伤。同时作者还发现了 SKP1、CD44、CD59 等表达下调的基因。SKP1^[30]是在退变椎间盘下调最为显著的基因,它在调节蛋白的泛素化中发挥重要作用,它的下调可能与椎间盘退变时蛋白水解增多密切相关。CD44 是细胞表面糖蛋白,它能调节细胞的黏附与迁移过程,CD59 是参与细胞杀菌的表面糖蛋白。这些蛋白的下调表明细胞在高渗状态下,细胞粘附,迁移,灭菌的能力显著降低。

渗透压的稳定是椎间盘维持其正常生理功能与生长的重要内环境,也是退变椎间盘与正常椎间盘结构等最重要生理与病理变化之一^[28],利用渗透压得改变对椎间盘细胞的干预,找出其差异表达基因对椎间盘的研究具有重要的意义。

3.2 炎症因子处理后椎间盘细胞的 mRNA 基因芯片结果及分析

TNF- α 被认为是退变椎间盘细胞内表达关键的炎症因子。Liu 等^[31]利用基因芯片和生物信息学分析的方法发现,在经过 TNF- α 处理和未处理组的椎间盘细胞之间有显著的差异。作者发现经过 TNF- α 处理的椎间盘细胞有 458 个基因存在上调,295 个基因存在下调,在表达上调的基因中, MMP1 增高 25.5 倍, NF- κ B 相关基因增加 9.3 倍, ADAMTS6 基因表达增加 3.57 倍。基因功能注释发现,这些基因主要与细胞外基质,损伤反应,炎症反应或者

细胞的凋亡调节密切相关。信号通路分析表明,这些差异表达的基因主要与细胞因子的相互作用、凋亡、NOD 样受体、趋化因子和其他的信号转导通路密切相关。网络分析表明,JUN,CCL3,ANKH 这三个基因可能在椎间盘退变中发挥重要作用。作者发现 CCL3 基因在处理组增加 77.9 倍。CCL3 是免疫与炎症反应密切相关的基因,其是 MAPK、NF- κ B 和 C/EBP β 共同的下游分子。CCL3 基因能够通过促进 CCL1 的表达来促进巨噬细胞的聚集,从而引导一系列的炎症反应。ANKH 在 TNF- α 处理的椎间盘细胞中下调 3.2 倍。ANKH 基因能编码跨膜蛋白,能转导细胞内的磷酸离子到细胞外,以此来影响细胞外磷的浓度与钙离子浓度平衡。Ho 发现^[32],ANKH 基因敲除的老鼠能逐渐出现四肢关节与脊柱的强直,还可以出现脊柱韧带和椎间盘的钙化。在转导野生型的到 ANKH 基因敲除的小鼠,ANKH 蛋白的功能获得恢复,骨和关节的异常钙化能减少或者消除。

TNF- α 等炎症因子在退变的椎间盘内显著升高,被认为是引起椎间盘退变诸多病理变化和患者疼痛的主要原因,目前是椎间盘退变的研究细胞水平最广泛运用的造模因子之一^[31]。因此,作者运用 TNF- α 刺激椎间盘细胞,观察细胞的基因等的表达变化,并找出可能的差异基因,这对椎间盘细胞体外退变模型研究有重要意义。同时作者也发现数个潜在与椎间盘退变的相关基因,这也为椎间盘退变的研究指明了新的方向。

4 钙化椎间盘 mRNA 测序与生物信息学分析

Shao 等^[33]分别对 6 个伴有钙化和不伴有钙化的突出的椎间盘进行测序和生物信息学分析,并且其测序结果用 RT-PCR 进行验证。结果发现,在钙化的椎间盘内有 129 个基因高表达,3 个基因低表达。其中 3 个差异最显著的基因是 SOST、WIF1、SFRP4,这些都与 Wnt 通路抑制相关的基因。作者用 RT-PCR 验证发现在钙化的椎间盘内,有 6 个基因呈现显著的高表达:SOST、IGJ、DEFA4、SFRP4、PRTN3 和 CTSG。SOST 是钙化椎间盘差异最显著的基因。SOST 是骨细胞分泌硬骨素的编码序列,硬骨素是终末期骨细胞的重要标志物。早期的研究表明^[34]硬骨素是 BMP 受体抑制剂,它可以抑制骨细胞的分化和 BMP 介导的成骨。然而,有一些研究也表明^[35],硬骨素的抑制成骨效应主要通过激活 Wnt 信号通路。作者发现 BGLAP 也在钙化的椎间盘内呈高表达,它是骨钙素蛋白的编码序列,也是骨细胞终末期分泌的标志物。作者认为 BGLAP 与 SOST 的出现表明椎间盘的钙化不是营养不良性钙化而是骨细胞参与的成骨过程,这与之前的研究相符。作者通过 KEGG 通路分析表明,钙化的椎间盘最高表达的信号通路是感染与炎症相关。椎间盘钙化是临床常见的问题,作者利用临床标本进行分析,首先炎症是椎间盘钙化的缘由,同时结合生物信息学分析发现并且指出钙化的出现可能椎间盘感染与炎症的结果,这些在椎间盘钙化的研究均有十分重

要的意义。

5 展望

基因芯片,蛋白芯片,深度测序等结合生物信息学分对疾病的分析与研究被认为是 21 世纪生物医学领域的一大突破。椎间盘退变作为一种由多种因素引起的疾病,这些方法的出现无疑为寻找椎间盘退变的发病机制指明新的方向。本文仅对 mRNA 和蛋白水平的基因芯片,蛋白芯片,深度测序相关文章进行综述,随着非编码 RNA 研究的不断深入,micorRNA 与 LncRNA 等基因芯片表达谱在椎间盘退变研究领域正被广泛运用,为椎间盘退变的研究带来很大进步^[36-38]。

6 参考文献

- 魏见伟,王德春,胡有谷. 基质金属蛋白酶及其抑制因子与腰椎间盘退变关系的研究进展[J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2006, 16(4): 304-306.
- 陈琪马,杨曦,刘立岷,等. 缺氧诱导因子对椎间盘调控作用的研究现状[J]. 中国修复重建外科杂志, 2016, 30(10): 1295-1300.
- 李新华,崔健,孙贵新,等. 微小 RNA 在椎间盘退变中的研究进展[J]. 中国修复重建外科杂志, 2015, 29(10): 3107-3112.
- 张帆卢,张其鹏,等. 用生物信息学方法预测与心血管疾病相关的微 RNAs[J]. 北京大学学报(医学版), 2009, 41(1): 112-116.
- McCann MR, Patel P, Frimpong A, et al. Proteomic signature of the murine intervertebral disc[J]. PLoS One, 2015, 10(2): e0117807.
- Sohn P, Cox M, Chen D, et al. Molecular profiling of the developing mouse axial skeleton: a role for Tgfb β 2 in the development of the intervertebral disc[J]. BMC Dev Biol, 2010, 10: 29.
- Gruber HE, Sage EH, Norton HJ, et al. Targeted deletion of the SPARC gene accelerates disc degeneration in the aging mouse[J]. J Histochem Cytochem, 2005, 53(9): 1131-1138.
- Jaubert J, Jaubert F, Martin N, et al. Three new allelic mouse mutations that cause skeletal overgrowth involve the natriuretic peptide receptor C gene (Npr3)[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999, 96(18): 10278-10283.
- Chen Y, Chen K, Li M, et al. Genes associated with disc degeneration identified using microarray gene expression profiling and bioinformatics analysis[J]. Genet Mol Res, 2013, 12(2): 1431-1439.
- Freeman SN, Ma Y, Cress WD. RhoBTB2 (DBC2) is a mitotic E2F1 target gene with a novel role in apoptosis [J]. J Biol Chem, 2008, 283(4): 2353-2362.
- Ji SC, Han N, Liu Y, et al. Identification of genes associated with disc degeneration using bioinformatics [J]. Biotech Histochem, 2015, 90(5): 353-360.
- Walters KB, Dodd ME, Mathias JR, et al. Muscle degenera-

- tion and leukocyte infiltration caused by mutation of zebrafish Fad24[J]. *Dev Dyn*, 2009, 238(1): 86–99.
13. Gaubatz S, Lindeman GJ, Ishida S et al. E2F4 and E2F5 play an essential role in pocket protein-mediated G1 control [J]. *Molecular cell*, 2000, 6(3): 729–735.
 14. Yang Z, Chen X, Zhang Q, et al. Dysregulated COL3A1 and RPL8, RPS16, and RPS23 in Disc Degeneration Revealed by Bioinformatics Methods[J]. *Spine(Phila Pa 1976)*, 2015, 40(13): E745–751.
 15. Battie MC, Levalahti E, Videman T, et al. Heritability of lumbar flexibility and the role of disc degeneration and body weight[J]. *J Appl Physiol*(1985), 2008, 104(2): 379–385.
 16. Videman T, Saarela J, Kaprio J, et al. Associations of 25 structural, degradative, and inflammatory candidate genes with lumbar disc desiccation, bulging, and height narrowing [J]. *Arthritis Rheum*, 2009, 60(2): 470–481.
 17. O'Connell K, Posthumus M, Collins M. No association between COL3A1, COL6A1 or COL12A1 gene variants and range of motion[J]. *J Sports Sci*, 2013, 31(2): 181–187.
 18. 胡明张, 张传森, 陈道运, 等. 人退变椎间盘组织的基因表达谱[J]. *解剖学杂志*, 2004, 27(4): 348–352.
 19. 曲志刚. 基于文本挖掘技术和芯片分析技术的腰椎间盘退变机制的研究[D], 吉林大学, 2013.
 20. Henry SP, Takanosu M, Boyd TC, et al. Expression pattern and gene characterization of asporin. a newly discovered member of the leucine-rich repeat protein family [J]. *The Journal of biological chemistry*, 2001, 276(15): 12212–1221.
 21. Tian W, Zheng S, Jiang XZ, et al. Asporin, a candidate protein for treatment of disc degenerative disease [J]. *Chin Med J(Engl)*, 2013, 126(2): 369–372.
 22. Tiaden AN, Klawitter M, Lux Vet al. Detrimental role for human high temperature requirement serine protease A1 (HTRA1) in the pathogenesis of intervertebral disc (IVD) degeneration[J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(25): 21335–21345.
 23. Gruber HE, Ingram JA, Hoelscher GL, et al. Constitutive expression of cathepsin K in the human intervertebral disc: new insight into disc extracellular matrix remodeling via cathepsin K and receptor activator of nuclear factor- κ B ligand[J]. *Arthritis Res Ther*, 2011, 13(4): R140.
 24. Kannu P, Bateman JF, Randle S, et al. Premature arthritis is a distinct type II collagen phenotype[J]. *Arthritis Rheum*, 2010, 62(5): 1421–1430.
 25. Cederberg A, Gronning LM, Ahren B. FOXC2 is a winged helix gene that counteracts obesity, hypertriglyceridemia, and diet-induced insulin resistance[J]. *Cell*, 2001, 106(5): 563–573.
 26. Yagi K, Satou Y, Mazet F, et al. A genomewide survey of developmentally relevant genes in *Ciona intestinalis*. III. Genes for Fox, ETS, nuclear receptors and NF κ B [J]. *Dev Genes Evol*, 2003, 213(5–6): 235–244.
 27. Ye D, Liang W, Dai L, et al. Comparative and quantitative proteomic analysis of normal and degenerated human annulus fibrosus cells[J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2015, 42(5): 530–536.
 28. Chen J, Baer AE, Paik PY, et al. Matrix protein gene expression in intervertebral disc cells subjected to altered osmolarity[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 293(3): 932–938.
 29. Jiang K, Li Y, Cao GY, et al. Screening of genes related with intervertebral disc disease by dynamic differential interaction network analysis[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2013, 17(23): 3186–3191.
 30. Schulman BA, Carrano AC, Jeffrey PD, et al. Insights into SCF ubiquitin ligases from the structure of the Skp1–Skp2 complex[J]. *Nature*, 2000, 408(6810): 381–386.
 31. Liu C, Fei HD, Sun ZY, et al. Bioinformatic analysis of the microarray gene expression profile in degenerative intervertebral disc cells exposed to TNF- α [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2015, 19(18): 3332–3339.
 32. Ho AM, Johnson MD, Kingsley DM. Role of the mouse ank gene in control of tissue calcification and arthritis[J]. *Science (New York, NY)*, 2000, 289(5477): 265–270.
 33. Shao J, Yu M, Jiang L, et al. Sequencing and bioinformatics analysis of the differentially expressed genes in herniated discs with or without calcification[J]. *Int J Mol Med*, 2017, 39(1): 81–90.
 34. Hsieh JC, Kodjabachian L, Rebbert ML, et al. A new secreted protein that binds to Wnt proteins and inhibits their activities[J]. *Nature*, 1999, 398(6726): 431–436.
 35. Takae R, Matsunaga S, Origuchi N, et al. Immunolocalization of bone morphogenetic protein and its receptors in degeneration of intervertebral disc[J]. *Spine(Phila Pa 1976)*, 1999, 24(14): 1397–401.
 36. Chen WK, Yu XH, Yang W, et al. lncRNAs: novel players in intervertebral disc degeneration and osteoarthritis[J]. *Cell Prolif*, 2015, 50(1). doi: 10.1111/cpr.12313.
 37. Chen Y, Ni H, Zhao Y, et al. Potential Role of lncRNAs in Contributing to Pathogenesis of Intervertebral Disc Degeneration Based on Microarray Data [J]. *Med Sci Monit*, 2015, 21: 3449–3458.
 38. Wan ZY, Song F, Sun Z, et al. Aberrantly expressed long noncoding RNAs in human intervertebral disc degeneration: a microarray related study[J]. *Arthritis Res Ther*, 2014, 16(5): 465.

(收稿日期:2017-03-09 修回日期:2017-05-09)

(本文编辑 彭向峰)