

· 基础研究 ·

肿瘤坏死因子- α 相关椎间盘退变基因表达的生物信息学分析

柳超, 曹磊, 王德国*

(上海市松江区中心医院骨科, 上海 201600)

摘要: [目的] 研究肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 相关退变椎间盘基因表达谱芯片数据, 应用生物信息学方法挖掘 TNF- α 刺激后退变椎间盘的关键差异基因, 初步探讨其相关信号通路及相互作用网络, 为椎间盘退变分子机制研究提供线索。[方法] 在公共数据库 GEO (Gene Expression Omnibus) 中下载 TNF- α 刺激后退变椎间盘的基因芯片数据, 通过 R 语言筛选出 TNF- α 刺激后退变椎间盘细胞的差异表达基因, 利用 DAVID、STRING 在线工具对差异表达基因进行基因本体、信号通路及相互作用网络的分析。[结果] 在 TNF- α 刺激后的退变椎间盘纤维环细胞中共找到 754 条关键差异表达基因, 其中上调 461 条, 下调 293 条; 基因本体注释分析表明这些差异表达基因主要与细胞外基质、损伤反应、炎症反应、凋亡调控等相关; 信号通路分析表明这些差异表达基因主要涉及到细胞因子相互作用、凋亡、NOD 样受体、趋化因子转导等信号通路; 相互作用网络分析表明 JUN、CCL3、ANHK 等基因可能在椎间盘退变中起关键作用。[结论] 应用生物信息学方法分析 TNF- α 刺激后退变椎间盘基因表达谱发现 CCL3 等基因可能通过炎症反应在椎间盘退变的发生发展中起一定作用, 生物信息学方法可发现一些潜在靶基因, 为椎间盘退变的研究提供新的思路。

关键词: 椎间盘退变, TNF- α , 基因表达谱, 生物信息学

中图分类号: R738.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1005-8478 (2022) 13-1204-05

Bioinformatics analysis of the gene expression profile in human degenerative disc cells exposed to TNF- α // LIU Chao, CAO Lei, WANG De-guo. Department of Orthopaedics, The Central Hospital of Songjiang District, Shanghai 201600, China

Abstract: [Objective] To reveal the key differentially expressed genes and regulatory mechanisms associated with tumor necrosis factor- α (TNF- α) in human degenerative intervertebral disc by analyzing microarray data using bioinformatics, and to explore the related signaling pathways and interactions network, providing clues for future investigations on the molecular mechanisms of disc degeneration. [Methods] The microarray data on degenerative intervertebral disc after stimulation with TNF- α were downloaded from the public database GEO (Gene Expression Omnibus), to find the differentially expressed genes between degenerative disc cells and those stimulated with TNF- α by a screening tool, and the analyses on gene ontology, signaling pathways and interaction networks for differentially expressed genes were conducted using DAVID, STRING and other online tools. [Results] A total of 754 key differentially expressed genes were found in degenerated annulus fibroblasts stimulated by TNF- α , of which 461 were up-regulated and 293 were down-regulated. In term of gene ontology annotation analysis, these differentially expressed genes were mainly related to extracellular matrix, injury reaction, inflammation, apoptosis regulation. In term of signal pathway analysis, these differentially expressed genes were mainly related to signal pathways such as cytokine interaction, apoptosis, NOD-like receptors, chemokine transduction. In term of interaction network analysis, genes, such as JUN, CCL3 and ANHK may play a key role in the intervertebral disc degeneration. [Conclusion] It has found that CCL3 and other genes may play a certain role in the development of disc degeneration by inflammatory reactions using bioinformatics analysis of gene expression profiling of degenerative intervertebral disc stimulated by TNF- α , suggesting that bioinformatics methods can find a number of potential target genes to provide new ideas for the research of degenerative intervertebral disc.

Key words: disc degeneration, TNF- α , gene expression profiling, bioinformatics

椎间盘退变是指椎间盘各组织的老化退变, 是一系列脊柱退行性疾病诸如椎间盘突出、椎管狭窄、脊

DOI:10.3977/j.issn.1005-8478.2022.13.11

作者简介: 柳超, 博士, 研究方向: 脊柱外科, (电话)13761396909, (电子信箱)ortholiuchao@163.com

* 通信作者: 王德国, (电话)021-67720001, (电子信箱)wangdeguo@live.cn

柱不稳的前提和基础病理过程，临床上常表现为颈腰痛及神经症状，严重威胁健康和正常生活^[1]。椎间盘退变是多因素共同作用的结果，一般认为年龄、机械应力、生活方式等是其致病因素，但上述因素并不能很好地解释椎间盘退变的发生、发展过程^[2]。近年来研究发现椎间盘微环境中异常病变及不平衡，尤其是炎症因子如 IL-1 β 、TNF- α 等参与了椎间盘的退变，但其作用的基因靶点及分子机制不明^[3, 4]。本研究通过分析 TNF- α 刺激后退变椎间盘纤维环细胞基因表达的变化，筛选出关键的差异表达基因及其功能，寻找炎症因子作用于椎间盘致其退变发生的分子标志，为进一步的实验研究提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 基因表达数据

在 GEO DataSets (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gds/>) 数据库中下载椎间盘退变表达谱芯片数据 GSE41883。该数据由 Gruber HE 等提供，采用 Affymetrix Human X3P Array 基因芯片。该数据由 8 个基因芯片组成，包括 4 个退变椎间盘组织和 4 个加入 TNF- α 的退变椎间盘组织。

对照组选取退变椎间盘纤维环细胞进行培养 14 d 后提取总 RNA，经扩增、逆转录、荧光标记后与 Affymetrix Human X3P Array 杂交；实验组选取退变椎间盘纤维环细胞进行培养，培养基中加入 TNF- α ，14 d 后提取总 RNA，经扩增、逆转录、荧光标记后与 Affymetrix Human X3P Array 杂交。

1.2 差异表达基因筛选

自 NCBI 网站的 GEO 数据库中下载数据集 GSE41883 的文件，利用 R 语言筛选差异表达基因，设定数据过滤^[5]：(1) 倍数过滤 (fold change filtering)，以绝对值 2 倍比值作为界值比较；(2) 表达水平过滤 (expression level filterin)，数据的基因荧光对数值以配对 *t* 检验 $P < 0.01$ 进行筛选比较。

1.3 差异表达基因分层聚类分析

利用 MeV 4.9 软件对各数据集的差异表达基因进行层次聚类分析 (hierarchical clustering)，分析差异表达基因能否将实验组与对照组区别出来。

1.4 差异表达基因功能注释

将差异表达基因提交到 DAVID 网站 (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>) 中^[6]，利用基因功能注释在线工具 (Ver. 6.7) 分析差异表达基因的细胞组件、分子

功能及生物过程^[7]。

1.5 差异表达基因相关信号通路分析

将差异表达基因提交到 DAVID 网站中，利用 KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) 数据库分析其相关信号通路^[8]。

1.6 差异基因相互作用关系分析

将差异表达基因上传至 STRING 9.1 在线分析工具 (<http://string.embl.de/>)^[9]，获得差异表达基因的蛋白-蛋白相互作用图，筛选出关键基因。

2 结果

2.1 差异表达基因的筛选

共筛选出 754 个差异表达基因，其中上调 461 个 (表 1)，下调 293 个 (表 2)，其中 4 倍倍数表达上调的基因 153 个，4 倍倍数表达下调的基因 103 个，差异基因多分布在 2~4 倍倍数，为了全面分析加入 TNF- α 后退变椎间盘基因的变化情况，避免遗漏重要基因，本研究以荧光强度比为 2 倍倍数以上的差异基因作为分析对象。

表 1 前 15 个上调基因

基因名称	基因 ID	倍数变化	<i>P</i> 值
CSF2	1437	377.7078	0.000260
CCL20	6364	343.9235	0.000236
SERPINB2	5055	231.3459	0.000116
CCL3	6348	77.88544	0.000213
IL1A	3552	68.9248	0.000592
EHF	26298	55.85117	0.000117
KYNU	8942	54.16793	0.000703
GPRC5B	51704	50.82116	0.000640
CLIC6	54102	47.7098	0.001089
CCL5	6352	44.57848	0.006932
CMCK2	129607	39.80179	0.003041
NR4A3	8013	38.53188	0.002099
SLC7A2	6542	38.13445	0.000734
IL1RN	3557	33.68248	0.006044
BST2	684	33.11028	0.001469

2.2 分层聚类分析

通过 MeV 软件对差异表达基因进行聚类分析，聚类图见图 1，其中每一列代表一个样本，每一行代表一个差异表达基因，归为一类的基因提示可能有相似的表达模式及功能。TNF- α 作用后通过表达谱分析筛选出的差异表达基因可将处理组与非处理组区别出来。

表 2 前 15 个下调基因

基因名称	基因 ID	倍数变化	P 值
COL15A1	1306	0.010723	0.000983
LSP1	4046	0.01307	0.001757
ADAMTS15	170689	0.023532	0.008025
TD02	6999	0.027926	0.000814
SEPP1	6414	0.030672	0.000588
DBC1	1620	0.032532	0.001953
RIMS1	22999	0.035718	0.003206
LYVE1	10894	0.043693	0.008313
INMT	11185	0.044676	0.001125
OGN	4969	0.046562	0.002216
LOC158376	158376	0.051556	0.002552
STEAP4	79689	0.054048	0.006601
SNED1	25992	0.055345	0.000247
LAMP5	24141	0.056647	0.007807
ADH1B	125	0.056998	0.006574

2.3 GO 聚类分析

差异表达基因的 GO 功能注释分析提示：(1) 分子功能主要涉及细胞因子活性 (cytokine activi-

ty)、转录因子结合 (transcription factor binding) 和趋化因子活性 (chemokine activity) 等；(2) 细胞组成主要涉及细胞外部分 (extracellular region part) 和细胞外基质 (extracellular matrix) 等；(3) 生物过程主要涉及细胞程序性死亡的调控 (regulation of programmed cell death) 和免疫反应 (immune response) 等 (表 3~5)。

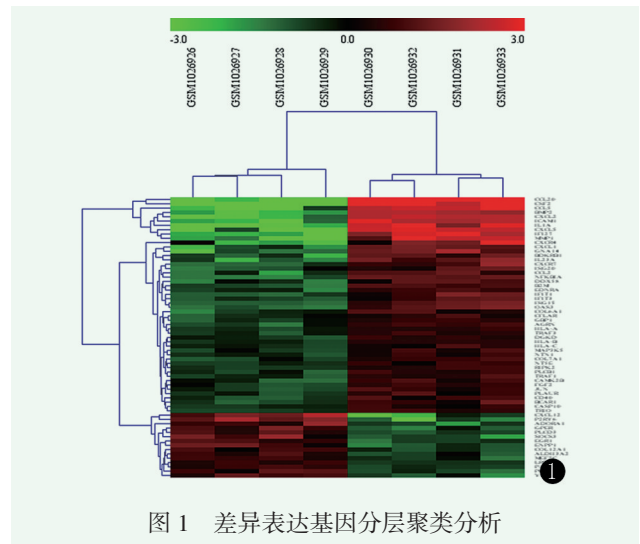


图 1 差异表达基因分层聚类分析

表 3 GO 分子功能分析

种类	描述	计数	P 值	Benjamini 值
GOTERM_MF_DIRECT	peptide antigen binding	8	0.000061	0.052
GOTERM_MF_DIRECT	protein homodimerization activity	48	0.000240	0.099
GOTERM_MF_DIRECT	chemokine activity	9	0.000440	0.120
GOTERM_MF_DIRECT	protein binding	372	0.000580	0.120
GOTERM_MF_DIRECT	spectrin binding	6	0.002500	0.360
GOTERM_MF_DIRECT	transcription factor binding	22	0.002600	0.310

表 4 GO 细胞组成分析

种类	描述	计数	P 值	Benjamini 值
GOTERM_CC_DIRECT	proteinaceous extracellular matrix	29	7.7E-07	0.00032
GOTERM_CC_DIRECT	cytoplasm	244	0.000012	0.0025
GOTERM_CC_DIRECT	cell surface	42	0.000012	0.0017
GOTERM_CC_DIRECT	extracellular space	81	0.000015	0.0016
GOTERM_CC_DIRECT	extracellular exosome	142	0.000061	0.0052
GOTERM_CC_DIRECT	extracellular matrix	26	0.00011	0.0077

表 5 GO 生物过程分析

种类	描述	计数	P 值	Benjamini 值
GOTERM_BP_DIRECT	type I interferon signaling pathway	15	1E-07	0.00032
GOTERM_BP_DIRECT	inflammatory response	38	1.9E-07	0.00029
GOTERM_BP_DIRECT	immune response	38	2.5E-06	0.00250
GOTERM_BP_DIRECT	Chemotaxis	18	4.1E-06	0.00310
GOTERM_BP_DIRECT	positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	67	5.7E-06	0.00350
GOTERM_BP_DIRECT	cell adhesion	38	0.000018	0.00900

2.4 KEGG 信号通路分析

KEGG 信号通路分析中 1 009 个差异表达基因，

主要涉及到细胞因子相互作用、凋亡、NOD 样受体、趋化因子转导等信号通路（表 6）。

表 6 KEGG 信号通路分析

种类	描述	计数	P 值	Benjamini 值
KEGG_PATHWAY	TNF signaling pathway	22	6.6E-09	1.6E-06
KEGG_PATHWAY	rheumatoid arthritis	14	0.00014	0.017
KEGG_PATHWAY	NF-kappa B signaling pathway	13	0.00048	0.039
KEGG_PATHWAY	herpes simplex infection	20	0.00054	0.033
KEGG_PATHWAY	cytokine-cytokine receptor interaction	22	0.0015	0.073
KEGG_PATHWAY	osteoclast differentiation	15	0.0022	0.087

2.5 蛋白-蛋白相互作用关系

通过 STRING 在线工具生成差异基因的蛋白-蛋白相互作用关系网络，分别统计网路中每个节点基因的平均度（average degree），将平均度高的基因称之为枢纽基因（hub genes），其中 JUN、CCL3、AN-HK 等是程度最高的枢纽基因（图 2）。

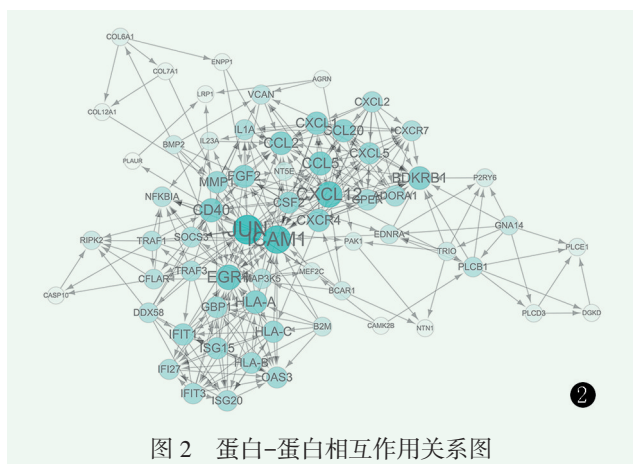


图 2 蛋白-蛋白相互作用关系图

3 讨论

椎间盘退行性病变是导致腰背痛的重要原因之一，其确切的发病机制仍不清楚，一般认为是多因素共同作用的结果^[10]。研究发现，正常椎间盘组织由少量基础性炎性因子分布，但是在退变的椎间盘组织中，与正常的椎间盘组织相比，能产生更多的炎症因子。炎症因子参与椎间盘细胞外基质合成与分解代谢、诱导细胞凋亡，已被认为是导致椎间盘退变的主要因素之一^[11]。但这一过程的启动及炎症反应作用于椎间盘致其退变发生的效应因子仍不明确。体内外研究证实早期的基因治疗为延缓、阻止甚至逆转椎间盘退变提供了可能，其中选择有效的目的基因和合适的载体是其关键^[12]。因此寻找椎间盘退变关键基因不仅对揭示其退变发生发展的分子

机制有意义，更能为进一步延缓或逆转退变提供靶点。

早期研究鉴定了一些椎间盘退变的分子标记，Gruber 等^[13]发现退变椎间盘中 aspirin 的表达升高；Zhang 等^[14]通过比较退变与非退变的椎间盘软骨终板细胞，发现 ADAMTS-7 的表达显著提高；Kalb 等^[15]发现炎症因子如 IL-1、IL-6 及 TNF-α 在椎间盘退变的发展中起重要作用。更有一些学者以临床切除的退变椎间盘或大鼠椎间盘为研究对象，研究退变椎间盘的基因表达谱，通过比较正常与退变椎间盘基因表达谱的变化，寻求退变相关基因。但事实上椎间盘退变发生时涉及到的基因变化是众多的，且每个变化的基因是退变的因还是果还是中间环节，即便是领域内的专家也无法依赖手工或者实验方式查阅验证进而得到有特定意义的信息，因此，在信息发展的年代，如何从海量信息中获取感兴趣并有意义的信息成为一个热点。

椎间盘退变的发生是一个多因素通过多种途径作用于多基因产生多种病理改变的过程，本研究将致病因素限定在炎症因子，选取 TNF-α 为代表，获取 TNF-α 作用后退变椎间盘纤维环细胞基因表达谱数据，利用生物信息学分析炎症因子作用于椎间盘产生退变过程中涉及到的关键基因，研究这些基因的功能、所在信号通路及相互作用网络。结果提示，TNF-α 作用后退变椎间盘的差异表达基因有 1 009 个，上调 624 个，下调 385 个，其中基质金属蛋白酶-1（MMP-1）呈 25.5 倍值升高，NF-κB（nuclear factor kappa B）呈 9.3 倍值升高，ADAMTS6（a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs）呈 3.75 倍值升高。Cho 等^[16]证实细胞因子如 IL-1β、TNF-α 可以增加 MMP-1 的表达引起椎间盘细胞外基质的降解；与正常的椎间盘组织相比，NF-κB 信号通路的活化，可以激活相关转录因子，促进

炎症因子 (IL-1 β 、TNF- α 、IL-6) 和效应因子 (ADAMTS、MMPs) 的分泌^[17]。这些实验与本研究结果一致。本研究发现 CCL3 基因呈 77.9 倍值上调, 对 CCL3 的 GO 分析及 KEGG 分析发现, CCL3 基因参与免疫调节和炎症反应, 是 MAPK、NF- κ B 和 C/EBP β 信号通路的下游, Wang 等^[18] 发现炎症因子 IL-1 β 、TNF- α 通过激活 MAPK、NF- κ B 信号通路调控 CCL3 的表达参与椎间盘退变。CCL3 可以通过 CCR1 招募巨噬细胞从而产生炎症级联反应, 这可能是研究慢性炎症反应在椎间盘退变中作用的新思路。在下调的基因中, ANKH 基因呈 3.2 倍值下调, ANKH 基因编码一种跨膜蛋白, 可将细胞内无机焦磷酸 (PPi) 转运至胞外, 而体内一定的 PPi 浓度具有抗钙化作用, Ho 等^[19] 发现 ANKH 基因缺陷的小鼠出生后, 四肢关节、脊柱逐渐强直, 脊柱韧带和椎间盘骨化, 并且野生型 ANKH 基因转入 ANKH 基因突变动物体内可恢复 ANKH 蛋白功能并减轻或消除骨与关节的异常钙化。Xu 等^[20] 研究发现颈椎病患者软骨终板出现退变及钙化结节, ANKH 的表达明显下降, 提示 ANKH 基因表达的下降可能会诱发软骨终板钙化从而加速椎间盘的退变, 进一步揭示 ANKH 的作用机制及调控可能为椎间盘退变的治疗提供新的思路。

本研究应用生物信息学方法分析椎间盘退变基因表达谱芯片, 发现损伤反应、炎症反应、凋亡调控与椎间盘的退变密切相关, 其中 CCL3、ANKH 等基因可能通过参与炎症反应在椎间盘退变的发生发展中起一定作用, 而具体的作用机制有待于进一步实验验证。

参考文献

- [1] Inoue N, Espinoza Orias AA. Biomechanics of intervertebral disk degeneration [J]. *Orthop Clin North Am*, 2011, 42 (4): 487-499.
- [2] Ito K, Creemers L. Mechanisms of intervertebral disk degeneration/injury and pain: a review [J]. *Global Spine J*, 2013, 3 (3): 145-152.
- [3] Nasto LA, Seo HY, Robinson AR, et al. ISSLS Prize Winner: inhibition of NF- κ B activity ameliorates age-associated disc degeneration in a mouse model of accelerated aging [J]. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2012, 37 (21): 1819-1825.
- [4] Wuertz K, Haglund L. Inflammatory mediators in intervertebral disk degeneration and discogenic pain [J]. *Global Spine J*, 2013, 3 (3): 175-184.
- [5] Dessau RB, Pipper CB. R-project for statistical computing [J]. *Ugeskr Laeger*, 2008, 170 (5): 328-330.
- [6] Huang da W, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources [J]. *Nat Protoc*, 2009, 4 (1): 44-57.
- [7] Ashburner M, Ball CA, Blake JA, et al. Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium [J]. *Nat Genet*, 2000, 25 (1): 25-29.
- [8] Kanehisa M. The KEGG database [J]. *Novartis Found Symp*, 2002, 247: 91-101, 101-103, 119-128, 244-252.
- [9] Szklarczyk D, Franceschini A, Kuhn M, et al. The STRING database in 2011: functional interaction networks of proteins, globally integrated and scored [J]. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39 (Database issue): D561-568.
- [10] Roberts S, Evans H, Trivedi J, et al. Histology and pathology of the human intervertebral disc [J]. *J Bone Joint Surg Am*, 2006, 88 (Suppl 2): 10-14.
- [11] Hamamoto H, Miyamoto H, Doita M, et al. Capability of nondegenerated and degenerated discs in producing inflammatory agents with or without macrophage interaction [J]. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2012, 37 (3): 161-167.
- [12] Woods BI, Vo N, Sowa G, et al. Gene therapy for intervertebral disk degeneration [J]. *Orthop Clin North Am*, 2011, 42 (4): 563-574.
- [13] Gruber HE, Ingram JA, Hoelscher GL, et al. Asporin, a susceptibility gene in osteoarthritis, is expressed at higher levels in the more degenerate human intervertebral disc [J]. *Arthritis Res Ther*, 2009, 11 (2): R47.
- [14] Zhang Q, Huang M, Wang X, et al. Negative effects of ADAMTS-7 and ADAMTS-12 on endplate cartilage differentiation [J]. *J Orthop Res*, 2012, 30 (8): 1238-1243.
- [15] Kalb S, Martirosyan NL, Kalani MY, et al. Genetics of the degenerated intervertebral disc [J]. *World Neurosurg*, 2012, 77 (3-4): 491-501.
- [16] Cho H, Lee S, Park SH, et al. Synergistic effect of combined growth factors in porcine intervertebral disc degeneration [J]. *Connect Tissue Res*, 2013, 54 (3): 181-186.
- [17] Yurube T, Takada T, Suzuki T, et al. Rat tail static compression model mimics extracellular matrix metabolic imbalances of matrix metalloproteinases, aggrecanases, and tissue inhibitors of metalloproteinases in intervertebral disc degeneration [J]. *Arthritis Res Ther*, 2012, 14 (2): R51.
- [18] Wang J, Tian Y, Phillips KL, et al. Tumor necrosis factor alpha- and interleukin-1beta-dependent induction of CCL3 expression by nucleus pulposus cells promotes macrophage migration through CCR1 [J]. *Arthritis Rheum*, 2013, 65 (3): 832-842.
- [19] Ho AM, Johnson MD, Kingsley DM. Role of the mouse ank gene in control of tissue calcification and arthritis [J]. *Science*, 2000, 289 (5477): 265-270.
- [20] Xu HG, Cheng JF, Peng HX, et al. JNK phosphorylation promotes natural degeneration of cervical endplate chondrocytes by down-regulating expression of ANK [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2013, 17 (17): 2335-2344.

(收稿:2021-06-03)

(同行评议专家:田纪伟 张强)

(本文编辑:宁桦)