

## ·基础研究·

# CD8<sup>+</sup>T细胞、滤泡辅助性T细胞和浆细胞浸润在椎间盘退变中的生物信息学分析

高一诚<sup>1,2</sup> 张广智<sup>1,2</sup> 解琪琪<sup>1,2</sup> 邓亚军<sup>1,2</sup> 任恩惠<sup>1,2</sup> 武作龙<sup>1,2</sup> 贺学岗<sup>1,2</sup> 康学文<sup>1,2</sup>

**【摘要】** 目的 筛选椎间盘退变(IDD)组织与非退变组织间的关键(hub)基因,并进一步分析IDD组织中免疫细胞浸润情况。方法 从GEO数据库下载IDD表达谱芯片数据集,利用R软件筛选退变组织与非退变组织中的差异表达基因(DEGs),然后构建蛋白质-蛋白质相互作用网络(PPI),筛选出hub基因。最后首次利用科学的反卷积算法(CIBERSORT)分析IDD组织中免疫细胞的浸润情况,以揭示免疫细胞浸润在IDD中的作用。结果 共筛选出166个DEGs和10个hub基因。免疫细胞浸润分析发现,IDD组织中单核细胞与调节性T细胞正相关,嗜酸性粒细胞与单核细胞和调节性T细胞负相关;CD8<sup>+</sup>T细胞、滤泡辅助性T细胞在IDD组织中浸润较少,而浆细胞在IDD组织中浸润则相对较多;静止期树突状细胞、浆细胞、静止期NK细胞调节性T细胞与其他免疫细胞互作较强,而滤泡辅助性T细胞、M2型巨噬细胞与幼稚性B细胞与其它免疫细胞互作较弱。结论 本结果揭示了IDD中的hub基因,进一步免疫细胞浸润分析表明,CD8<sup>+</sup>T细胞、滤泡辅助性T细胞和浆细胞与IDD发生发展密切相关,为进一步探讨IDD的分子机制提供新思路。

**【关键词】** 椎间盘退变; CD8<sup>+</sup>T细胞; 滤泡辅助性T细胞; 浆细胞; CIBERSORT

**Bioinformatics analysis of CD8<sup>+</sup>T cells, follicular helper T cells and plasma cells infiltration in intervertebral disc degeneration** Gao Yicheng<sup>1,2</sup>, Zhang Guangzhi<sup>1,2</sup>, Xie Qiqi<sup>1,2</sup>, Deng Yajun<sup>1,2</sup>, Ren Enhui<sup>1,2</sup>, Wu Zuolong<sup>1,2</sup>, He Xuegang<sup>1,2</sup>, Kang Xuewen<sup>1,2</sup>. <sup>1</sup>Department of Orthopaedics, Lanzhou University Second Hospital, Lanzhou 730030, China; <sup>2</sup>Key Laboratory of Osteoarthritis of Gansu Province, Lanzhou 730030, China

**【Abstract】 Objective** To screen the key genes of intervertebral disc degeneration (IDD) tissues and non-degeneration tissues, and to further analyze the infiltration of immune cells. **Methods** Download the IDD expression profile chip dataset from the GEO database, and use R software to screen differentially expressed genes (DEGs) in degenerate and non-degenerate tissues, and then construct a protein-protein interaction network (PPI). Screen out the hub gene. Finally, for the first time, a scientific deconvolution algorithm (CIBERSORT) was used to analyze the infiltration of immune cells in IDD tissues to reveal the role of immune cell infiltration in IDD. **Results** A total of 166 DEGs and 10 hub genes were screened. Immune cell infiltration analysis found that monocytes in IDD tissues were positively correlated with T cells regulatory, and eosinophils were negatively correlated with monocytes and T cells regulatory; CD8<sup>+</sup>T cells and follicular helper T cells were less infiltrated in IDD, while plasma cells are more infiltrated in IDD tissues; dendritic cells resting, plasma cells, NK cells resting and T cells regulatory interact strongly with other immune cells. T cells follicular helper, Macrophages M2, and B cells naïve assist weak interaction with other immune cells. **Conclusions** Our results reveal the hub gene in IDD and immune cell infiltration analysis shows that CD8<sup>+</sup>T cells, follicular helper T cells, and plasma cells are closely related to the development of IDD. To provide a new idea for further exploring the molecular mechanism of IDD.

**【Key words】** Intervertebral disc degeneration; CD8<sup>+</sup>T cells; Follicular helper T cells; Plasma cells; CIBERSORT

DOI: 10.3877/cma.j.issn.2096-0263.2021.04.001

基金项目: 脊柱疾患疼痛机制研究及治疗甘肃省国际科技合作基地(甘科外[2017]2号-34); 兰州大学创新创业培育项目(cxcy201906); 兰州大学第二医院2019年博士研究生培养专项基金项目(YJS-BD-09)

作者单位: 730030 兰州大学第二医院骨科<sup>1</sup>; 730030 甘肃省骨关节疾病研究重点实验室<sup>2</sup>

通信作者: 康学文, Email: ery\_kangxw@lzu.edu.cn

椎间盘退变 (intervertebral disc degeneration, IDD) 是一种常见的肌肉骨骼系统退行性疾病,也是导致慢性腰背部疼痛的主要原因之一,严重影响患者的生活质量<sup>[1-2]</sup>。据估计,约20%的青少年有轻度的椎间盘退变,并且80%的人在一生中出现过背部疼痛症状<sup>[3]</sup>。目前研究认为,IDD是一种复杂的细胞介导过程,最终导致功能和结构的改变,然而IDD的具体发病分子机制目前仍不完全清楚<sup>[4-5]</sup>。研究表明,在IDD进展期间各种促炎细胞因子(如IL-1、IL-6、IL-17和TNF $\alpha$ 等)水平显著增加,并在局部产生自身免疫炎症反应进而导致椎间盘功能紊乱和结构改变<sup>[6-8]</sup>,提示免疫细胞在IDD中扮演者重要的作用。然而,目前尚缺乏关于IDD中免疫细胞浸润的研究。

生物信息学是一门生物学与信息学交叉的新兴学科,广泛用于筛选基因组水平的遗传改变<sup>[9]</sup>,这有助于我们识别参与IDD发生进展的关键(hub)基因,为实验研究提供可行的思路。CIBERSORT软件是一种可以从特殊组织的基因表达谱中分析各种免疫细胞组成的一种方法<sup>[10]</sup>。当应用于新鲜、冷冻和固定组织的RNA混合物时,CIBERSORT在噪声、未知混合物含量和密切相关的细胞类型方面优于其他方法<sup>[11]</sup>。该方法在临床其他疾病中通过流式细胞术得到很好的验证,可大规模应用于基因表达谱数据的分析<sup>[12]</sup>。因此,我们应用CIBERSORT对IDD组织进行免疫细胞浸润分析。本研究结果为IDD提供新的有效治疗靶点,并为进一步研究IDD的分子机制提供新的思路,甚至可成为一项细胞治疗的手段。

## 材料与方法

### 一、数据下载及预处理

GEO (Gene Expression Omnibus, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)<sup>[13]</sup>是一个国际公共存储库,存储并免费发布微阵列、第二代测序和其他形式的高通量功能基因组数据集。采用R语言GEOquery包<sup>[14]</sup>从GEO数据库中下载并分析样本来源可靠的IDD表达谱数据集GSE70362<sup>[15]</sup>,数据集物种来源均为人类、平台是基于GPL17810 (HG-U133\_Plus\_2 Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array)。GSE70362数据集包括48个椎间盘组织样本,并根据Thompson分级<sup>[16]</sup>法对退变的椎间盘组织进行分级。其中,I~II级组织样本16例,定义为非退变

组。III~V级组织样本32例,定义为退变组,用于进行后续分析。我们应用affy包<sup>[17]</sup>将GSE70362数据集原始的CEL文件通过RMA算法进行背景校正及数据归一化处理,样本间校正效果则用二维PCA聚类图进行展示,然后在Bioconductor (<http://www.bioconductor.org/>)<sup>[18]</sup>应用GPL570平台所对应的基因注释文件对探针矩阵进行注释。

### 二、差异表达基因筛选、蛋白互作网络构建及hub基因的选择

数据预处理后,以 $|\log_2 \text{fold change}(\log_2 FC)| > 2$ 且 $P < 0.05$ 为差异截取标准,通过limma软件包<sup>[19]</sup>筛选出差异表达基因(differentially expressed genes, DEGs)。Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes (STRING) (<http://string-db.org; version:11.0>)<sup>[20]</sup>是用于评估蛋白质与蛋白质相互作用信息的在线工具。Cytoscape用于复杂网络的可视化,并可以将其与任何类型的属性数据集成<sup>[21]</sup>,其插件cytoHubba可用于计算基因所得度值,常用来筛选hub基因<sup>[22]</sup>。我们首先将已选出的DEGs导入STRING中构建蛋白质-蛋白质相互作用(protein-protein interaction, PPI)网络,然后使用Cytoscape软件将PPI网络进行可视化,并用cytoHubba以MCC算法为标准筛选hub基因,定义得分前10为所得hub基因。

### 三、免疫细胞浸润的评估

CIBERSORT是基于线性支持向量回归的原理对转录组表达矩阵进行反卷积,且能够利用标准化的基因表达数据估算不同肿瘤样本中的细胞组成,具有分辨率高及可同时量化多种类型免疫细胞的优势,其优越性能已在多种疾病中得以验证<sup>[23]</sup>。我们将前期获得的GEO具有标准注释的基因表达矩阵数据上传到CIBERSORT (<https://cibersort.stanford.edu/>),过滤输出 $P < 0.05$ 的样本,确保CIBERSORT产生的免疫细胞群的推导部分是准确的,最后得到免疫细胞浸润矩阵。

### 四、免疫细胞浸润的可视化及评价

为了分析免疫细胞浸润在IDD中的作用,我们使用R语言corrplot包<sup>[24]</sup>绘制相关热图以可视化免疫细胞浸润的相关性。使用R语言ggplot2包<sup>[25]</sup>绘制小提琴图用于可视化免疫细胞浸润的差异;免疫细胞浸润在非退变组与退变组织中的差异。使用R语言igraph包<sup>[26]</sup>绘制免疫细胞浸润的相关网络图以可视化免疫细胞浸润的互作情况,以 $P < 0.05$ 且 $| \text{相关系数} | > 0.15$ 为互作标准。

## 结 果

### 一、数据预处理

数据校正前后的结果以箱式图展示(图1、2),每个样本的基因表达均值基本相同,表明数据均一化成功。处理前后组间差异对比通过二维主成分分析(principal component analysis, PCA)进行展示,结果表明样本数据来源可靠(图3、4)。

### 二、DGEs筛选及PPI网络分析

从GSE70362数据集中共筛选出166个DEGs,

然后我们使用STRING在线工具构建DEGs的PPI网络,并应用Cytoscape软件将其可视化(图5)。此外,为了筛选该PPI网络中的重要聚类模块,我们利用cytoHubba插件选择最大相关标准(MCC)中的前10个基因作为hub基因,即TP53、SLC2A8、BMP4、CALM1、KLC4、LTV1、WDR46、NDUFS4、AMPH和SH3GL2为所得hub基因(表1)。

### 三、椎间盘组织免疫细胞浸润结果

免疫细胞相关性热图结果显示,单核细胞与调节性T细胞存在明显正相关关系(图6),嗜酸性粒细

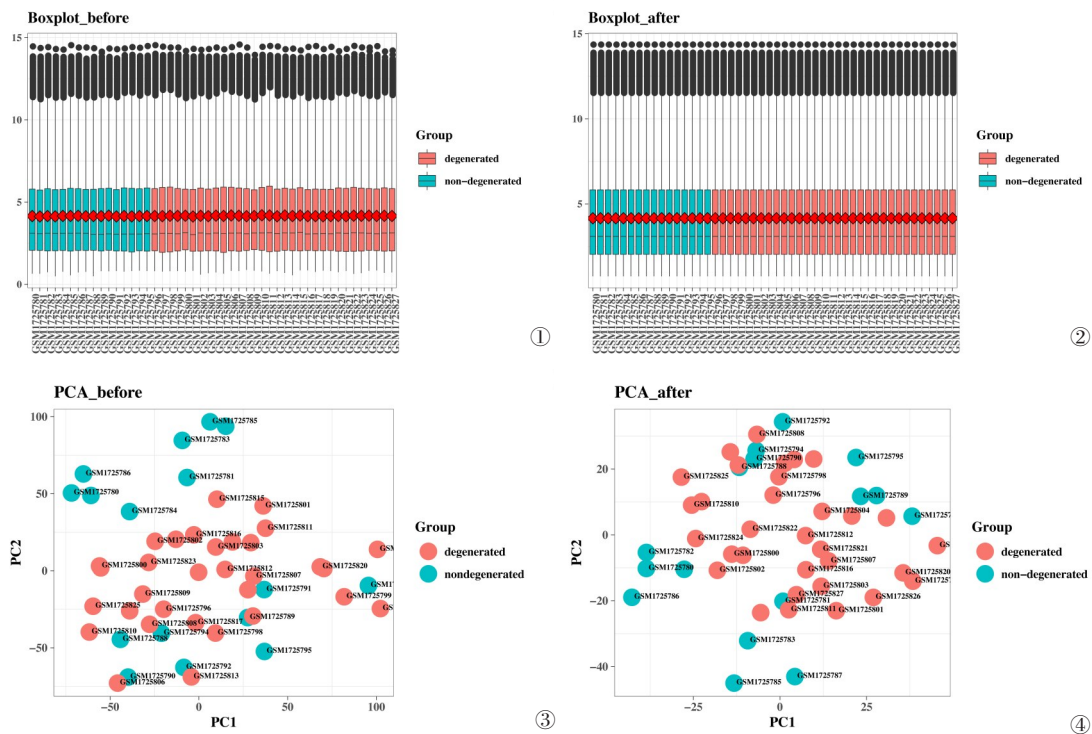


图1~4 箱式图和PCA图。图1 GSE70362数据集标准化处理之前的箱式图;图2 GSE70362数据集标准化处理之后的箱式图;图3 GSE70362数据集标准化处理之前的二维PCA图;图4 GSE70362数据集标准化处理之后的二维PCA图

表1 10个Hub基因

| 排名 | 基因简写   | 基因全称   | 评分 |
|----|--------|--|----|
| 1  | TP53   | Tumor Protein P53                                | 15 |
| 2  | SLC2A8 | Solute Carrier Family 2 Member 8                 | 5  |
| 2  | BMP4   | Bone Morphogenetic Protein 4                     | 5  |
| 4  | CALM1  | Calmodulin 1                                     | 4  |
| 4  | KLC4   | Kinesin Light Chain 4                            | 4  |
| 6  | LTV1   | LTV1 Ribosome Biogenesis Factor                  | 3  |
| 6  | WDR46  | WD Repeat Domain 46                              | 3  |
| 6  | NDUFS4 | NADH:Ubiquinone Oxidoreductase Subunit S4        | 3  |
| 6  | AMPH   | Amphiphysin                                      | 3  |
| 6  | SH3GL2 | SH3 Domain Containing GRB2 Like 2, Endophilin A1 | 3  |



胞与单核细胞和调节性T细胞存在明显负相关(图7、8)。免疫细胞浸润差异的小提琴图结果显示,与非退变椎间盘组织相比,CD8<sup>+</sup>T细胞、滤泡辅助性T细胞在退变椎间盘组织中浸润较少,而浆细胞在退变椎间盘中浸润则相对较多(图9)。免疫细胞互作网络结果显示,静止期树突状细胞、浆细胞、静止期NK细胞和记忆性T细胞与其他免疫细胞互作较强,而滤泡辅助性T细胞、M2型巨噬细胞和幼稚性B细胞与其它免疫细胞互作较弱(图10)。

## 讨 论

随着老龄化社会的到来,IDD引起的下腰部疼痛日益威胁人们的健康,严重影响患者的生活质量,给家庭和社会带来了沉重的经济负担<sup>[27]</sup>。目前,IDD临床治疗常依赖于手术治疗,以减轻神经压迫及维持脊柱稳定性为主要治疗目标。然而并没有可从根本上防治椎间盘退变发生和发展的方法<sup>[28-29]</sup>。因此,寻找IDD潜在治疗靶点至关重要。微阵列分析是一种可以同时检测许多基因表达水平的高通量技术。如今,基因的异常表达被认为是IDD发生和发展的因素之一,并且越来越多的研究表明IDD中一些失调的基因可能成为预防或治疗IDD的潜在治疗靶点<sup>[30-32]</sup>。相关研究表明,免疫浸润参与多种疾病的发生发展<sup>[33-35]</sup>。然而由于技术上的局限性,研究人员通常使用免疫组化的方法进行免疫细胞浸润,但这种方法在鉴别相关细胞类型方面效果较差,可能被其他标记蛋白误导,导致对免疫应答的相对狭隘的认识<sup>[11]</sup>。整合基因组图谱和反卷积算法CIBERSORT可以解决免疫细胞浸润的分析并克服了免疫组化分析的这个缺陷。作为一项新兴技术,目前为止,尚无研究使用CIBERSORT对IDD中的免疫细胞浸润进行分析。因此,我们通过生物信息学方法分析GEO数据库中IDD的基因表达谱,并使用CIBERSORT对表达谱数据进行免疫细胞浸润分析,然后分析免疫细胞浸润的差异,并进一步探讨免疫细胞间的相互作用。

本研究,我们从IDD组织和非退变椎间盘组织中共鉴定出166个DEGs。随后,我们构建了DEGs的PPI网络来检测这些蛋白质之间的相互作用,并选择MCC中前10个基因作为hub基因(TP53、SLC2A8、BMP4、CALM1、KLC4、LTV1、WDR46、NDUFS4、AMPH和SH3GL2)。以上基因中的一部

分已在先前的研究中被证明与IDD密切相关,TP53在体外培养髓核细胞建立的营养剥夺模型中显著上调<sup>[36]</sup>,TP53还可通过抑制髓核细胞凋亡和自噬来阻止压迫性椎间盘退变<sup>[37]</sup>;BMP4参与椎间盘髓核细胞外基质的产生<sup>[38-39]</sup>,以上研究与本研究结果相符。研究表明,SH3GL2<sup>[40]</sup>、SLC2A8<sup>[41]</sup>和CALM1<sup>[42]</sup>与退行性疾病的发生发展密切相关。然而,目前尚缺乏KLC4、SLC2A8、LTV1、WDR46、NDUFS4及AMPH在IDD中的研究。多个研究表明KLC4、LTV1、WDR46、NDUFS4和AMPH参与炎症、氧化应激及线粒体功能的调控过程<sup>[43-47]</sup>,而炎症、氧化应激及线粒体功能失调可加速IDD的发生进展。因此,我们推测上述基因可能在IDD的发生进展具有关键作用,值得进一步研究。

我们的分析结果揭示了免疫细胞在IDD中的浸润细节。单核细胞表达与调节性T细胞表达密切相关,嗜酸性粒细胞表达与调节性T细胞和单核细胞表达密切相关。Silvia等<sup>[48]</sup>研究表明,在实验性过敏性支气管肺曲霉病小鼠模型中静脉给予免疫球蛋白后嗜酸性粒细胞募集增加,而调节性T细胞水平降低。Katharina等<sup>[49]</sup>研究表明,单核细胞在链球菌外毒素的作用下触发了细胞免疫抑制程序,从而介导调节性T细胞的累积。另有研究表明,嗜酸性粒细胞可以在体外培养单核细胞的上清液中被激活,从而介导血吸虫患者肉芽肿的产生<sup>[50]</sup>。此外,我们发现CD8<sup>+</sup>T细胞、滤泡辅助性T细胞在IDD中浸润减少,而浆细胞浸润增多。值得关注的是,免疫细胞浸润互作网路显示静止期树突状细胞与其他免疫细胞互作最强,而幼稚性B细胞与其它免疫细胞互作最弱。这些异常浸润的细胞可能参与IDD的发生发展。Deborah等<sup>[51]</sup>研究TNF- $\alpha$ 水平升高对椎间盘退变和突出的影响,在TNF- $\alpha$ 过表达转基因小鼠(Tg197)中显示出CD8<sup>+</sup>T细胞浸润与纤维环撕裂和髓核细胞突出有关。滤泡辅助性T细胞参与骨关节炎、I型糖尿病、IgG4-相关疾病及恶性肿瘤等疾病的免疫反应<sup>[52-55]</sup>。浆细胞浸润与炎症反应、移植物排斥反应及恶性肿瘤等有关<sup>[56-58]</sup>。以上研究与我们的数据挖掘结果一致。此外,许多疾病中免疫细胞浸润与基因的异常表达有关,如Danka等<sup>[59]</sup>对32例多发性骨髓瘤组织中BMP家族分子表达和临床相关性进行分析,发现多发性骨髓瘤组织中浆细胞浸润与BMP4表达增加有关。另有研究表明,前列腺癌组织中CD8<sup>+</sup>T细胞浸润与TP53在细胞核内蓄积有关<sup>[60]</sup>。

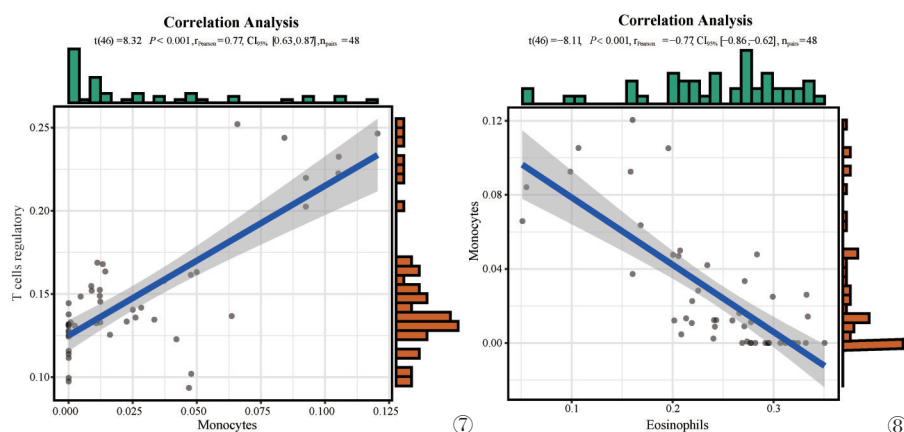
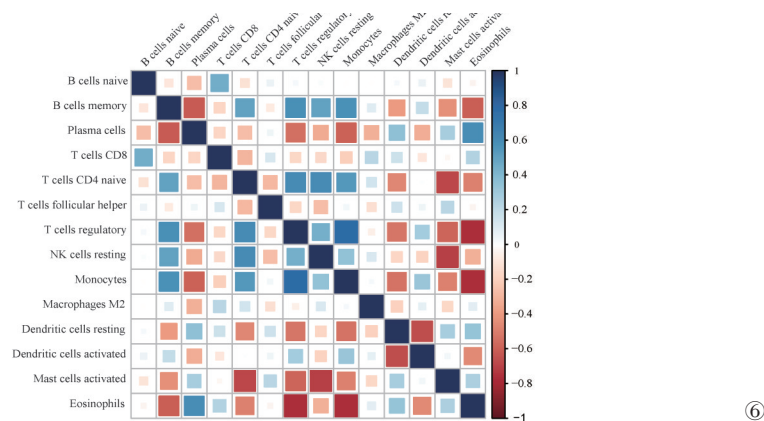
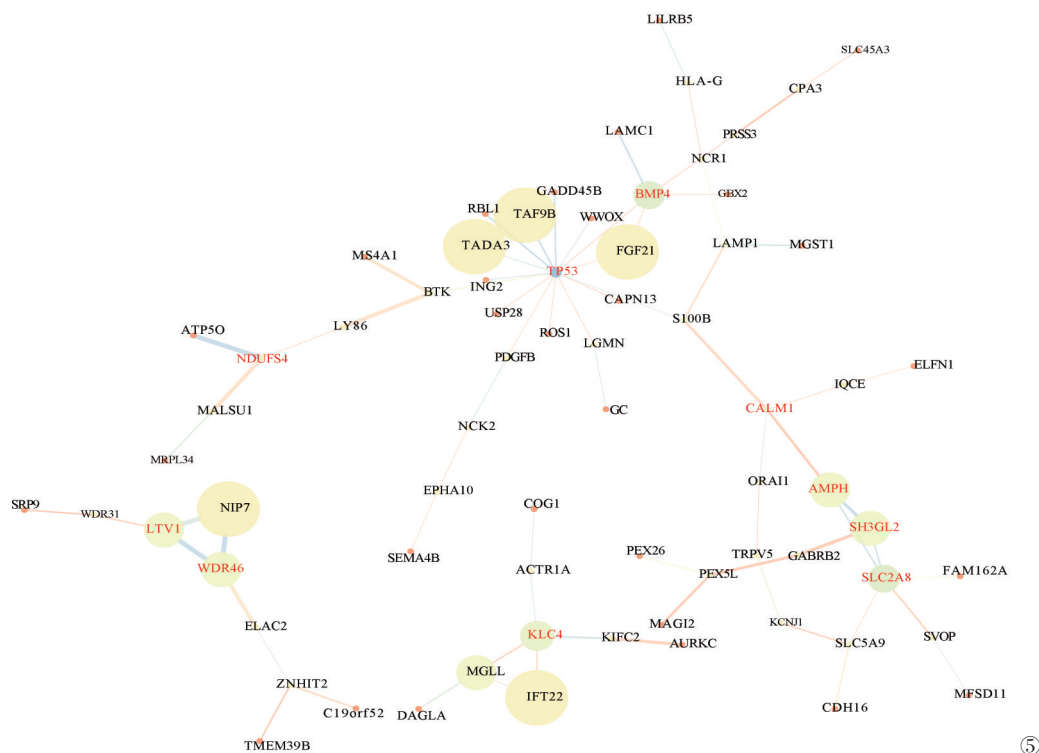


图5 DEGs的PPI网络。PPI网络分析图,节点大小表示聚类系数,节点越大,聚类系数越大,基因在网络中占比比重就越大;节点颜色表示度,黄色代表度较大,橙色代表度较小;连线粗细表示综合得分,打分越高线越粗,越说明两蛋白间存在互作;红色字体标注为所得hub基因 图6~8 免疫细胞浸润相关性分析。图6 免疫细胞浸润的相关性热图;图7 调节性T细胞和单核细胞相关性分析;图8 单核细胞与嗜酸性粒细胞相关性分析

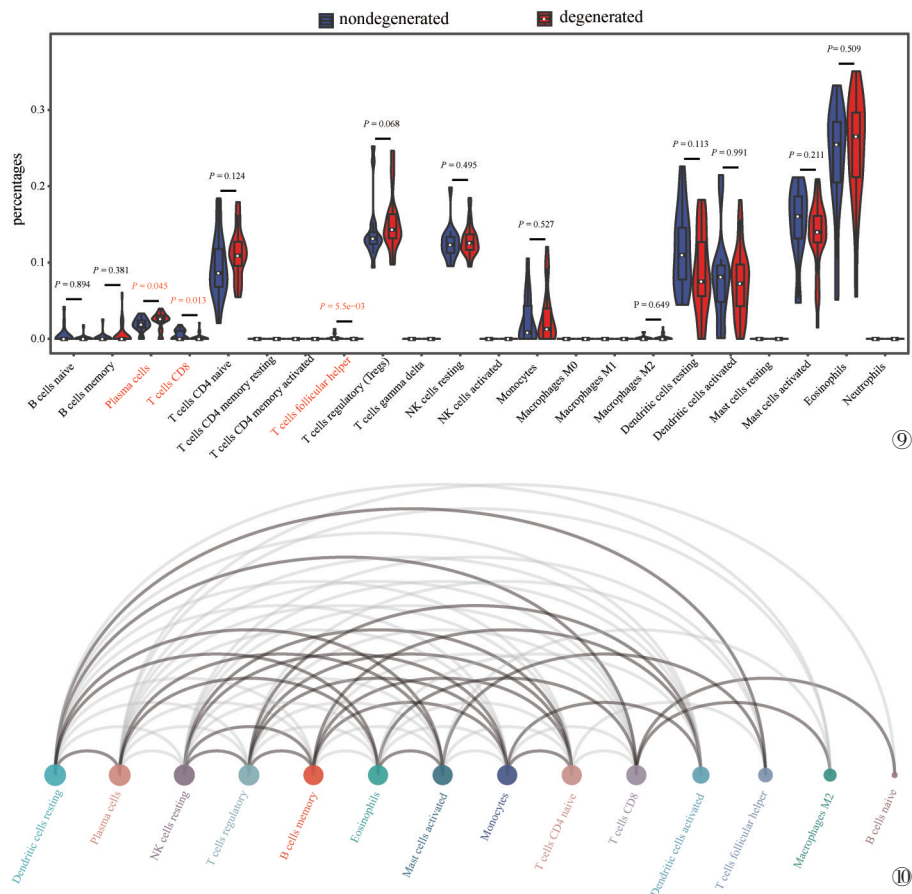


图9~10 免疫细胞浸润比例的小提琴图及互作网络图分析图。图9 IDD组织与非退变组织中免疫细胞浸润比例的小提琴图,红色标记代表两组样本之间存在浸润差异;图10 免疫细胞互作的网络图,圆圈大小代表免疫细胞浸润细胞间的互作强度

因此,我们推测 TP53 和 BMP4 可能通过调控 CD8+T 细胞、滤泡辅助性 T 细胞及浆细胞浸润参与 IDD 的发生进展。也有可能是 TP53 和 BMP4 的异常表达是上述免疫细胞浸润的结果,这将是非常有意义的研究方向之一。

然而,我们的研究也存在一定的局限性。首先, CIBERSORT 分析是基于有限的基因数据,这些数据可能会偏离细胞的异型性相互作用、疾病诱导的失调或者表型的可塑性。其次,本研究选取的数据集具有一定的异质性;虽然我们对原始数据进行了质量控制和标准化,但仍然需要更大的样本量和更高质量的数据集来验证本研究结果的可靠性。第三,我们的工作是对先前发布的数据集进行第二次挖掘和分析,虽然之前的一些研究结果与我们的结果一致,但需要在分子、细胞和组织水平上进一步验证其相关分子机制。

总之,我们鉴定了 IDD 中的 hub 基因,并进行了免疫细胞浸润分析,为进一步研究 IDD 的分子机制

提供理论依据,有助于开发治疗 IDD 的潜在免疫靶点,帮助 IDD 患者从免疫调节疗法中获益。

## 参 考 文 献

- 1 Risbud MV, Shapiro IM. Role of cytokines in intervertebral disc degeneration: pain and disc content [J]. Nat Rev Rheumatol 2014, 10 (1): 44-56.
- 2 Ruiz-Fernández C, Francisco V, Pino J, et al. Molecular Relationships among Obesity, Inflammation and Intervertebral Disc Degeneration: Are Adipokines the Common Link? [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20 (8): 2030.
- 3 Walker BF. The prevalence of low back pain: a systematic review of the literature from 1966 to 1998 [J]. J Spinal Disord Tech, 2000, 13 (3): 205-217.
- 4 Wang F, Cai F, Shi R, et al. Aging and age related stresses: a senescence mechanism of intervertebral disc degeneration [J]. Osteoarthritis Cartilage, 2016, 24(3): 398-408.
- 5 Rider SM, Mizuno S, Kang JD. Molecular Mechanisms of Intervertebral Disc Degeneration [J]. Spine Surg Relat Res, 2018, 3(1): 1-11.
- 6 Le Maitre CL, Freemont AJ, Hoyland JA. The role of interleukin-1 in the pathogenesis of human intervertebral disc degeneration [J]. Ar-

- thrititis Res Ther, 2005, 7(4): R732-R745.
- 7 Shamji MF, Setton LA, Jarvis W, et al. Proinflammatory cytokine expression profile in degenerated and herniated human intervertebral disc tissues [J]. *Arthritis Rheum*, 2010, 62(7): 1974-1982.
  - 8 Feng C, Liu H, Yang M, et al. Disc cell senescence in intervertebral disc degeneration: Causes and molecular pathways [J]. *Cell cycle*, 2016, 15(13): 1674-1684.
  - 9 Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists [J]. *Nucleic Acids Res*, 2009, 37(1): 1-13.
  - 10 Bense RD, Sotiriou C, Piccart-Gebhart MJ, et al. Relevance of Tumor-Infiltrating Immune Cell Composition and Functionality for Disease Outcome in Breast Cancer [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2016, 109(1): w192.
  - 11 Newman AM, Liu CL, Green MR, et al. Robust enumeration of cell subsets from tissue expression profiles [J]. *Nat methods*, 2015, 12(5): 453-457.
  - 12 Gentles AJ, Newman AM, Liu CL, et al. The prognostic landscape of genes and infiltrating immune cells across human cancers [J]. *Nat Med*, 2015, 21(8): 938-945.
  - 13 Barrett T, Wilhite SE, Ledoux P, et al. NCBI GEO: archive for functional genomics data sets-update [J]. *Nucleic acids research*, 2013, 41(Database issue): D991-D995.
  - 14 Davis S, Meltzer PS. GEOquery: a bridge between the Gene Expression Omnibus (GEO) and BioConductor [J]. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 2007, 23(14): 1846-1847.
  - 15 Kazezian Z, Gawri R, Haglund L, et al. Gene Expression Profiling Identifies Interferon Signalling Molecules and IGFBP3 in Human Degenerative Annulus Fibrosus [J]. *Sci Rep*, 2015, 5:15662.
  - 16 Thompson JP, Pearce RH, Schechter MT, et al. Preliminary evaluation of a scheme for grading the gross morphology of the human intervertebral disc [J]. *Spine*, 1990, 15(5): 411-415.
  - 17 Gautier L, Cope L, Bolstad BM, et al. affy--analysis of Affymetrix GeneChip data at the probe level [J]. *Bioinformatics*, 2004, 20(3): 307-315.
  - 18 Gentleman RC, Carey VJ, Bates DM, et al. Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics [J]. *Genome Biol*, 2004, 5(10): R80.
  - 19 Ritchie ME, Phipson B, Wu D, et al. limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies [J]. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43(7): e47.
  - 20 Szklarczyk D, Gable AL, Lyon D, et al. STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets [J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(D1): D607-D613.
  - 21 Shannon P, Markiel A, Ozier O, et al. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks [J]. *Genome Res*, 2003, 13(11): 2498-2504.
  - 22 Chin CH, Chen SH, Wu HH, et al. cytoHubba: identifying hub objects and sub-networks from complex interactome [J]. *BMC Syst Biol*, 2014, 8 Suppl 4: S11.
  - 23 Chen B, Khodadoust MS, Liu CL, et al. Profiling Tumor Infiltrating Immune Cells with CIBERSORT [J]. *Methods Mol Biol*, 2018, 1711: 243-259.
  - 24 Gu Z, Eils R, Schlesner M. Complex heatmaps reveal patterns and correlations in multidimensional genomic data [J]. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 2016, 32(18): 2847-2849.
  - 25 Ginestet C. ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis [J]. *J R Stat Soc Ser A Stat Soc*, 2011, 174(1): 245.
  - 26 Adai AT, Date SV, Wieland S, et al. LGL: Creating a map of protein function with an algorithm for visualizing very large biological networks [J]. *J Mol Biol*, 2004, 340(1): 179-190.
  - 27 Urits I, Burshtein A, Sharma M, et al. Low Back Pain, a Comprehensive Review: Pathophysiology, Diagnosis, and Treatment [J]. *Curr Pain Headache Rep*, 2019, 23(3): 23.
  - 28 Huang H, Cheng S, Zheng T, et al. Vitamin D retards intervertebral disc degeneration through inactivation of the NF- $\kappa$ B pathway in mice [J]. *Am J Transl Res*, 2019, 11(4): 2496-2506.
  - 29 Endler P, Ekman P, Berglund I, et al. Long-term outcome of fusion for degenerative disc disease in the lumbar spine [J]. *Bone Joint J*, 2019, 101-B(12): 1526-1533.
  - 30 Kaarniranta K, Kajdaneck J, Morawiec J, et al. PGC-1 $\alpha$  Protects RPE Cells of the Aging Retina against Oxidative Stress-Induced Degeneration through the Regulation of Senescence and Mitochondrial Quality Control. The Significance for AMD Pathogenesis [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(8): 2317.
  - 31 Yang M, Peng Y, Liu W, et al. Sirtuin 2 expression suppresses oxidative stress and senescence of nucleus pulposus cells through inhibition of the p53/p21 pathway [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 513(3): 616-622.
  - 32 Beierfuß A, Hunjadi M, Ritsch A, et al. APOE-knockout in rabbits causes loss of cells in nucleus pulposus and enhances the levels of inflammatory catabolic cytokines damaging the intervertebral disc matrix [J]. *PloS one*, 2019, 14(11): e225527.
  - 33 Mattson DL. Immune mechanisms of salt-sensitive hypertension and renal end-organ damage [J]. *Nat Rev Nephrol*, 2019, 15(5): 290-300.
  - 34 Richmond JM, Harris JE. Immunology and skin in health and disease [J]. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2014, 4(12): a15339.
  - 35 Talmadge JE, Donkor M, Scholar E. Inflammatory cell infiltration of tumors: Jekyll or Hyde [J]. *Cancer metastasis reviews*, 2007, 26(3-4): 373-400.
  - 36 Sudo H, Yamada K, Iwasaki K, et al. Global identification of genes related to nutrient deficiency in intervertebral disc cells in an experimental nutrient deprivation model [J]. *PloS one*, 2013, 8(3): e58806.
  - 37 Li Z, Shao Z, Chen S, et al. TIGAR impedes compression-induced intervertebral disc degeneration by suppressing nucleus pulposus cell apoptosis and autophagy [J]. *J Cell Physiol*, 2020, 235(2): 1780-1794.
  - 38 Zhang Y, An HS, Thonar EJ A, et al. Comparative effects of bone morphogenetic proteins and sox9 overexpression on extracellular matrix metabolism of bovine nucleus pulposus cells [J]. *Spine*, 2006, 31(19): 2173-2179.
  - 39 Wang Z, Weitzmann MN, Sangadala S, et al. Link protein N-terminal peptide binds to bone morphogenetic protein (BMP) type II receptor and drives matrix protein expression in rabbit intervertebral disc cells [J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(39): 28243-28253.
  - 40 Mallei A, Ieraci A, Corna S, et al. Global epigenetic analysis of BDNF Val66Met mice hippocampus reveals changes in dendrite and spine remodeling genes [J]. *Hippocampus*, 2018, 28(11): 783-795.
  - 41 Chong MS, Goh LK, Lim WS, et al. Gene expression profiling of peripheral blood leukocytes shows consistent longitudinal downregulation of TOMM40 and upregulation of KIR2DL5A, PLOD1, and SLC2A8 among fast progressors in early Alzheimer's disease [J]. *J Alzheimer's Dis: JAD*, 2013, 34(2): 399-405.
  - 42 Shi J, Gao S, Lv Z, et al. The association between rs12885713 poly-



- morphism in CALM1 and risk of osteoarthritis: A meta-analysis of case-control studies [J]. *Medicine*, 2018, 97(36): e12235.
- 43 Chen P, Cao A, Miyagawa K, et al. Amphetamines promote mitochondrial dysfunction and DNA damage in pulmonary hypertension [J]. *JCI insight*, 2017, 2(2): e90427.
- 44 Yu AK, Datta S, McMackin MZ, et al. Rescue of cell death and inflammation of a mouse model of complex 1-mediated vision loss by repurposed drug molecules [J]. *Hum mol genet*, 2017, 26(24): 4929-4936.
- 45 Collins JC, Ghalei H, Doherty JR, et al. Ribosome biogenesis factor Ltv1 chaperones the assembly of the small subunit head [J]. *J Cell Biol*, 2018, 217(12): 4141-4154.
- 46 Pasaje CFA, Bae JS, Park B, et al. WDR46 is a Genetic Risk Factor for Aspirin-Exacerbated Respiratory Disease in a Korean Population [J]. *Allergy Asthma Immunol Res*, 2012, 4(4): 199-205.
- 47 Baek J, Lee J, Yun HS, et al. Kinesin light chain-4 depletion induces apoptosis of radioresistant cancer cells by mitochondrial dysfunction via calcium ion influx [J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(5): 496.
- 48 Bozza S, Käsermann F, Kaveri SV, et al. Intravenous immunoglobulin protects from experimental allergic bronchopulmonary aspergillosis via a sialylation-dependent mechanism [J]. *Eur J Immunol*, 2019, 49(1):195-198.
- 49 Giesbrecht K, Förmer S, Sähr A, et al. Streptococcal Pyrogenic Exotoxin A-Stimulated Monocytes Mediate Regulatory T-Cell Accumulation through PD-L1 and Kynurenine [J]. *International journal of molecular sciences*, 2019, 20(16): 3933.
- 50 Elsas P, Lee TH, Lenzi HL, et al. Monocytes activate eosinophils for enhanced helminthotoxicity and increased generation of leukotriene C4 [J]. *Ann Inst Pasteur Immunol*, 1987, 138(1): 97-116.
- 51 Gorth DJ, Shapiro IM, Risbud MV. Transgenic mice overexpressing human TNF- $\alpha$  experience early onset spontaneous intervertebral disc herniation in the absence of overt degeneration [J]. *Cell Death Dis*, 2018, 10(1): 7.
- 52 Serr I, Fürst RW, Ott VB, et al. miRNA92a targets KLF2 and the phosphatase PTEN signaling to promote human T follicular helper precursors in T1D islet autoimmunity [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016, 113(43): E6659-E6668.
- 53 Li Y, Luo W, Zhu S, et al. T Cells in Osteoarthritis: Alterations and Beyond [J]. *Front Immunol*, 2017, 8: 356.
- 54 Moriyama M, Nakamura S. Th1/Th2 Immune Balance and Other T Helper Subsets in IgG4-Related Disease [J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2017, 401: 75-83.
- 55 Ali HR, Chlon L, Pharoah PDP, et al. Patterns of Immune Infiltration in Breast Cancer and Their Clinical Implications: A Gene-Expression- Based Retrospective Study [J]. *PLoS Med*, 2016, 13(12): e1002194.
- 56 Wehner JR, Fox-Talbot K, Halushka MK, et al. B cells and plasma cells in coronaries of chronically rejected cardiac transplants [J]. *Transplantation*, 2010, 89(9): 1141-1148.
- 57 Kim CJ, Romero R, Chaemsaitong P, et al. Chronic inflammation of the placenta: definition, classification, pathogenesis, and clinical significance [J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2015, 213(4 Suppl): S53-S69.
- 58 Fristedt R, Borg D, Hedner C, et al. Prognostic impact of tumour-associated B cells and plasma cells in oesophageal and gastric adenocarcinoma [J]. *J Gastrointest Oncol*, 2016, 7(6): 848-859.
- 59 Grečević D, Kusec R, Kovacik N, et al. Bone morphogenetic proteins and receptors are over-expressed in bone-marrow cells of multiple myeloma patients and support myeloma cells by inducing ID genes [J]. *Leuk Res*, 2010, 34(6): 742-751.
- 60 Kaur HB, Lu J, Guedes LB, et al. TP53 missense mutation is associated with increased tumor-infiltrating T cells in primary prostate cancer [J]. *Hum Pathol*, 2019, 87: 95-102.

(收稿日期:2020-06-30)

(本文编辑:吕红芝)

高一诚, 张广智, 解琪琪, 等. CD8<sup>+</sup>T细胞、滤泡辅助性T细胞和浆细胞浸润在椎间盘退变中的生物信息学分析 [J/CD]. 中华老年骨科与康复电子杂志, 2021, 7(4): 193-200.