生物信息学 DOI：10.13406/j.cnki.cyxb.003554

Has-miR-204-5p介导椎间盘退变和相关疼痛症状的发生：来自孟德尔随机化和生物信息学的证据

李凝道[1]，赵润涵[1]，张　骏[1]，唐大刚[2]，罗小辑[1]
（1.重庆医科大学附属第一医院骨科，重庆　400016；2.重庆市中医院骨科，重庆　400020）

【摘　要】目的：挖掘椎间盘退变（intervertebral disc degeneration，IDD）及其相关疼痛症状的新MicroRNA生物标志物并探索相关分子机制。**方法：**从已发表的文献和全基因组关联研究（genome-wide association studies，GWAS）Catlog数据库中获取MicroRNA、背部疼痛和坐骨神经痛的GWAS数据，从基因表达综合数据库（Gene Expression Omnibus，GEO）数据库中下载IDD相关的MicroRNA和mRNA表达数据。利用孟德尔随机化和生物信息学分析挖掘关键MicroRNA，并基于GeneMANIA数据库探索其靶基因的生物学功能。**结果：**孟德尔随机化分析结果表明，has-miR-204-5p与背部疼痛（GCST90018797，*OR*=0.9761）和坐骨神经痛（GCST90044614，*OR*=0.8957）均具有明显的因果效应。同时，生物信息学分析结果显示，has-miR-204-5p在IDD组织中明显低表达，其3个靶基因Ⅲ型胶原蛋白α1链（collagen type Ⅲ alpha 1 chain，COL3A1），核糖体蛋白侧柄亚基P1（ribosomal protein lateral stalk subunit P1，RPLP1）和转录因子4（transcription factor 4，TCF4）在IDD组织中异常高表达。此外，生物学功能富集分析揭示，3个靶基因主要富集在胶原蛋白、核糖体和Wnt信号通路等与IDD密切相关的生物学功能上。**结论：**Has-miR-204-5p是一种可靠的IDD生物标志物，在IDD及其相关疼痛症状中发挥重要作用。

【关键词】椎间盘退变；孟德尔随机化；生物信息学；has-miR-204-5p
【中图分类号】R681.5　　**【文献标志码】**A　　**【收稿日期】**2024-03-22

Has-miR-204-5p mediates intervertebral disc degeneration and associated pain symptoms: evidence from Mendelian randomization and bioinformatics

Li Ningdao[1]，*Zhao Runhan*[1]，*Zhang Jun*[1]，*Tang Dagang*[2]，*Luo Xiaoji*[1]
（*1. Department of Orthopedics，The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University；*
2. Department of Orthopedics，Chongqing Hospital of Traditional Chinese Medicine）

【Abstract】*Objective*：To identify novel MicroRNA biomarkers of intervertebral disc degeneration（IDD）and related pain symptoms，and to explore the underlying molecular mechanisms. ***Methods*：**Genome-wide association studies（GWAS）data for MicroRNAs，back pain，and sciatica were obtained from a published article and the GWAS Catlog database. IDD-associated MicroRNA and mRNA expression data were downloaded from the GEO database. Key MicroRNAs were identified using Mendelian randomization and bioinformatics analyses. The biological functions of their target genes were explored based on the GeneMANIA database. ***Results*：**Mendelian randomization analysis showed that has-miR-204-5p had significant causal effects with both back pain（GCST90018797，*OR*=0.9761）and sciatica（GCST90044614，*OR*=0.8957）. Moreover，bioinformatics analysis revealed that has-miR-204-5p was significantly less expressed in IDD tissues，and its three target genes（*COL3A1*，*RPLP1*，and *TCF4*）were abnormally highly expressed in IDD tissues. In addition，biological function enrichment analysis revealed that the three target genes were mainly enriched in biological functions closely related to IDD，such as collagen，ribosome，and the Wnt signaling pathway.***Conclusion*：**Has-miR-204-5p is a reliable IDD biomarker that plays an important role in IDD and associated pain symptoms.

【Key words】intervertebral disc degeneration；Mendelian randomization；bioinformatics；has-miR-204-5p

椎间盘退变（intervertebral disc degeneration，IDD）是一种消耗大量医疗资源的慢性退行性疾病[1]。IDD导致的椎间盘结构变化和脊柱不稳定，是背部疼痛、外周神经压迫症状以及椎管狭窄发生的主要原因[2]。根据流行病学调查显示，坐骨神经痛

作者介绍：李凝道，Email：liningdao301@163.com，研究方向：脊柱退行性疾病，脊柱微创手术。
通信作者：罗小辑，Email：202982@hospital.cqmu.edu.cn。
优先出版：https://link.cnki.net/urlid/50.1046.R.20240819.0902.004（2024-08-19）

（腰椎外周神经压迫症状）在全球范围内的发病率为1%~5%，其终生患病率高达43%，而80%的人一生中至少会受到1次腰痛的影响，这些现象不仅导致了严重的医疗负担还严重影响人们的生活质量[3-5]。虽然许多腰痛和坐骨神经痛患者的疼痛症状在早期接受治疗的数周内明显减轻[6]。但是，1项报告显示，45%的腰痛和坐骨神经痛患者1年后的残疾状况没有明显改善[7]，同时34%患者的症状在2年后转化为慢性疼痛[8]。遗憾的是，目前IDD的病理生理机制尚不完善，并且缺少有效的诊断标志物。

MicroRNA是基因调控网络中的重要组成部分，主要通过与其靶基因的互补3'非翻译区来抑制该基因的表达。大多数MicroRNA在物种间具有高度保守性，同时其表达也具有空间、时间、组织和细胞类型特异性[9-10]。大量证据表明，MicroRNA通过介导髓核细胞的增殖、凋亡以及细胞外基质重组，在IDD中发挥着关键作用[11]。研究显示，has-miR-21在IDD组织中表达上调会导致髓核细胞的异常增殖和细胞簇形成进而导致IDD的发生发展[12]。另1项研究表明has-miR-155可以通过下调细胞凋亡关键蛋白（Caspase3，CASP3）和磷酸化Fas相关死亡结构域蛋白（fas associated via death domain，FADD）来抑制髓核细胞凋亡，但该MicroRNA在IDD组织的髓核细胞中明显下降[13]。此外，椎间盘细胞外基质重组也是IDD发生的重要原因，研究显示has-miR-377与该过程密切相关[14]。总之，挖掘并探索MicroRNA在IDD中的生物学功能，可以提供更多IDD相关分子机制的理论依据，并为IDD的诊断和精准治疗带来契机。

随着多学科的交叉融合以及测序技术的进步，基于计算机科学和测序数据，研究者们对疾病的病理生理学机制有了更为深入的了解。孟德尔随机化是一种因果推断方法，通过遗传变异评估暴露因素（疾病、基因/蛋白表达、代谢产物和肠道菌群等）与临床结局之间的因果效应[15]。该方法可以在很大程度上避免大多数混杂因素对结局的影响，因此被广泛应用[16]。本研究获取MicroRNA、IDD及其相关疼痛症状的全基因组关联研究（genome-wide association studies，GWAS）数据和微阵列芯片数据，利用孟德尔随机化和生物信息学分析，挖掘出1个新的MicroRNA（has-miR-204-5p），揭示了IDD的一种新的病理生理机制，为后续的精准治疗提供新的思路。

1 资料与方法

1.1 数据获取

从1篇已发表的文献中获取75种MicroRNA的顺式表达数量性状位点（cis-expression quantitative trait locus，cis-eQTL）GWAS数据[17]；从GWAS Catalog数据库中下载背部疼痛（GCST90018797）和腰椎外周神经压迫症状（坐骨神经痛，GCST90044614）的GWAS数据。从GEO数据库（（www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/）中下载IDD组织的MicroRNA（GSE116726）和mRNA（GSE23130）微阵列芯片数据，并对其进行背景矫正，标准化和探针注释。

1.2 孟德尔随机化分析

为筛选出合适的工具单核苷酸多态性（single nucleotide polymorphism，SNP），本研究进行了如下操作：①选择与MicroRNA表达量明显相关的SNP（$P<1\times10^{-5}$）；②去除cis-eQTL中的SNP连锁不平衡，阈值设为：$r^2<0.3$，kb=500；③剔除F统计值小于10的弱工具变量避免发生偏倚；④使用IEU OpenGWAS project数据库（https://gwas.mrcieu.ac.uk）剔除与结局具有显著相关性的混淆因素。

为评估MicroRNA与IDD相关疼痛症状间的因果效应，本研究采用双样本孟德尔随机化分析，以逆方差加权法（inverse-variance weighted，IVW）作为分析的主要指标。同时，结合MR-Egger法、加权中位数（weighted median）、加权模型（weighted mode）和简单模型（simple mode）算法对结果进行补充。在某一MicroRNA结果中，当5种算法的效应方向不一致时，则该MicroRNA不纳入后续分析。随后，基于Cochran's Q检验评估变量间异质性以及MR-Egger-Intercept检验和MR-PRESSO检验评估变量间水平多效性，旨在对分析结果进行敏感性分析。

1.3 关键MicroRNA和靶基因的鉴定

首先，对GCST90018797和GCST90044614的孟德尔随机分析结果中的明显MicroRNA取交集。然后，使用Limma R包对GSE116726数据集进行正常样本和IDD样本间的MicroRNA差异表达分析，并将阈值设为：|LogFC|>1.5和$P<0.05$。接着，使用multiMiR R包探索差异MicroRNA的靶基因，该软件包整合了来源于miRecords，miRTarBase，and TarBase数据库中MicroRNA及其靶向靶基因的相关数据，为探索MicroRNA在疾病中的分子机制提供了极大便利。同时，这些数据均从已发表的文献中收集整理，具有可靠性。随后，对GSE23130进行差异表达分析，相关阈值与上述一致。最后，将MicroRNA靶基因和差异表达基因进行交叉分析，旨在挖掘出关键靶基因。

1.4 关键靶基因的生物学功能富集分析

基于GeneMANIA数据库（https://genemania.org/），对关键靶基因和20个与其密切相关的基因进行生物功能富集分析并构建蛋白互作（protein-protein interaction，PPI）网络。

1.5 统计学方法

本研究主要基于R软件（V 4.3.2）进行分析，相关图形由ggplot2 R包进行绘制。除外特殊说明。检验水准α=0.05。

2 结 果

2.1 关键MicroRNA的鉴定

孟德尔随机化分析结果显示，6种MicroRNA对背部疼痛（GCST90018797）具有因果效应，5种MicroRNA对坐骨神经痛（GCST90044614）具有因果效应（图1），这些结果均通过了敏感性分析，具有可靠性。其中，2种MicroRNA（has-miR-125b-5p和has-miR-204-5p）在2个数据集中均有因果效应（图2A）。但是，因果效应散点图显示has-miR-125b-5p在2个数据集中具有不同的因果效应，同时其在GCST90044614结果中的5种因果效应评估算法也不具有一致性，遂予以剔除（图2B）。因此，has-miR-204-5p被鉴定为关键MicroRNA，并且在缓解IDD相关疼痛症状中发挥作用。

2.2 关键靶基因的鉴定

GSE116726差异分析结果显示，has-miR-204-5p在IDD组织中明显低表达（图3A），而在其891个靶基因中，有3个基因（Ⅲ型胶原蛋白α1链（collagen type Ⅲ alpha 1 chain，COL3A1），核糖体蛋白侧柄亚基P1（ribosomal protein lateral stalk subunit P1，RPLP1）和转录因子4（transcription factor 4，TCF4）在GSE23130数据集中的IDD组织中明显高表达（图3B~D）。这些证据显示，has-miR-204-5p在IDD组织的低表达会导致COL3A1，RPLP1和TCF4的表达上升，进而导致IDD及其相关疼痛症状的发生。

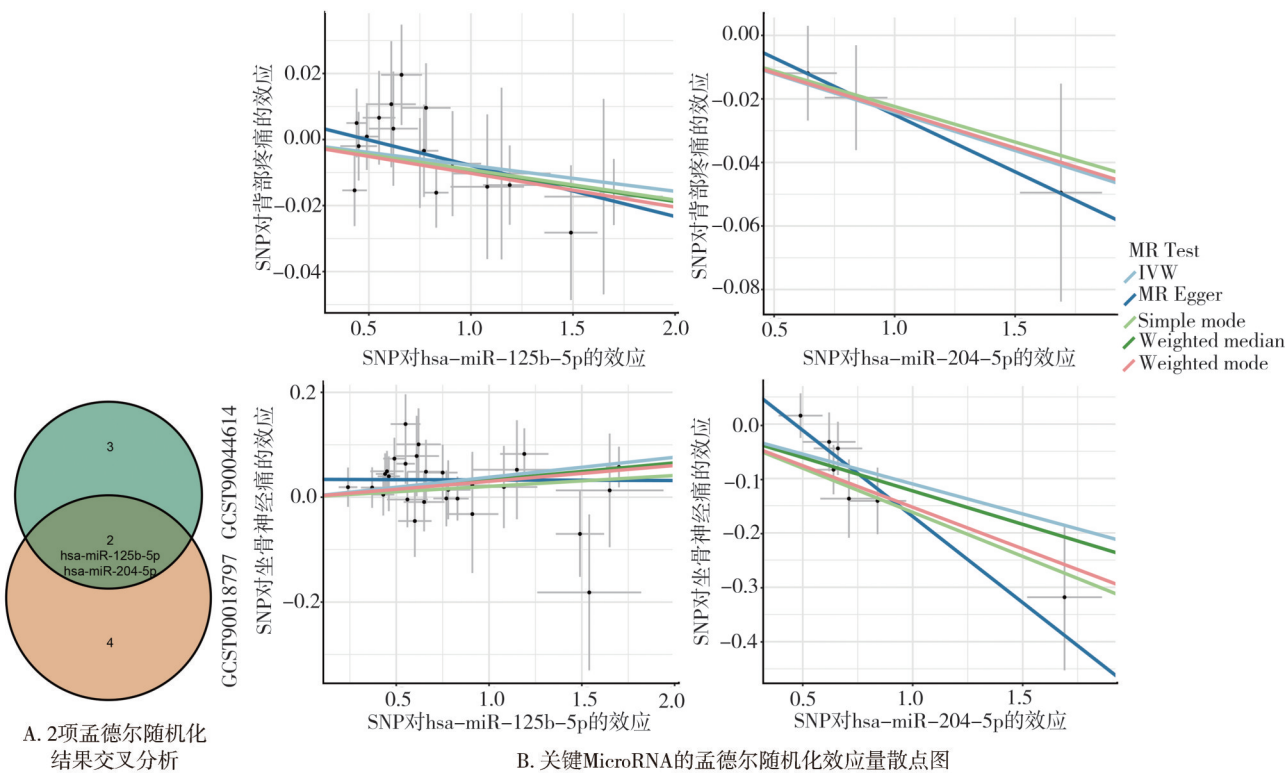
2.3 关键靶基因的生物学功能富集分析

GeneMANIA数据库主要基于物理学相互作用（physical

暴露	结局	SNP个数	方法	*P*值	*OR*(95%CI)	*P*值 (Cochran's Q)	*P*值 (MR-Egger-Intercept)	*P*值 (MR-PRESSO)
hsa-miR-125b-5p	背部疼痛(GCST90018797)	19	IVW	0.023 4	0.992 2(0.985 5~0.998 9)	0.948 6	0.289 6	0.948
hsa-miR-151a-3p	背部疼痛(GCST90018797)	5	IVW	0.029 0	0.953 8 (0.914 1~0.995 2)	0.106 8	0.377 3	0.263
hsa-miR-151a-5p	背部疼痛(GCST90018797)	4	IVW	0.005 2	0.949 3 (0.915 2~0.984 6)	0.129 0	0.205 4	0.289
hsa-miR-196b-5p	背部疼痛(GCST90018797)	2	IVW	0.043 3	1.087 1 (1.002 5~1.178 8)	0.546 2	NA	NA
hsa-miR204-5p	背部疼痛(GCST90018797)	3	IVW	0.045 3	0.976 1(0.953 3~0.999 5)	0.940 4	0.785 9	NA
hsa-miR-339-5p	背部疼痛(GCST90018797)	5	IVW	0.015 6	0.970 3 (0.946 9~0.994 3)	0.755 3	0.276 7	0.751
hsa-miR-100-5p	坐骨神经痛(GCST90044614)	29	IVW	0.021 2	1.0133 (1.002 0~ 1.024 8)	0.798 7	0.060 5	0.812
hsa-miR-125b-5p	坐骨神经痛(GCST90044614)	29	IVW	0.001 9	1.038 8 (1.014 1~1.064 1)	0.853 3	0.091 7	0.864
hsa-miR-152	坐骨神经痛(GCST90044614)	7	IVW	0.001 2	1.178 4 (1.0673~1.3010)	0.909 3	0.559 1	0.918
hsa-miR-204-5p	坐骨神经痛(GCST90044614)	7	IVW	0.000 3	0.895 7(0.844 4~0.950 3)	0.422 9	0.102 6	0.477
hsa-miR-625-3p	坐骨神经痛(GCST90044614)	2	IVW	0.020 5	0.821 2 (0.695 2~0.970 1)	0.897 9	NA	NA



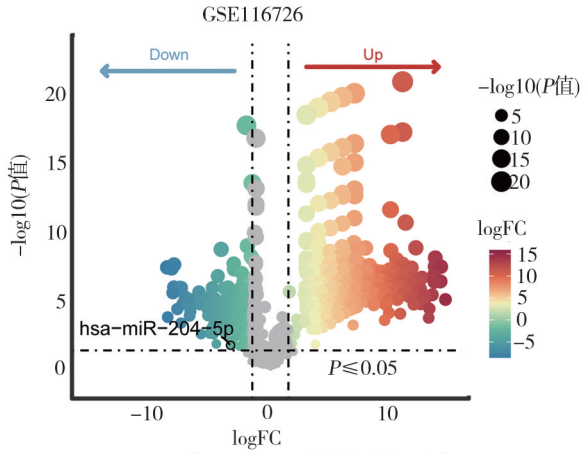
图1 孟德尔随机化结果及敏感性分析



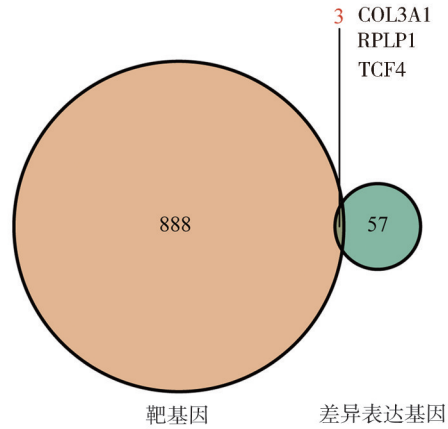
A. 2项孟德尔随机化结果交叉分析

B. 关键MicroRNA的孟德尔随机化效应量散点图

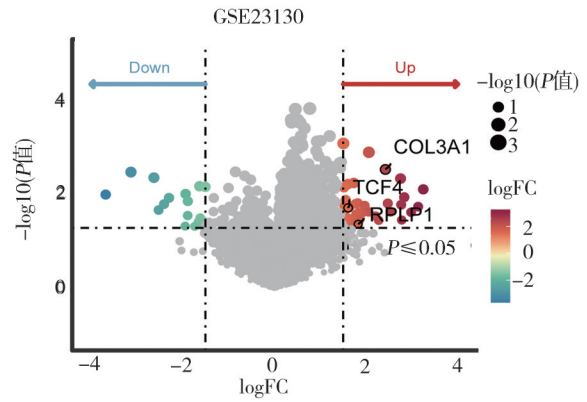
图2 关键MicroRNA的鉴定



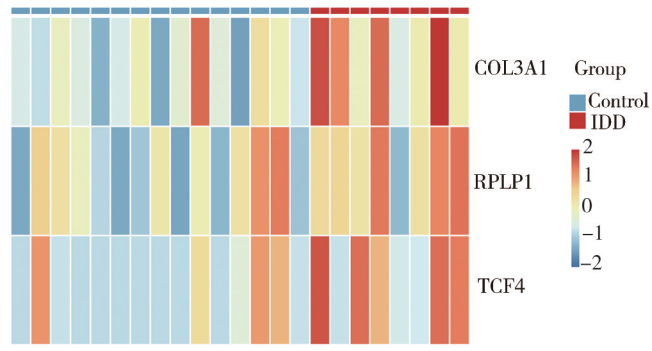
A. GSE116726的MicroRNA差异表达火山图



B. Has−miR−204−5p靶基因与GSE23130差异表达基因的交叉分析



C. GSE23130的mRNA差异表达火山图



D. 关键靶基因的差异表达热图

图3　Has−miR−204−5p关键靶基因的鉴定

interactions）、共表达（co-expression）、预测（predicted）、共定位（co-localization）、通路（pathway）、基因相互作用（genetic interactions）和共享蛋白结构域（shared protein domains）等方式筛选出与目标基因密切相关的20个基因并进行生物学功能富集分析和PPI网络构建。PPI网络结果显示，COL3A1主要富集在胶原蛋白上，RPLP1主要富集在核糖体上，而TCF4主要参与Wnt信号通路的调控（图4A~C）。

3　讨　论

近年来，尽管经过大量的临床和基础研究，IDD的相关机制仍不清楚，阻碍了该疾病治疗策略的发展。本研究首次利用MicroRNA的cis−eQTL数据进行与背部疼痛和坐骨神经痛的孟德尔随机化分析，发现has−miR−204−5p与IDD相关疼痛症状呈负相关，并且分析结果均通过了异质性和水平多效性检验，证实了研究结果的可靠性。同时，生物信息学分析结果显示IDD组织中has−miR−204−5p的表达降低会导致COL3A1，RPLP1和TCF4的表达水平升高。这些证据揭示了一种IDD及其相关疼痛症状发生的新机制。

COL3A1编码的Ⅲ型胶原蛋白主要存在于皮肤、血管、肺和肠道等可伸展结缔组织中，与包括IDD在内的多种疾病密切相关，如肾病、主动脉瘤、埃勒斯−当洛斯综合征和肿瘤[18−21]。研究表明，Ⅲ型胶原蛋白在IDD组织中的表达上调约3.25倍[22]，并且在髓核和纤维环也观察到其表达的增加[23]。同时，也有证据显示，COL3A1在IDD组织中明显高表达，并且与腰痛密切相关[2,24]。正常情况下，椎间盘细胞外基质处于一种平衡状态，但这种平衡在IDD中被打破，主要表现为胶原蛋白类型改变和蛋白聚糖含量减少，最终导致组织完整性丧失和相关症状出现[25]。本研究发现，在IDD组织中，has−miR−204−5p的低表达会导致COL3A1的表达上调。这可能促使Ⅲ胶原蛋白的异常增加，进而影响椎间盘细胞外基质的平衡状态，最终导致IDD的进展。但这一复杂的分子机制仍不明确，值得后续深入探索。

RPLP1编码的蛋白是核糖体60S大亚基的重要结构成分，在神经系统发育过程中扮演着至关重要的角色，并且在肿瘤领域受到广泛关注[26−27]。RPLP1在IDD组织中的高表达表达可能会导致核

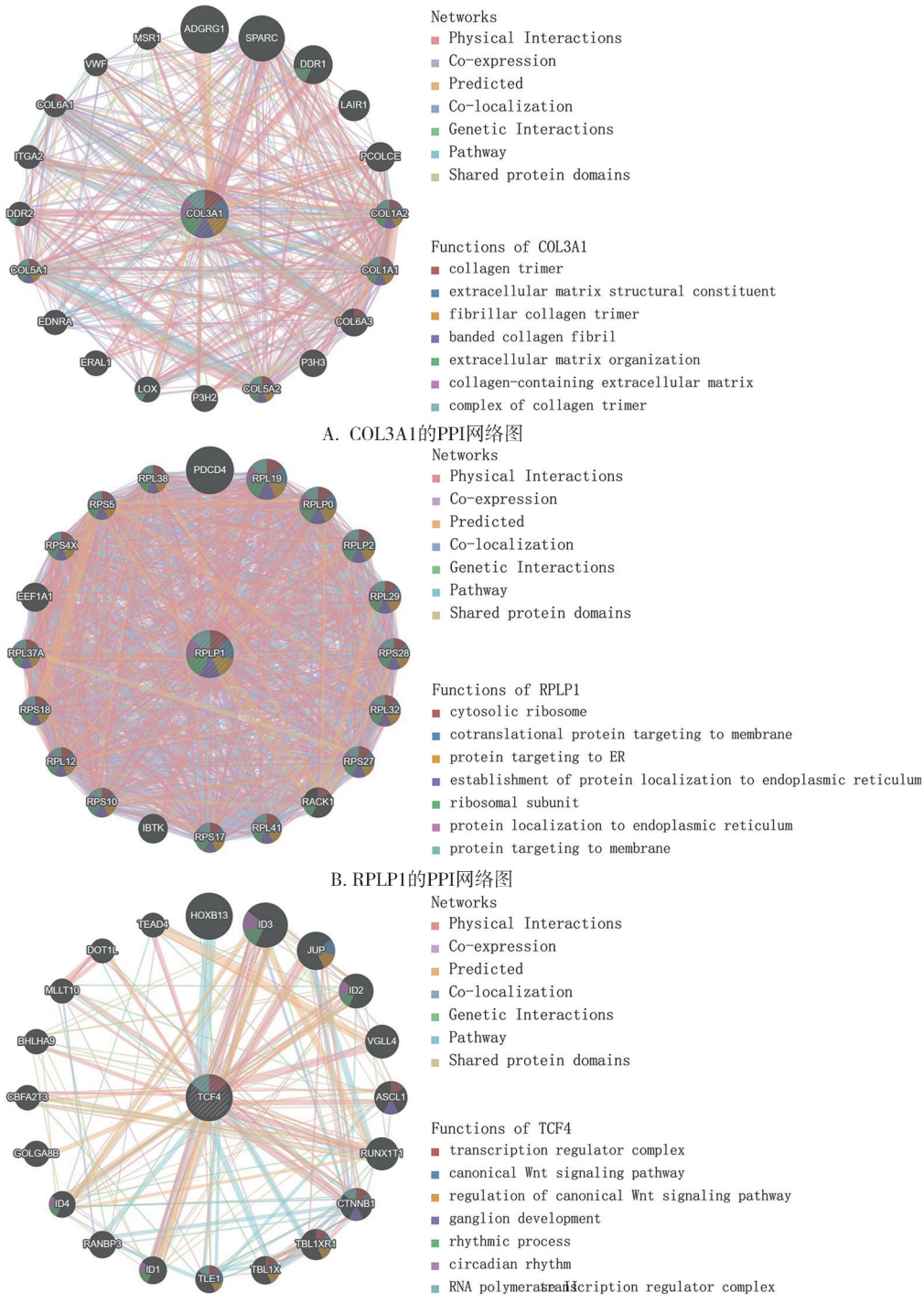


图 4　基于 GeneMANIA 数据库构建关键靶基因的 PPI 网络和生物学功能富集分析

糖体功能异常并影响胶原蛋白、基质金属酶、组织蛋白酶等椎间盘高度相关蛋白质的表达水平，进而导致 IDD 的发生发展，其相关机制需在后续的研究中进行探索和验证。

TCF4 编码的转录因子 4 在人体组织中广泛表达，并且在神经系统发育中发挥重要作用。同时，该基因与精神分裂症、福克斯内皮性角膜营养不良、原发性硬化性胆管炎和肿瘤等疾病密切相关[28]。研究表明，TCF4 是 Wnt 信号通路转导过程中的重要蛋白，其功能受损会导致 Wnt 信号传导抑制[29]。Wnt 信号通路与 IDD 密切相关，是该领域研究最多的信号通路之一。研究表明，Wnt 信号通路的激活会抑制髓核细胞增殖、促进髓核细胞衰老和凋亡以及降解髓核细胞外基质，最终导致 IDD 的发生和进

展[30]。结合之前研究和本研究的结果，本研究提出了一个假设：IDD组织中has-miR-204-5p下调导致TCF4表达上升，激活Wnt信号通路，最终导致IDD的发生发展。因此，has-miR-204-5p/TCF4/Wnt信号轴，很可能是一种新的IDD发病机制，这为后续研究提供了一个全新的理论依据，非常值得后续深入研究。

当然，本研究存在着一定的局限性。首先，由于样本量较少，存在着个体间差异，这需要后续的大规模队列验证。其次，本研究未进行基础实验验证，后续需要予以补充以加强研究结果的可靠性。

总之，本研究基于孟德尔随机化和生物信息学分析，发现has-miR-204-5p在IDD组织中明显低表达会介导COL3A1，RPLP1和TCF4的表达水平异常升高，最终导致IDD及其相关疼痛症状的发生。这一证据揭示了一种新的IDD发生发展机制，为后续研究提供了参考。

参 考 文 献

[1] Katz JN. Lumbar disc disorders and low-back pain: socioeconomic factors and consequences[J]. J Bone Joint Surg Am, 2006, 88 Suppl 2: S21-S24.

[2] Yang ZD, Chen X, Zhang QL, et al. Dysregulated COL3A1 and RPL8, RPS16, and RPS23 in disc degeneration revealed by bioinformatics methods[J]. Spine, 2015, 40(13): 745-751.

[3] Fritz JM, Lane E, McFadden M, et al. Physical therapy referral from primary care for acute back pain with sciatica: a randomized controlled trial[J]. Ann Intern Med, 2021, 174(1): 8-17.

[4] Konstantinou K, Dunn KM. Sciatica: review of epidemiological studies and prevalence estimates[J]. Spine, 2008, 33(22): 2464-2472.

[5] Hurwitz EL, Randhawa K, Yu HN, et al. The Global Spine Care Initiative: a summary of the global burden of low back and neck pain studies[J]. Eur Spine J, 2018, 27 Suppl 6: S796-S801.

[6] Vroomen PCAJ, de Krom MCTFM, Knottnerus JA. Predicting the outcome of sciatica at short-term follow-up[J]. Br J Gen Pract, 2002, 52(475): 119-123.

[7] Konstantinou K, Dunn KM, Ogollah R, et al. Prognosis of sciatica and back-related leg pain in primary care: the ATLAS cohort[J]. Spine J, 2018, 18(6): 1030-1040.

[8] Mehling WE, Gopisetty V, Bartmess E, et al. The prognosis of acute low back pain in primary care in the United States: a 2-year prospective cohort study[J]. Spine, 2012, 37(8): 678-684.

[9] Grimson A, Farh KK, Johnston WK, et al. MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing[J]. Mol Cell, 2007, 27(1): 91-105.

[10] Ho PTB, Clark IM, Le LTT. MicroRNA-based diagnosis and therapy[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(13): 7167.

[11] Li Z, Yu X, Shen JX, et al. MicroRNA in intervertebral disc degeneration[J]. Cell Prolif, 2015, 48(3): 278-283.

[12] Liu HZ, Huang XW, Liu XY, et al. miR-21 promotes human nucleus pulposus cell proliferation through PTEN/AKT signaling[J]. Int J Mol Sci, 2014, 15(3): 4007-4018.

[13] Wang HQ, Yu XD, Liu ZH, et al. Deregulated miR-155 promotes Fas-mediated apoptosis in human intervertebral disc degeneration by targeting FADD and caspase-3[J]. J Pathol, 2011, 225(2): 232-242.

[14] Tsirimonaki E, Fedonidis C, Pneumaticos SG, et al. PKCε signalling activates ERK1/2, and regulates aggrecan, ADAMTS5, and miR377 gene expression in human nucleus pulposus cells[J]. PLoS One, 2013, 8(11): e82045.

[15] Bowden J, Holmes MV. Meta-analysis and Mendelian randomization: a review[J]. Res Synth Methods, 2019, 10(4): 486-496.

[16] Zuccolo L, Holmes MV. Commentary: Mendelian randomization-inspired causal inference in the absence of genetic data[J]. Int J Epidemiol, 2017, 46(3): 962-965.

[17] Huan TX, Rong J, Liu CY, et al. Genome-wide identification of microRNA expression quantitative trait loci[J]. Nat Commun, 2015, 6: 6601.

[18] Yoshioka K, Takemura T, Tohda M, et al. Glomerular localization of type Ⅲ collagen in human kidney disease[J]. Kidney Int, 1989, 35(5): 1203-1211.

[19] Legrand A, Guery C, Faugeroux J, et al. Comparative therapeutic strategies for preventing aortic rupture in a mouse model of vascular Ehlers-Danlos syndrome[J]. PLoS Genet, 2022, 18(3): e1010059.

[20] Watanabe A, Shimada T. Vascular type of Ehlers-Danlos syndrome[J]. J Nippon Med Sch, 2008, 75(5): 254-261.

[21] Ucaryilmaz Metin C, Ozcan G. Comprehensive bioinformatic analysis reveals a cancer-associated fibroblast gene signature as a poor prognostic factor and potential therapeutic target in gastric cancer[J]. BMC Cancer, 2022, 22(1): 692.

[22] Gruber HE, Hoelscher GL, Ingram JA, et al. Variations in aggrecan localization and gene expression patterns characterize increasing stages of human intervertebral disk degeneration[J]. Exp Mol Pathol, 2011, 91(2): 534-539.

[23] Cevei M, Roşca E, Liviu L, et al. Imagistic and histopathologic concordances in degenerative lesions of intervertebral disks[J]. Rom J Morphol Embryol, 2011, 52(1 Suppl): 327-332.

[24] Ordaz A, Anderson B, Zlomislic V, et al. Paraspinal muscle gene expression across different aetiologies in individuals undergoing surgery for lumbar spine pathology[J]. Eur Spine J, 2023, 32(4): 1123-1131.

[25] Chen WH, Lo WC, Lee JJ, et al. Tissue-engineered intervertebral disc and chondrogenesis using human nucleus pulposus regulated through TGF-beta1 in platelet-rich plasma[J]. J Cell Physiol, 2006, 209(3): 744-754.

[26] Perucho L, Artero-Castro A, Guerrero S, et al. RPLP1, a crucial ribosomal protein for embryonic development of the nervous system[J]. PLoS One, 2014, 9(6): e99956.

[27] He ZX, Xu Q, Wang X, et al. RPLP1 promotes tumor metastasis and is associated with a poor prognosis in triple-negative breast cancer patients[J]. Cancer Cell Int, 2018, 18: 170.

[28] Forrest MP, Hill MJ, Quantock AJ, et al. The emerging roles of TCF_4 in disease and development[J]. Trends Mol Med, 2014, 20(6): 322-331.

[29] Papes F, Camargo AP, de Souza JS, et al. Transcription Factor 4 loss-of-function is associated with deficits in progenitor proliferation and cortical neuron content[J]. Nat Commun, 2022, 13(1): 2387.

[30] 范东东，原向伟. Wnt信号通路在椎间盘退变中的作用机制研究进展[J]. 医药前沿，2023，9(6)：67-70.

Fan DD, Yuan XW. Research progress on the mechanism of Wnt signaling pathway in intervertebral disc degeneration[J]. J Front Med, 2023, 9(6): 67-70.

（责任编辑：周一青）