

肌腱损伤免疫微环境稳态失调相关关键基因的识别和验证

尹金宝,熊 晖,唐泽立,孙艳芹* (广东医科大学基础医学院,广东东莞 523808)

摘要:目的 识别肌腱损伤免疫微环境稳态失调关键基因。方法 GSE26051 数据集中,基于“wilcoxon”检验筛选的差异表达基因谱构建加权基因共表达网络,以识别肌腱损伤相关基因模块。利用“ClusterProfiler”包对基因进行功能注释和富集分析,并借助“igraph”包构建基因互作网络并衡量节点重要性,通过Q统计量综合排序确定关键基因。运用“ssGSEA”包和“ConsensusClusterPlus”包对样本免疫微环境状态进行量化并聚类。分析不同状态下免疫细胞浸润的差异性,并对关键基因和不同免疫微环境状态关系进行分析和验证。结果 基于2 571个差异表达基因谱的加权基因共表达网络分析,确认蓝色、绿色和黄色模块为疾病相关基因模块,模块内992个基因显著富集在细胞外基质-受体相互作用、细胞周期、胶原代谢等通路。Q统计量排序显示ASPM、CCNB1、CENPF、CDCA5和C1QTNF6为关键基因。聚类分析表明肌腱损伤患者可以分为不同的免疫微环境状态。5个关键基因在免疫激活状态具有更高的表达水平及更好的诊断性能,其表达水平与免疫激活之间的关联性也得到验证。结论 ASPM、CCNB1、CENPF、CDCA5和C1QTNF6可能是肌腱损伤免疫微环境稳态失调的关键基因。

关键词: 肌腱病; 肌腱损伤; 加权基因共表达分析算法; 免疫微环境; 关键基因

中图分类号: R 365

文献标志码: A

文章编号: 2096-3610 (2024) 05-0535-10

Identification and validation of key genes associated with immune microenvironment homeostasis imbalance in tendon injury

YIN Jinbao, XIONG Hui, TANG Zeli, SUN Yanqin* (Guangdong Medical University, Dongguan 523808, China)

Abstract: Objective To identify key genes associated with the dysregulation of the immune microenvironment in tendon injury. Methods In the GSE26051 dataset, we constructed a weighted gene co-expression network based on differentially expressed gene profiles selected using the Wilcoxon test to identify gene modules related to tendon injury. We employed the “ClusterProfiler” package for functional annotation and enrichment analysis of the genes, and used the “igraph” package to construct a gene interaction network and assess node importance. Key genes were determined through comprehensive ranking using Q statistics. Additionally, the “ssGSEA” and “ConsensusClusterPlus” packages were utilized to quantify and cluster the immune microenvironment states of the samples. We analyzed the differences in immune cell infiltration under different states and examined the relationships between key genes and the immune microenvironment states, followed by validation. Results Based on the profiles of 2,571 differentially expressed genes, weighted gene co-expression network analysis identified the blue, green, and yellow modules as disease-associated gene modules. Within these modules, 992 genes were significantly enriched in pathways related to extracellular matrix-receptor interactions, the cell cycle, and collagen metabolism. The ranking of Q statistics indicated that ASPM, CCNB1, CENPF, CDCA5, and C1QTNF6 are key genes. Clustering analysis revealed that patients with tendon injuries can be classified into different immune microenvironment states. The five key genes exhibited higher expression levels and better diagnostic performance in the immune-activated state, and the association between their expression levels and immune activation was also validated. Conclusion ASPM, CCNB1, CENPF, CDCA5, and C1QTNF6 are key genes involved in the dysregulation of the immune microenvironment in tendon injuries.

Key words: tendinopathy; tendinopathic injury; WGCNA; immune microenvironment; key genes

收稿日期: 2024-06-28

基金项目: 广东省基础与应用基础研究基金自然科学基金项目(2022A1515012190), 湛江市科技发展专项资金竞争性分配项目(2022A01018), 广东省医学科研基金(A2023169)

作者简介: 尹金宝,男,博士,实验师, E-mail: yjb@gdmu.edu.cn

通信作者: 孙艳芹,女,博士,副教授, E-mail: sunyanqin@gdmu.edu.cn

肌腱病是临床诊疗中最常见的一种运动损伤性疾病。近年来,肌腱病的发病率有逐年提高的趋势,统计显示 30%~50%的运动损伤都与肌腱病相关^[1-2]。免疫微环境稳态失调被认为是导致肌腱慢性损伤患者功能丧失的主要原因之一^[3]。目前关于肌腱病的发病和进展过程中免疫微环境失调所扮演的角色仍未阐明。伴随着高通量技术的发展,海量疾病相关的转录组数据产生,生物信息学成为整合、分析和解释这些数据的关键工具。因此,本研究通过下载肌腱病转录组数据并采用了生物信息学分析方法的研究策略,以期揭示肌腱损伤过程中免疫微环境失调的分子机制的相关研究提供新的思路。

1 材料和方法

1.1 数据下载和整理

利用“GEOquery”包下载和整理 GEO (gene expression omnibus) 数据库数据集 GSE26051 和 GSE167226。其中 GSE26051 数据集包含有 23 例肌腱病样本及配对样本转录组数据, GSE167226 数据集则来自 19 例患者的手术腓绳肌肌腱组织的表达谱。数据集下载后,使用各自对应的注释平台文件进行探针重注释,重注释过程中,将对应多个基因或没有对应基因的探针删除,而多个探针对应同一个基因的值取平均。最后,使用 R 中的“Limma”包中的 normalizeBetweenArrays 函数对表达谱进行分位数标准化处理,用于后续分析。工作流程如图 1 所示。

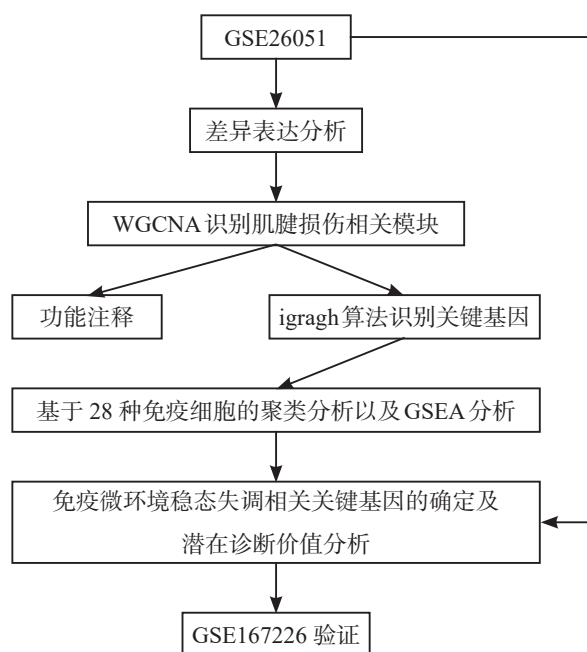


图 1 工作流程图

1.2 差异表达分析

利用“limma”包中“wilcoxon 检验方法”进行肌腱病与非肌腱病患者的基因差异表达分析,以 $P < 0.05$ 为差异表达基因的筛选标准,利用 R 软件的“ggplot2”和“scatterplot3d”包绘制火山图和主成分分析图。

1.3 加权基因共表达网络分析(WGCNA)

基于差异表达基因的转录组数据构建加权基因共表达网络,具体过程由 R 中的“WGCNA”包完成。首先,基于 pickSoftThreshold 函数进行软阈值(β)筛选,以便将两基因的相关矩阵转为邻接矩阵。然后,根据模块间的相异性,在邻接矩阵转为 TOM (topological overlap measure) 矩阵的基础上,采用动态剪切树算法进行基因共表达模块的分割,其中将模块内最少基因数设置为 50; 基于模块相似性为 0.75 进行模块合并; 最后,利用“Pearson”对模块特征值 ME (module eigenvalue) 与样本表型相关性(肌腱慢性损伤与非肌腱损伤样本)进行计算,并根据模块与表型的相关程度及对应 P 值确定肌腱慢性损伤相关基因模块。

1.4 肌腱损伤相关基因模块功能注释

借助“ClusterProfiler”R 包对肌腱损伤相关模块内的基因进行功能注释(GO)和 KEGG (Kyoto encyclopedia of genes and genomes) 通路分析,而 GO 又包括生物过程(BP)、细胞组分(CC)和分子功能(MF)。其中, FDR (矫正后的 P 值) < 0.05 被认为是基因富集显著性条目。

1.5 肌腱损伤关键基因的识别

基于 WGCNA 包输出肌腱损伤模块内基因之间权重关系,以权重值大于 0.1 的基因构建基因网络。参考相关文献[4],利用“igraph”包中的“degree”(度)、“betweenness”(间度)、“eigenvalue”(特征值)、“PageRank”(页面排序)、和“closeness”(接近度) 5 种算法衡量基因网络中节点的重要性,并通过 Q 统计量对 5 种算法所得权重值进行综合排序,并将权重值最大的基因定义为肌腱损伤关键基因。

1.6 免疫微环境稳态失调关键基因的识别和验证

使用“ssGSEA”算法计算 GSE26051 数据集中 28 种免疫细胞浸润水平,并运用“ConsensusClusterPlus”算法进行一致性聚类分析,以评估肌腱损伤患者免疫微环境状态。其中,后者运行过程中的主要参数设置为: clusterAlg=“km”, distance=“euclidean”, pItem=0.8, reps=500。

采用“Wilcoxon”检验不同免疫微环境状态下肌腱损伤关键基因的表达情况,并将差异有统计学意义 ($P < 0.05$) 的基因定义为肌腱损伤免疫微环境稳态失

调的关键基因。此外,为探究不同免疫微环境状态下关键基因在肌腱损伤中的临床意义,利用“PRoC”R包对其在不同状态下的诊断性能进行分析。

1.7 基因集富集分析(GSEA)

利用GSEA软件(版本:GSEA_4.3.2)在数据集GSE26051中探索不同免疫状态下T细胞和B细胞富集情况。使用GSEAPreranked方法在数据集GSE167226对关键基因与免疫间的关系进行验证,参考基因集为“h.all.v2023.2.Hs.symbols.gmt”。

1.8 统计学处理

基于4.2.3版本的R软件进行数据分析,除非特别说明,均以 $P<0.05$ 或 $FDR<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肌腱损伤的差异表达分析

根据GPL70平台文件对GSE26051表达谱进行基因重注释,图2A显示重注释后的表达谱中,样本间的基因表达分布差异明显,为保证后续分析严谨性,转录组数据进行标准化处理,使样本的基因表达分布趋于一致(图2B)。图2C火山图显示差异分析结果,相较于正常组,在肌腱损伤组中共筛选出2571个表达差异基因(1555个上调基因和1016个下调基因,

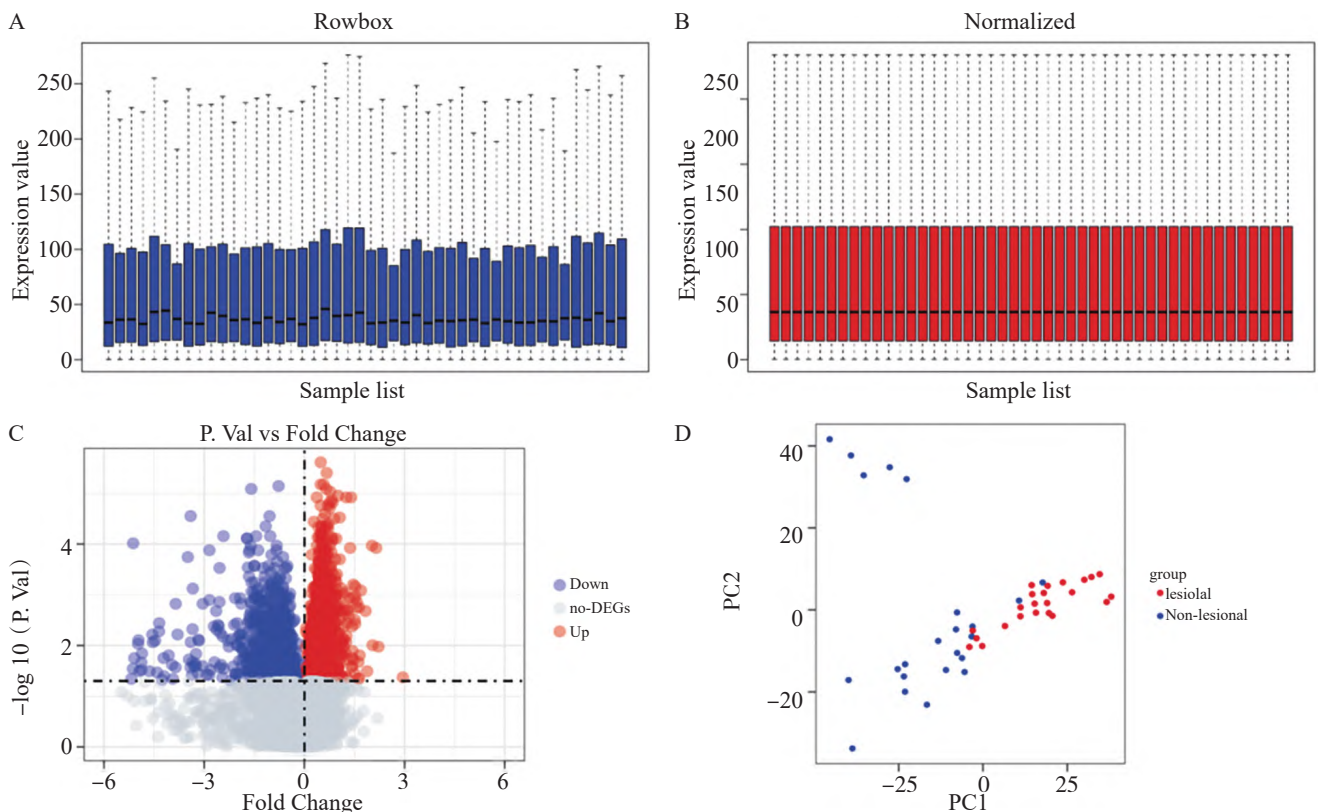
$P<0.05$)。同时,基于上述差异表达基因的主成分分析显示肌腱损伤样本与非损伤样本的基因表达模式存在差异($P<0.05$),见图2D。

2.2 加权基因共表达网络构建

在数据集GSE26051中,提取2571个差异基因表达谱构建了加权基因共表达网络。图3A展示了差异基因表达谱数据的层次聚类树和对应样本信息的热图。为满足无标度网络的构建标准,选择软阈值 $\beta=6$ (signed $R^2=0.82$, slope=-1.77),并进行了有效验证,结果见图3B、C。基于拓扑矩阵进行模块分割并将相似度较高的模块合并,共获得8个不同的基因共表达模块(图3D)。基于每个模块的特征值与样本信息的相关性结果显示:青色、棕色和红色模块与肌腱损伤呈负相关,而绿色、蓝色和黄色模块则与肌腱损伤呈正相关($P<0.05$),见图4。其中,绿色模块有201个基因,蓝色模块有520个基因,黄色模块有271个基因。根据研究目的,将绿色、蓝色和黄色3个模块内的基因作为候选模块,用于后续分析。

2.3 肌腱损伤正相关模块内基因的富集分析

为探索绿色、蓝色和黄色3个模块与肌腱损伤正相关的潜在机制,对上述模块内的992个基因进行富集分析,结果显示:多个基因显著富集在细胞外基质组织、



A. 样本归一化前的数据分布; B. 样本归一化后的数据分布; C. 差异基因表达的火山图; D. 基于差异表达基因的主成分分析。

图2 数据集GSE26051中转录组数据标准化处理和基因差异表达分析

细胞外结构组织、外部包裹结构组织等与细胞外基质-受体相互作用的相关条目,而与细胞周期相关的有丝分裂细胞周期相转变、核分裂等条目,以及肌腱损伤修复相关的肌动蛋白纤维组织和肌细胞分化、肌动蛋白结合和胶原蛋白结合等条目也有广泛富集(图 5A)。KEGG 通路富集分析表明多个基因显著富集在目前已知的与肌腱损伤相关的细胞外基质-受体相互作用、p53 信号通路、细胞周期、TGF-beta 信号等通路,结果见图 5B。

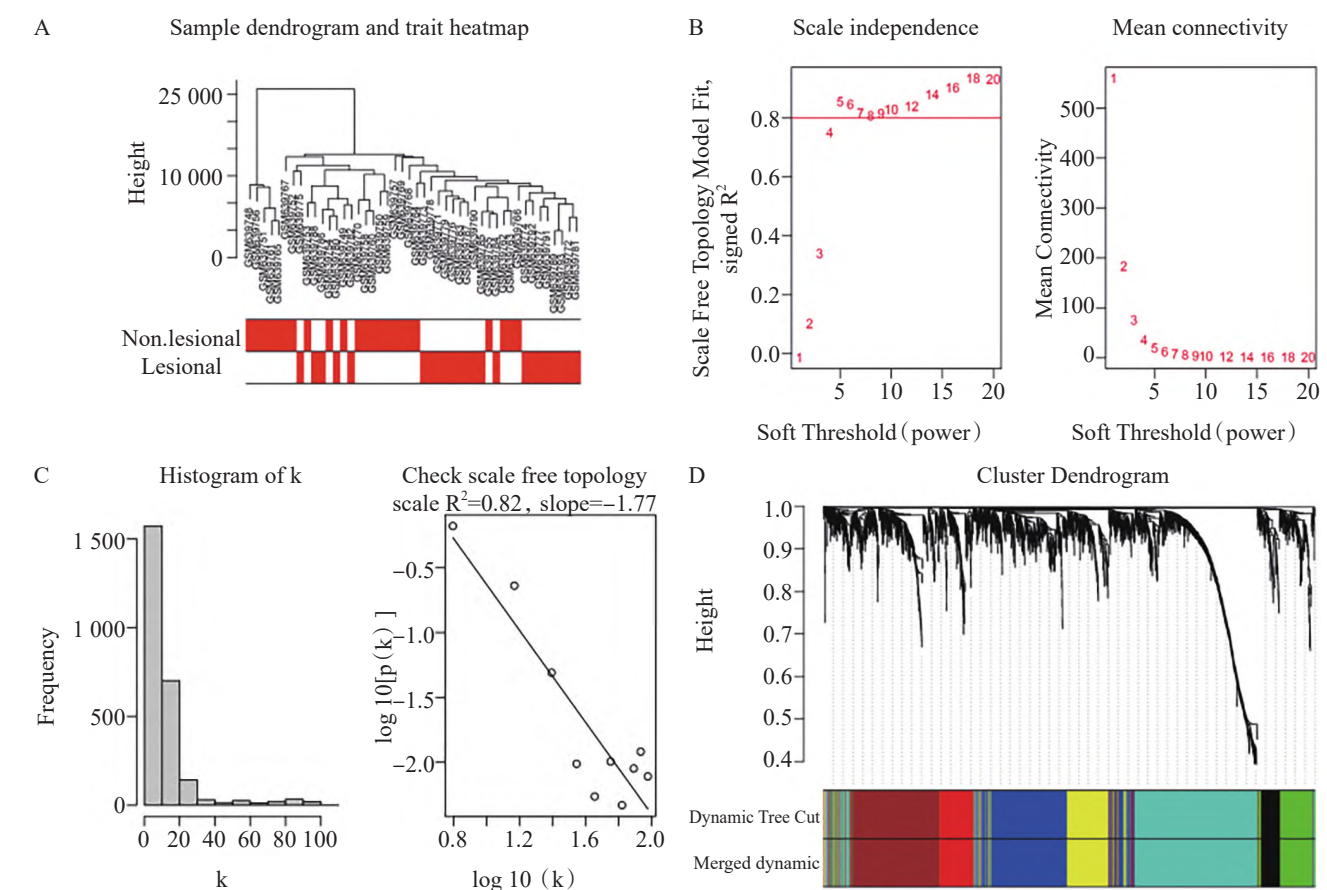
2.4 肌腱损伤相关基因共表达模块内关键基因的筛选

根据权重值大于 0.1 的标准,在绿色、蓝色和黄色模块中分别识别出了 156、308 和 653 个基因对。利用“igraph”R 包将上述 1 117 个基因对构建基因互作网络并利用 5 种算法重新评估每个节点的重要性。通

过 Q 统计量整合 5 种算法后,将排序最靠前的 ASPM、C1QTNF6、CCNB1、CDCA5 和 CENPF 定义为肌腱损伤共表达基因网络中最核心节点基因,即肌腱损伤关键基因。表 1 展示 Q 统计量 5 种算法中排名最靠前的 5 个基因,表 2 为 5 个关键基因的相关信息。差异分析显示,相较于非损伤,在肌腱损伤中,ASPM、C1QTNF6、CCNB1、CDCA5 和 CENPF 的表达水平上升 ($P<0.05$),见图 6,表明它们参与了肌腱损伤过程。

2.5 关键基因与免疫微环境状态关系的识别与验证

基于 28 种免疫细胞的相对丰度对 GSE26051 数据集中的肌腱损伤样本进行一致性聚类分析,结果见图 7,在 $k=2$ 的情况下,23 名肌腱损伤患者被分为 2 个亚群: cluster1 (15 例) 和 cluster2 (8 例)。其

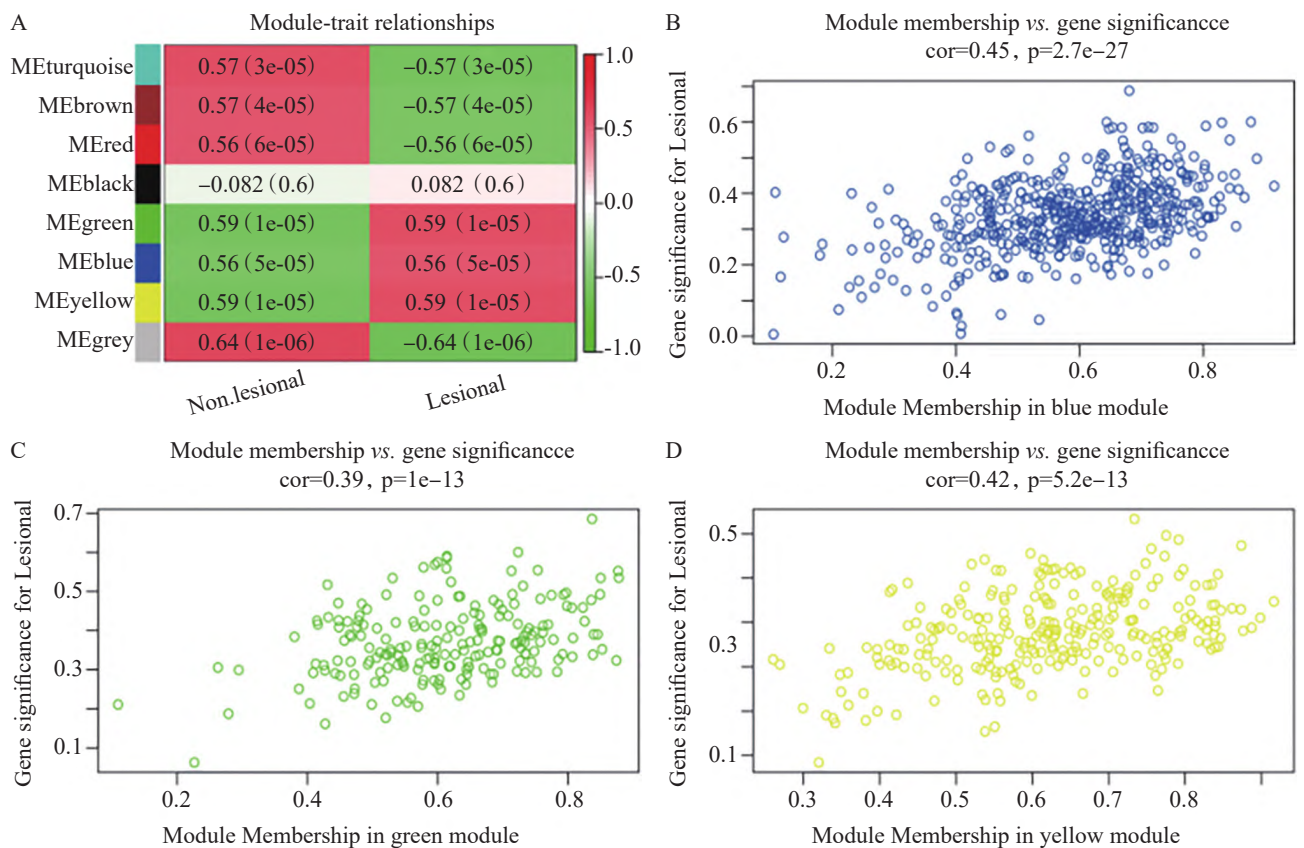


A. 样本树状图(上)和特征热图(下); B. 随着软阈值(β)变化的规模独立性图(左)和平均连通性分布图(右); C. 连通性分布的直方图(左)和 β 为 6 时的无尺度拓扑检查图(右); D. 共表达聚类树状图。

图 3 数据集 GSE26051 中的差异表达基因数据构建加权基因共表达网络

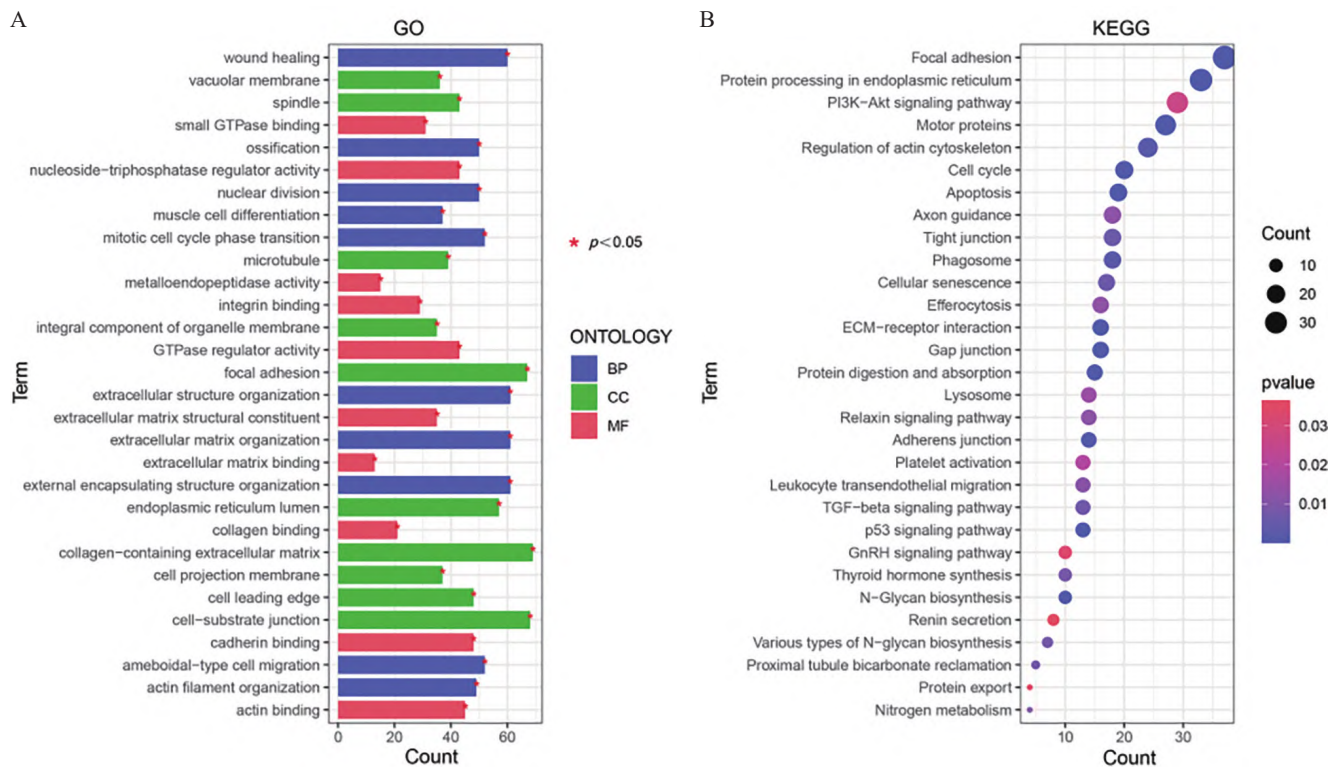
表 1 Q 统计量整合 5 种算法后重新排序结果中排名最靠前的 5 个基因

基 因	度	接近度	间度	页面排序	特征值	Q 统计得分
ASPM	72	0.055 555 556	595.089 679 8	0.041 134 990	1	0.956 967 402
CENPF	54	0.025 000 000	337.547 700 9	0.009 707 385	0.916 047 054	0.852 147 494
CCNB1	40	0.026 315 789	110.370 848 6	0.007 564 446	0.798 587 466	0.840 820 075
CDCA5	20	1	26.754 395 60	0.017 492 955	0.502 774 894	0.836 859 507
C1QTNF6	20	1	4.134 523 810	0.017 972 798	0.405 910 126	0.810 739 646



A. 模块-特征关系的热图; B. 蓝色模块中基因显著性与模块成员资格的散点图; C. 绿色模块中基因显著性与模块成员资格的散点图; D. 黄色模块中基因显著性与模块成员资格的散点图。

图4 肌腱损伤相关基因共表达模块的识别



A. GO 功能注释; B. KEGG 通路富集分析。

图5 肌腱损伤相关基因共表达模块内基因的富集分析

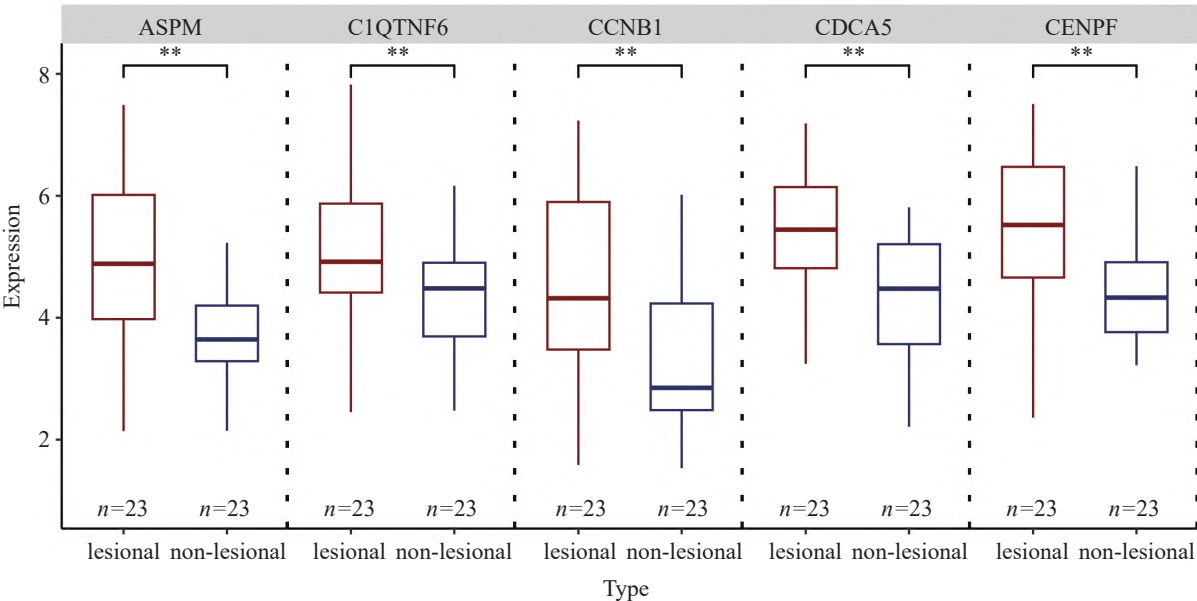
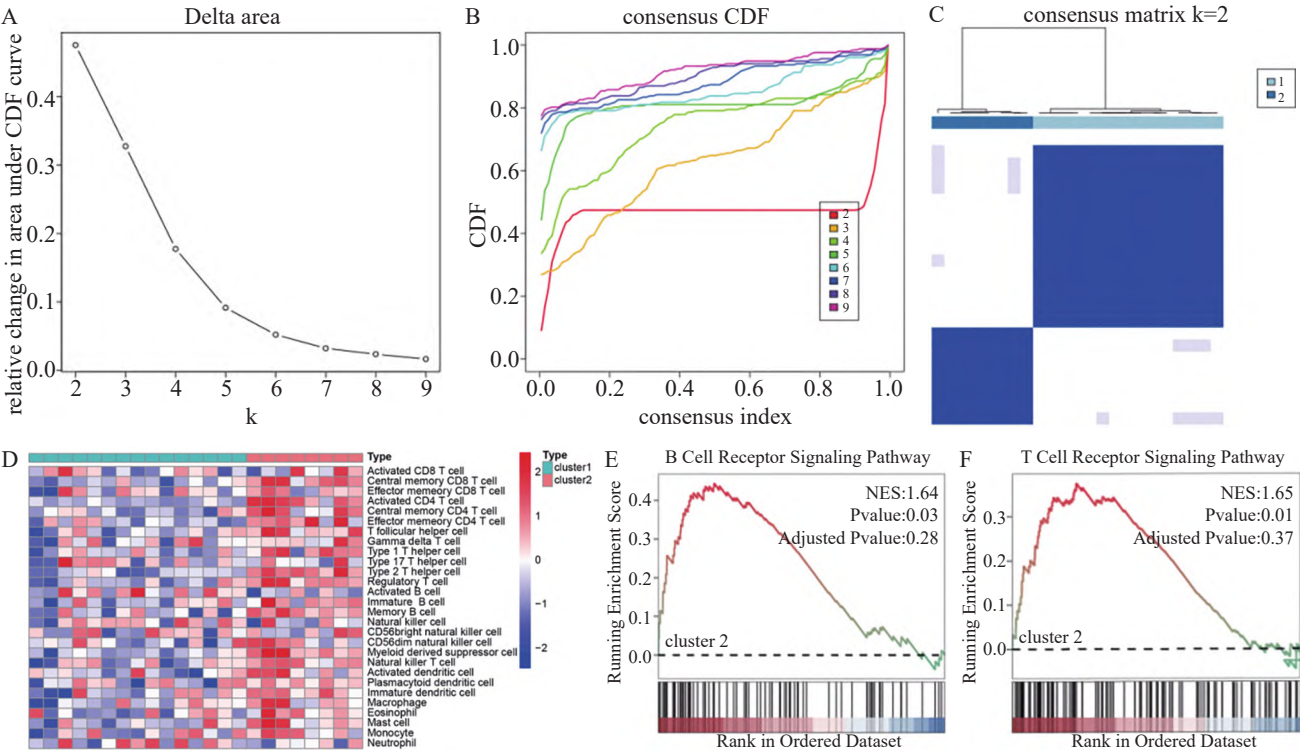


图6 肌腱损伤关键基因的差异表达分析



A.Delta 面积图显示了 CDF 曲线下面积的相对变化; B.每个 k(用颜色表示)的共识矩阵的共识累积分布函数(CDF); C.共识矩阵显示了用彩色矩形标记的集群成员关系; D.热图显示免疫激活相关细胞在 cluster2 样本中富集; E.cluster2 亚群中 B 细胞受体信号通路显著富集; F.cluster2 亚群中 T 细胞受体信号通路显著富集。

图7 肌腱损伤免疫微环境状态亚型的识别

表2 5个关键基因的相关信息

基 因	基因 ID	基因全称	基因功能描述
ASPM	259266	Assembly Factor For Spindle Microtubules	基因编码蛋白与细胞分裂和神经元生成有关
CCNB1	891	Cyclin B1	基因编码蛋白在细胞周期的 G2/M 期起重要作用
CENPF	1063	Centromere Protein F	基因编码蛋白与中心体和染色体分离相关
CDCA5	113130	Cell Division Cycle Associated 5	基因编码蛋白在染色体分离过程中发挥作用
C1QTNF6	114904	C1q And TNF Related 6	基因编码蛋白免疫反应及细胞信号转导有关

中,与 cluster1 亚群比较,cluster2 亚群中的 Activated CD8 T cell、Activated CD4 T cell、Natural killer T cell、Activated dendritic cell 及 Macrophage 占比更为丰富。进一步的 GSEA 分析结果也显示 cluster2 亚群中 T 细胞受体信号通路和 B 细胞受体信号通路显著富集,提示 cluster1 和 cluster2 患者在免疫微环境状态上存在差异,cluster2 具有更为活跃的免疫反应状态。

基于上述分析,对 ASPM、C1QTNF6、CCNB1、CDCA5 和 CENPF 在 cluster1 和 cluster2 两个亚组中的表达水平进行比较,发现这 5 个基因在两种不同免疫微环境状态的表达具有差异性,活跃的免疫反应状态即 cluster2 亚群中具有更高的表达水平(图 8A, $P<0.01$)。鉴于 5 个基因在肌腱损伤相关基因网络的

核心地位及其与免疫微环境状态的关系,最终将其鉴定为介导肌腱损伤免疫微环境稳态失调的关键基因。5 个基因在两种免疫微环境状态下具有不同的诊断性能,相较 cluster1,5 个关键基因在 cluster2 人群中具有更高的诊断性能,见图 8B、C。

2.6 介导肌腱损伤免疫微环境稳态失调关键基因的验证

基于数据集 GSE167226 对肌腱损伤免疫微环境稳态失调关键基因进行验证,结果见图 9 所示。免疫调控相关的干扰素 α 反应、干扰素 γ 反应、凋亡及补体等特征基因集中的条目,在 ASPM、C1QTNF6、CCNB1 和 CDCA5 正相关基因中显著富集。细胞周期和增殖调控相关的 E2F 目标基因、G2/M 检查点和 DNA 修复等

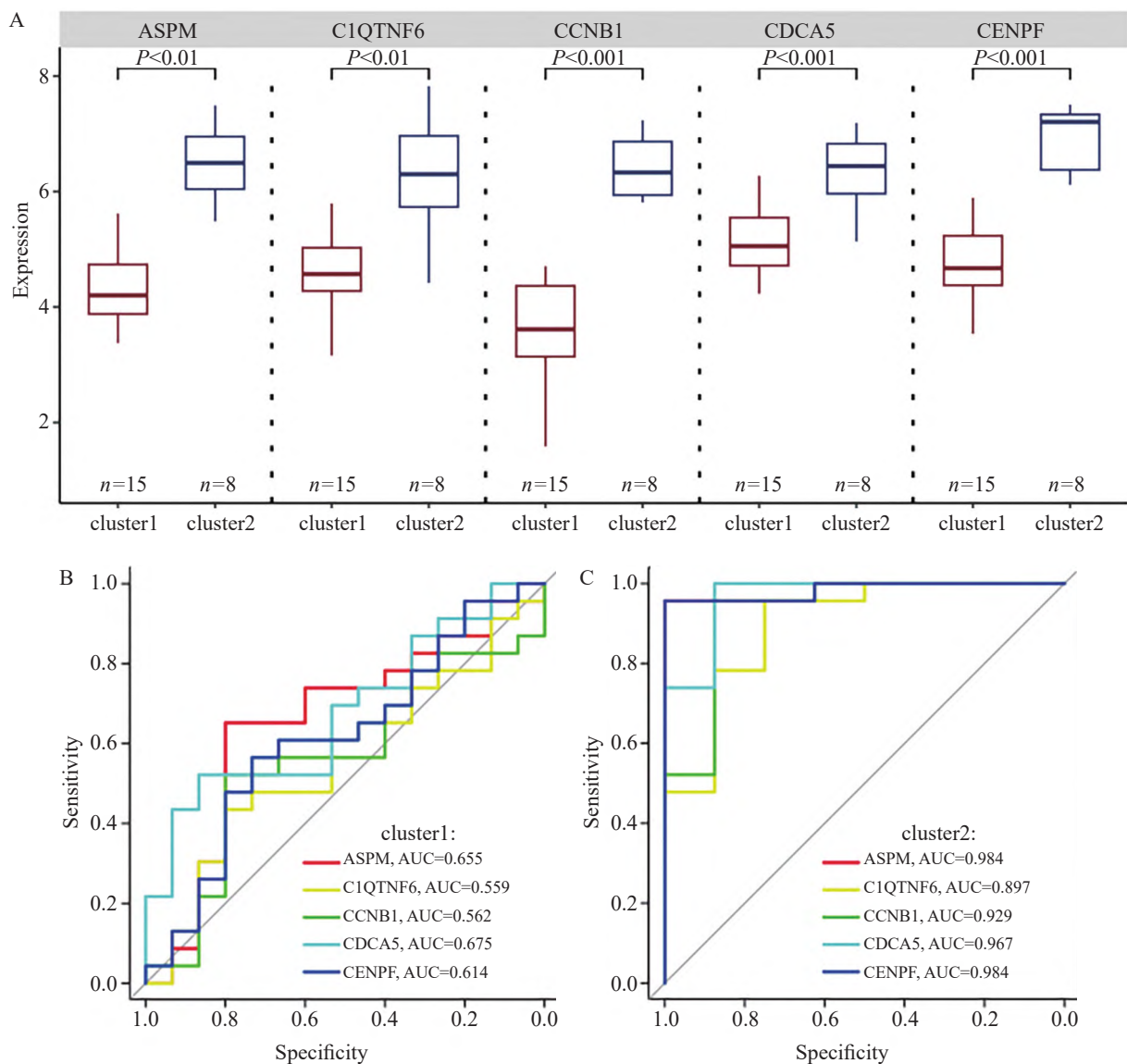
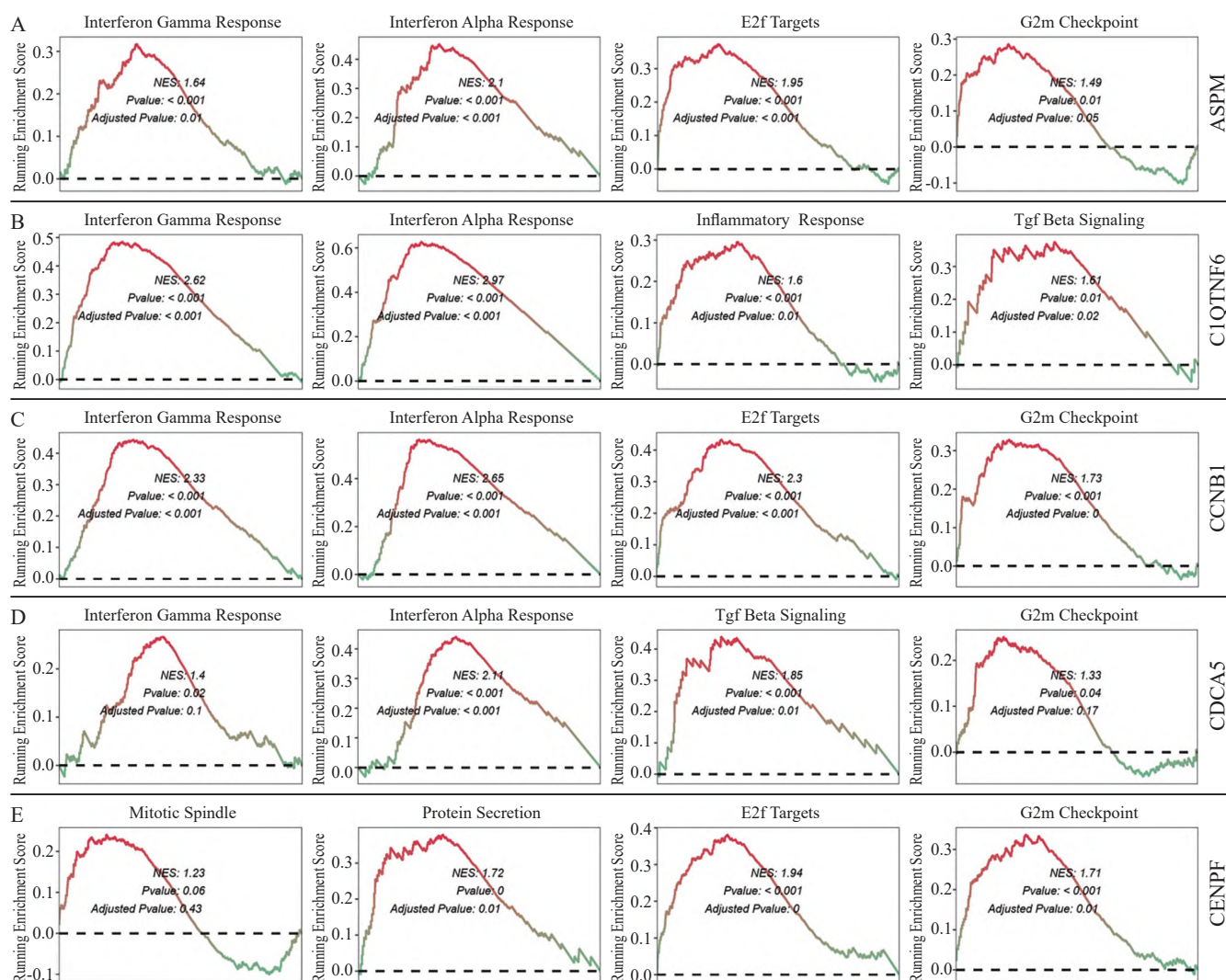


图 8 5 个关键基因在肌腱损伤不同免疫微环境状态下的表达差异性 & 诊断性能分析



A. 基于 ASPM 相关性基因的 GSEA 分析; B. 基于 C1QTNF6 相关性基因的 GSEA 分析; C. 基于 CCNB1 相关性基因的 GSEA 分析; D. 基于 CDCA5 相关性基因的 GSEA 分析; E. 基于 CENPF 相关性基因的 GSEA 分析。

图9 数据集 GSE167226 对肌腱损伤免疫微环境稳态失调关键基因的验证

特征基因集,在 ASPM、CENPF、CDCA5 和 CCNB1 正相关基因中也显著富集)。此外, TGF- β 信号通路还在 CDCA5 正相关基因和 C1QTNF6 正相关基因中富集。这表明 ASPM、C1QTNF6、CCNB1、CDCA5 和 CENPF 在介导肌腱损伤免疫微环境稳态失调过程中具有复杂且不同的免疫调控机制。

3 讨论

肌腱损伤的发生和发展是一个复杂的过程,涉及多种细胞和分子机制的相互作用。WGCNA 是一种最常用的基因共表达网络分析方法,通过 WGCNA 分析,可以识别出样本特定表型相关的基因共表达模块。本研究首先运用 WGCNA 算法对肌腱损伤转录组数据进行分析,成功识别出肌腱损伤呈正相关的 3 个基因共表达模块。富集分析显示这 3 个模块内的基因显

著富集在 ECM、TGF- β 信号通路、胶原代谢及细胞周期等条目。目前研究表明,ECM 组织紊乱是肌腱损伤功能障碍主要原因之一,而 TGF- β 信号通路在维持肌腱细胞命运和肌腱发育的早期事件中也发挥了核心作用^[5-6]。此外,胶原代谢与肌腱病具有密切关系,而多项研究已指出细胞衰老程度与人体肌腱病严重程度呈正相关,表明本研究中初步识别出的 3 个模块内的基因参与了肌腱病的损伤机制,为后续相关分析奠定了基础^[7-9]。

因在特定生物过程或疾病进展中扮演重要调控角色,关键基因成为研究者关注的焦点。因此,本研究基于肌腱损伤相关的蓝色、绿色和黄色模块内的基因进行了关键基因的鉴定,最终筛选出 ASPM、C1QTNF6、CCNB1、CDCA5 和 CENPF 5 个肌腱损伤关键基因。其中,ASPM 基因编码蛋白是一种纺锤体

极/中间体蛋白,在细胞复制过程中的有丝分裂纺锤体功能中发挥重要作用,在肿瘤疾病中被认为是一种致癌基因,主要与胚胎发育和神经系统发育相关^[10]。C1QTNF6 基因编码 C1q 和肿瘤坏死因子相关蛋白 6,相关研究表明 C1QTNF6 在心脏纤维化、炎症反应、内皮细胞功能、纤维生成、脂肪酸代谢和癌等疾病进程中具有重要作用^[11-12]。CCNB1 基因编码细胞周期蛋白 B1,是细胞分裂调控的关键蛋白质,其异常表达通常与癌症和卡辛-贝克病的软骨细胞损伤有关^[13]。CDCA5 基因同样编码细胞分裂周期相关蛋白,在 DNA 修复和有丝分裂过程中发挥重要作用,并与肿瘤的恶性进展相关^[14]。CENPF 基因编码着丝粒蛋白 F,参与了染色体对齐和分离过程,且与肿瘤发生密切相关^[15]。截至目前,关于上述 5 个基因的研究仍主要集中在肿瘤方面,而在非肿瘤疾病中的相关研究较缺乏。在本研究中,5 个基因均处于肌腱损伤正相关基因共表达网络核心地位,差异分析也显示其在肌腱损伤中显著上调,意味着它们参与了肌腱损伤过程。有研究表明细胞凋亡表型与肌腱病的严重程度呈正相关,而上述 5 个基因均与细胞周期调控具有相关性。因此,本研究为后续开展肌腱损伤与凋亡表型之间关系提供了候选分子。

肌腱损伤与免疫微环境稳态失调之间存在紧密关联。Yang 等^[16]研究表明肌腱损伤会触发免疫反应,导致肌腱功能的主要参数——张力强度丧失。而在肌腱愈合过程中,力学力量的调节也会改变免疫反应,从而促进再生。Salles 等^[17]研究发现在肌腱损伤修复过程中,除了巨噬细胞和肥大细胞的招募,以及肌腱损伤微环境中血管生成信号的增加外,CD4T 细胞也会迁移到组织中,增强天然免疫反应。本研究中,基于 28 种免疫细胞浸润水平的聚类分析可以将肌腱损伤患者显著分为具有不同免疫状态的亚群,进一步证明肌腱损伤与免疫之间的相关性。对于本研究识别出的 5 个肌腱损伤关键基因,发现其在肌腱损伤不同免疫微环境状态下的表达具有差异性,并显示其对肌腱损伤具有不同的诊断性能,反映了它们与肌腱损伤中免疫微环境塑造或者免疫反应相关。有研究发现 ASPM 参与了膀胱癌肿瘤微环境中 CD8⁺T 细胞、中性粒细胞和树突状细胞的浸润^[18];C1QTNF6 在中风患者中可直接调节白细胞中促炎细胞因子基因的表达^[19];CCNB1 不仅被认为是影响肝癌肿瘤微环境免疫活性的肿瘤启动子,还被发现参与了乳腺癌的免疫浸润^[20-21];CENPF 可调控肺腺癌中的免疫细胞浸润,且与黑色

素瘤中的 CD4⁺ 记忆 T 细胞标记物相关^[22-23];CDCA5 高表达的肺腺癌患者更适合抗 PD-1 和抗 PD-L1 治疗,提示 CDCA5 同样参与了肺腺癌免疫微环境的失调过程^[24]。本研究利用不同的数据集和算法,确定了 ASPM、CCNB1、CENPF、CDCA5 和 C1QTNF6 为肌腱损伤免疫微环境稳态失调的关键基因。根据 GSEA 分析结果,发现这些基因一方面可能直接参与免疫调控作用,另一方面可能通过参与细胞周期或细胞增殖等通路间接作用,这就需要后续开展分子生物学实验进行验证。

综上所述,通过多种生物信息学分析的方法和思路,本研究不仅成功识别出与肌腱损伤相关的 3 个共表达基因模块,还确定了模块内的关键基因 ASPM、C1QTNF6、CCNB1、CDCA5 和 CENPF 可能参与了肌腱损伤免疫微环境稳态失调过程。这些研究结果为进一步深入探究肌腱损伤过程中免疫微环境稳态失调的机制以及开发相关治疗策略提供了新的线索和理论基础。

参考文献:

- [1] VAN DER VLIST A C, VAN VELDHOFEN P L J, VAN OOSTEROM R F, et al. Isometric exercises do not provide immediate pain relief in Achilles tendinopathy: a quasi-randomized clinical trial [J]. Scand J Med Sci Sports, 2020, 30(9): 1712-1721.
- [2] VAN VIJVEN M, WUNDERLI S L, ITO K, et al. Serum deprivation limits loss and promotes recovery of tenogenic phenotype in tendon cell culture systems [J]. J Orthop Res, 2021, 39(7): 1561-1571.
- [3] AKBAR M, MACDONALD L, CROWE L A N, et al. Single cell and spatial transcriptomics in human tendon disease indicate dysregulated immune homeostasis [J]. Ann Rheum Dis, 2021, 80(11): 1494-1497.
- [4] ZHOU S, HUANG Y E, LIU H, et al. Single-cell RNA-seq dissects the intratumoral heterogeneity of triple-negative breast cancer based on gene regulatory networks [J]. Mol Ther Nucleic Acids, 2021, 23: 682-690.
- [5] THANKAM F G, ROESCH Z K, DILISIO M F, et al. Association of inflammatory responses and ECM disorganization with HMGB1 upregulation and NLRP3 inflammasome activation in the injured rotator cuff tendon [J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 8918.
- [6] TAN G K, PRYCE B A, STABIO A, et al. Tgf β signaling is critical for maintenance of the tendon cell fate [J]. Elife, 2020, 9(21): e52695.
- [7] RONG X, TANG Y, CAO S, et al. An extracellular vesicle-cloaked multifaceted biocatalyst for ultrasound-augmented

- tendon matrix reconstruction and immune microenvironment regulation [J]. ACS Nano, 2023, 17(17): 16501-16516.
- [8] ZHU Z, GAO R, YE T, et al. The therapeutic effect of imsc-derived small extracellular vesicles on tendinopathy related pain through alleviating inflammation: An in vivo and in vitro study [J]. J Inflamm Res, 2022, 15: 1421-1436.
- [9] CHEN S Y, JOU I M, KO P Y, et al. Amelioration of experimental tendinopathy by lentiviral CD44 gene therapy targeting senescence-associated secretory phenotypes[J]. Mol Ther Methods Clin Dev, 2022, 26: 157-168.
- [10] ZENG W J, CHENG Q, WEN Z P, et al. Aberrant ASPM expression mediated by transcriptional regulation of FoxM1 promotes the progression of gliomas [J]. J Cell Mol Med, 2020, 24(17): 9613-9626.
- [11] LEI H, WU D, WANG J Y, et al. C1q/tumor necrosis factor-related protein-6 attenuates post-infarct cardiac fibrosis by targeting RhoA/MRTF-A pathway and inhibiting myofibroblast differentiation [J]. Basic Res Cardiol, 2015, 110(4): 35.
- [12] ZHANG W, FENG G. C1QTNF6 regulates cell proliferation and apoptosis of NSCLC in vitro and in vivo [J]. Biosci Rep, 2021, 41(1): BSR20201541.
- [13] SETIWALIDI K, FU J, HEI H, et al. Differential expression of cyclins CCNB1 and CCNG1 is involved in the chondrocyte damage of kashin-beck disease [J]. Front Genet, 2022, 13: 1053685.
- [14] PAN S, ZHAN Y, CHEN X, et al. Identification of biomarkers for controlling cancer stem cell characteristics in bladder cancer by network analysis of transcriptome data stemness indices[J]. Front Oncol, 2019, 9: 613.
- [15] SUN J, HUANG J, LAN J, et al. Overexpression of CENPF correlates with poor prognosis and tumor bone metastasis in breast cancer[J]. Cancer Cell Int, 2019, 19: 264.
- [16] YANG Y, WU Y, ZHOU K, et al. Interplay of forces and the immune response for functional tendon regeneration [J]. Front Cell Dev Biol, 2021, 9: 657621.
- [17] SALLES J I, LOPES L R, DUARTE M E L, et al. Fc receptor-like 3 (-169T>C) polymorphism increases the risk of tendinopathy in volleyball athletes: a case control study[J]. BMC Med Genet, 2018, 19(1): 119.
- [18] XU Y, WU G, LI J, et al. Screening and identification of key biomarkers for bladder cancer: a study based on TCGA and GEO data [J]. Biomed Res Int, 2020, 2020: 8283401.
- [19] HU C, LIU Q, HU C, et al. PLK4 is a potential biomarker for abnormal tumor proliferation, immune infiltration, and prognosis in ccRCC[J]. Comput Math Methods Med, 2022, 2022: 6302234.
- [20] ZHAO Y, YANG J, LIU J, et al. Inhibition of Polo-like kinase 4 induces mitotic defects and DNA damage in diffuse large B-cell lymphoma [J]. Cell Death Dis, 2021, 12(7): 640.
- [21] FU H, LI K, WANG S, et al. High expression of CCNB1 driven by ncRNAs is associated with a poor prognosis and tumor immune infiltration in breast cancer [J]. Aging (Albany NY), 2022, 14(16): 6780-6795.
- [22] CHEN W, LI W, LIU Z, et al. Identification of tumor microenvironment-based genes associated with acquired resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitor in lung adenocarcinoma[J]. J Cancer, 2022, 13(3): 877-889.
- [23] LI M, ZHAO J, YANG R, et al. CENPF as an independent prognostic and metastasis biomarker corresponding to CD4+ memory T cells in cutaneous melanoma [J]. Cancer Sci, 2022, 113(4): 1220-1234.
- [24] SHEN W, TONG D, CHEN J, et al. Silencing oncogene cell division cycle associated 5 induces apoptosis and G1 phase arrest of non-small cell lung cancer cells via p53-p21 signaling pathway [J]. J Clin Lab Anal, 2022, 36(5): e24396.

(责任编辑: 李 晓)