

强直性脊柱炎间充质干细胞差异基因的生物信息学分析

叶天真¹, 李 婷^{2*}

¹湖北中医药大学第一临床学院, 湖北 武汉

²湖北省中西医结合医院, 湖北 武汉

收稿日期: 2023年8月23日; 录用日期: 2023年9月28日; 发布日期: 2023年10月11日

摘 要

目的: 通过生物信息学方法筛选强直性脊柱炎(AS)间充质干细胞核心基因并探讨其作用机制。方法: 在GEO数据库中获取AS转录谱数据并使用R语言对其进行差异基因分析, 再使用R软件对差异基因进行基因本体(GO)功能、京都基因与基因组百科全书(KEGG)富集分析, 通过STRING在线数据库和Cytoscape软件来构建蛋白-蛋白相互作用(PPI)网络并筛选枢纽(Hub)基因, 最后利用R软件对Hub基因的表达水平进行相关性分析。结果: 经R软件DEG分析后得到101个差异基因(DEGs), 其中55个上调基因, 46个下调基因。GO分析主要涉及多生物繁殖、多细胞生物过程, PiRNA代谢过程, 免疫反应等。KEGG分析主要涉及PI3K-Akt信号通路。筛选出前10位Hub基因为ZIC1、EN1、TBX15、PITX2、PSG3、PSG4、PSG6、CPE、HOXC8、MAP2, 它们之间的表达存在正相关。结论: DEGs和Hub基因可能在AS的发生发展中发挥着重要作用, 主要与炎症反应, 骨骼代谢, 软骨细胞增殖分化等相关。

关键词

GEO数据库, 强直性脊柱炎, 生物信息学, 差异基因, 间充质干细胞

Bioinformatics Analysis of Differential Genes in Mesenchymal Stem Cells of Ankylosing Spondylitis

Tianzhen Ye¹, Ting Li^{2*}

¹The First School of Clinical Medicine, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan Hubei

²Hubei Provincial Hospital of Integrated Chinese and Western Medicine, Wuhan Hubei

Received: Aug. 23rd, 2023; accepted: Sep. 28th, 2023; published: Oct. 11th, 2023

*通讯作者。

文章引用: 叶天真, 李婷. 强直性脊柱炎间充质干细胞差异基因的生物信息学分析[J]. 中医学, 2023, 12(10): 2859-2867. DOI: 10.12677/tcm.2023.1210429

Abstract

Objective: This paper aims to screen the core genes of mesenchymal stem cells in ankylosing spondylitis (AS) by bioinformatics and explore its mechanism. **Methods:** The AS transcription profile data were obtained from the GEO database and the differential gene analysis was performed using R language. The gene ontology (GO) function and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) enrichment analysis of the differential genes were performed using R software. The protein-protein interaction (PPI) network was constructed by STRING online database and Cytoscape software, and the hub genes were screened. Finally, the correlation analysis of the expression level of Hub genes was performed using R software. **Results:** A total of 101 differentially expressed genes (DEGs) were obtained by R software DEG analysis, including 55 up-regulated genes and 46 down-regulated genes. GO analysis mainly involves multi-biological reproduction, multi-cellular biological processes, PiRNA metabolic processes, immune responses, etc. KEGG analysis mainly involved the PI3K-Akt signaling pathway. The top 10 Hub genes were ZIC1, EN1, TBX15, PITX2, PSG3, PSG4, PSG6, CPE, HOXC8 and MAP2, and there was a positive correlation between their expression. **Conclusion:** DEGs and Hub genes may play an important role in the occurrence and development of AS, mainly related to inflammatory response, bone metabolism, chondrocyte proliferation and differentiation.

Keywords

GEO Database, Ankylosing Spondylitis, Bioinformatics, Differential Gene, Mesenchymal Stem Cell

Copyright © 2023 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

强直性脊柱炎(Ankylosing Spondylitis, AS)是一种慢性、进行性的炎症性疾病, 主要累及脊柱和骶髋关节, 其症状包括腰背部疼痛、僵硬和功能障碍, 目前发病率越来越高, 年轻成年人也开始出现[1]。AS的具体病因尚不完全清楚, 其中遗传因素被认为是一个重要的影响因素。大约 90%的 AS 患者携带一种遗传标记物称为 HLA-B27 抗原, 一种假说认为 HLA-B27 抗原可能通过与细胞内的内源性抗原结合, 激活免疫系统, 导致炎症反应和组织损伤[2], 然而仅有少数携带该标记物的人最终发展为 AS。免疫系统的异常反应与 AS 的发病相关, AS 患者的免疫系统可引起自身组织发生异常免疫, 导致炎症反应和组织损伤。研究发现[3], 炎症细胞和炎症介质的产生和释放会导致关节和骨骼的炎症和破坏[4], 炎症因子的过度表达可激发炎症细胞的活化和炎症介质的释放, 进一步加剧炎症反应和组织损伤[5]。目前 AS 的治疗主要是缓解症状、减轻炎症和保护关节功能, 效果不明显。

近年来, 间充质干细胞(Mesenchymal Stem Cells, MSCs)在治疗各种疾病方面展现出了巨大的潜力, 其自我更新和多向分化的作用受到了广泛的关注, 它可以从多种组织中分离和培养得到, 如骨髓、脂肪组织和胎盘等[6]。本研究使用基因表达综合数据库(gene expression omnibus, GEO)中的 AS 表达谱芯片数据作为研究基础, 运用生物信息学方法, 旨在寻找与疾病相关的差异表达基因(differentially expressed genes, DEGs)和核心(Hub)基因, 并评估这些核心基因与 AS 关联性, 深入了解 AS 发病机制, 并为 AS 的预防和治疗提供新的思路和方法。

2. 材料与方法

2.1. 数据选择

在 GEO 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)中检索“ankylosing spondylitis”, 筛选获得基因谱表达数据 GSE134290。该基因谱数据来源于 GPL570 平台, 共包含 6 个转录组样本, 分别比较了正常对照组和强直性脊柱炎患者组在第 0 天, 第 3 天和第 7 天成骨诱导期间间充质干细胞的转录谱数据。

2.2. DEGs 的筛选

使用 R 软件(版本 4.2.1)将矩阵数据中的探针 ID 标准化, 利用 limma 包进行差异基因分析。设置 $\log_{2}FC > 1$, $P < 0.05$ 为条件筛选 DEG, 使用 ggplot2 和 pheatmap 包将结果可视化。

2.3. DEGs 的富集分析

使用 R 软件中的 clusterProfiler 包对差异基因进行基因本体(GO)功能、京都基因与基因组百科全书(KEGG)富集分析, 并将结果绘制为柱状图。

2.4. PPI 网络构建及 Hub 基因筛选

将 DEGs 导入 STRING 在线数据库, 设置 Organism 为“Homo sapiens”, 构建蛋白相互作用网络关系, 并通过 Cytoscape 3.9.1 软件绘制 PPI 网络图。并使用 CytoHubba 插件筛选 PPI 网络的枢纽基因。

2.5. Hub 基因间的相关性分析

使用 R 软件中 Pearson 相关分析方法对 10 个枢纽基因的表达水平进行相关性分析, 并绘制相关性分析位图。

3. 结果

3.1. DEGs 表达分析

经 R 软件 DEGs 分析后得到 101 个差异基因, 其中 55 个上调基因, 46 个下调基因。DEGs 火山图如图 1 所示, 红色表示上调基因, 蓝色表示下调基因; 热图如图 2 所示, 颜色深浅代表 DEG 显著性高低。结果表明 AS 组与正常对照组的 DEGs 有较好的差异性。

3.2. DEGs 富集分析结果

GO 富集分析由生物过程(Biological Process, BP)、细胞组成(Cell Component, CC)、分子功能(Molecular Function, MF)三部分组成, R 软件分析得到: DEGs 主要涉及多生物繁殖过程, 多细胞生物过程, PiRNA 代谢过程, 负性调节肥大细胞参与免疫反应, 细胞通过质膜粘附分子粘附, 髓系白细胞介导免疫的负调控等(如图 3)。KEGG 富集分析表明 DEGs 主要与细胞外基质-受体互作, 蛋白质降解和吸收, 糖胺聚糖生物合成, 其他聚糖降解等有关; 主要涉及 PI3K-Akt 信号通路(如图 4)。

3.3. PPI 网络及枢纽基因分析

将 101 个差异基因通过 Cytoscape 3.9.1 软件构建差异基因靶点蛋白互相作用关系网络(如图 5), 网络图中共有 35 个蛋白节点, 30 条边。使用 CytoHubba 插件筛选得到前 10 个枢纽(Hub)基因, 颜色深浅代表 MCC 值高低, 根据 MCC 值排序依次为: ZIC1、EN1、TBX15、PITX2、PSG3、PSG4、PSG6、CPE、HOXC8、MAP2(如图 6), 其中 ZIC1、HOXC8、CPE、MAP2 属于上调基因, 其余为下调基因。

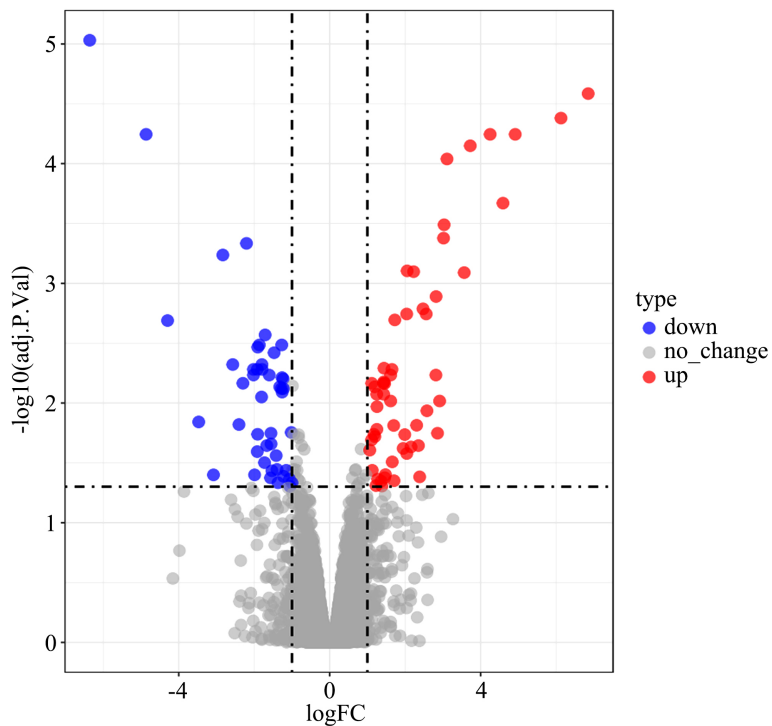


Figure 1. DEGs volcano chart
图 1. DEGs 火山图

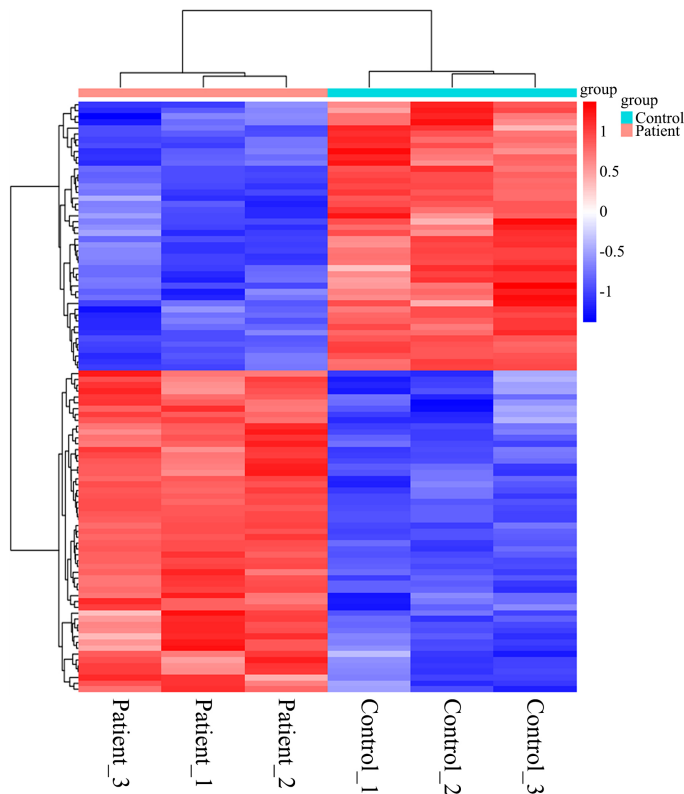


Figure 2. DEGs heat map
图 2. DEGs 热图

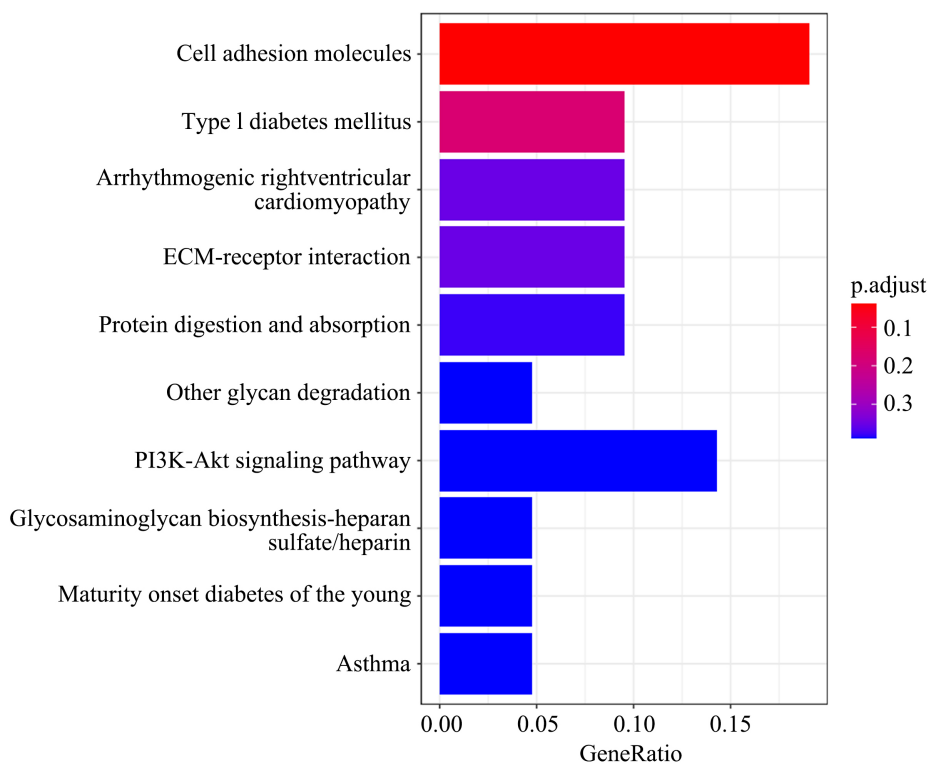


Figure 3. GO enrichment analysis of DEGs
图 3. DEG 的 GO 富集分析

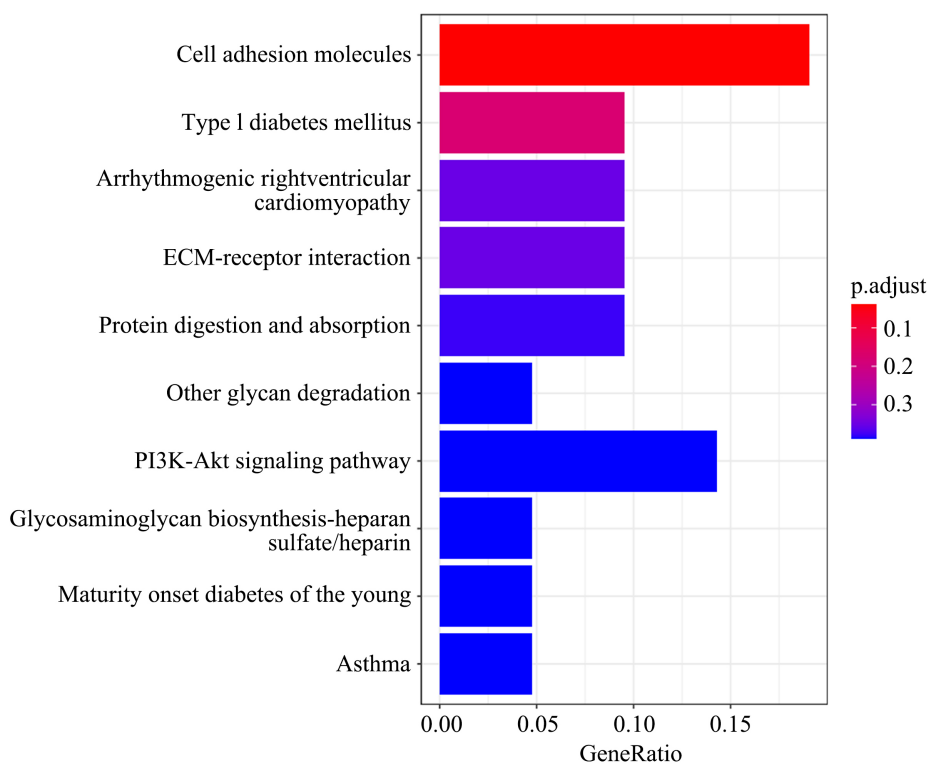


Figure 4. KEGG enrichment analysis of DEGs
图 4. DEG 的 KEGG 富集分析

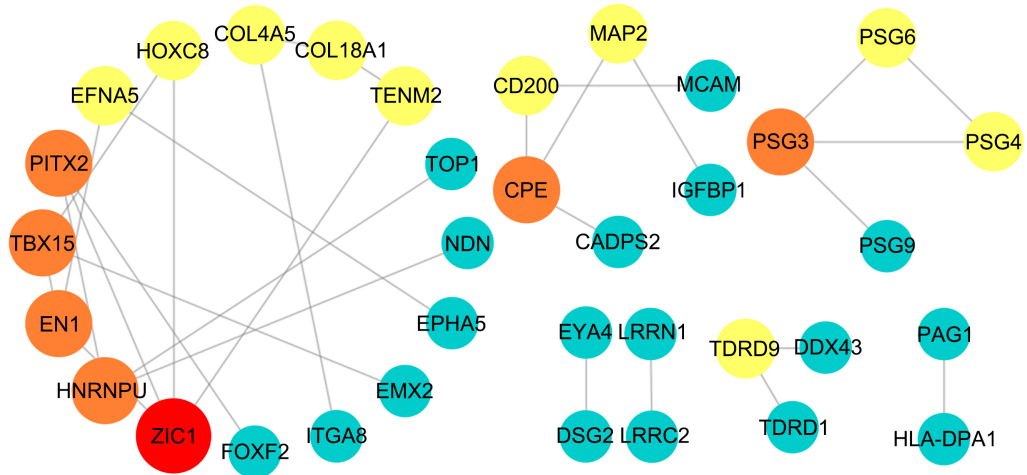


Figure 5. PPI network diagram of DEGs
图 5. DEGs 的 PPI 网络图

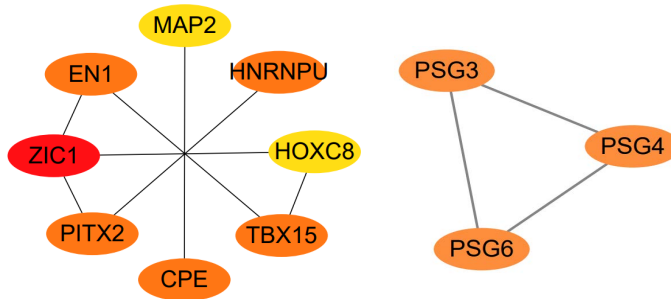


Figure 6. Hub genes in PPI network
图 6. PPI 网络中的 Hub 基因

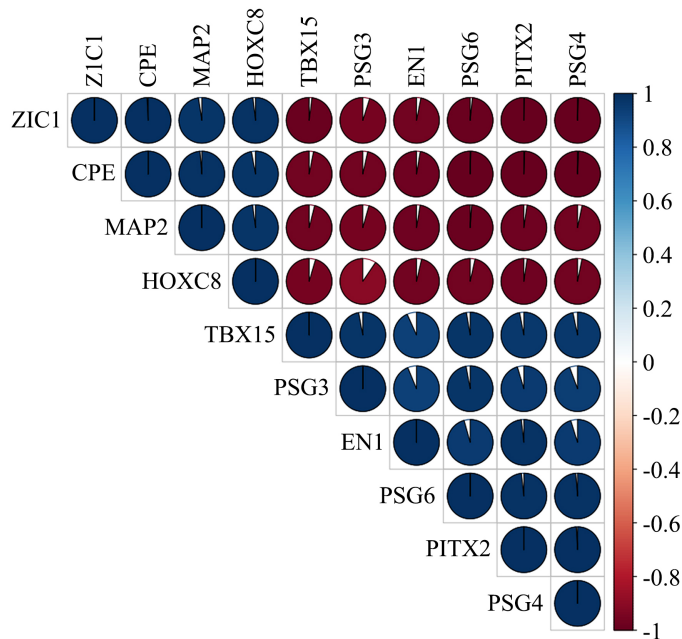


Figure 7. Bitmap of correlation analysis between 10 Hub genes
图 7. 10 个 Hub 基因间的相关性分析位图

3.4. Hub 基因的相关性分析

将 10 个枢纽基因(ZIC1、EN1、TBX15、PITX2、PSG3、PSG4、PSG6、CPE、HOXC8、MAP2)的表达水平进行相关性分析(如图 7), 蓝色和红色分别表示正相关和负相关。饼图面积越大, 相关系数越高。结果表明, 10 个枢纽基因表达之间存在正相关。

4. 讨论

强直性脊柱炎属于中医“痹病”范畴, 中医学认为其为本虚标实之证, 其发病与多种因素有关: 体质遗传、情志因素、饮食习惯、过度劳累等。通常由于肝肾气血不足, 外感风寒湿邪侵袭, 导致气血运行不畅, 经络阻滞, 引起脊柱和关节的炎症和骨质增生[7]。中医治疗方法主要包括药物治疗、针灸、推拿按摩、中药熏蒸等。西医主要使用非甾体抗炎药(NSAIDs)、疏松剂、生物制剂和物理治疗。对于严重的 AS 患者, 可能需要进行手术治疗, 如关节置换术或脊柱手术。间充质干细胞(MSCs)是一类多能干细胞, 可以分化为多种细胞类型, MSCs 在组织工程和再生医学中具有广泛的应用前景。近来已有的研究结果显示 MSCs 具有潜在的治疗 AS 的能力[8], 可能成为一种新的治疗策略。研究表明[9], MSCs 具有抗炎、免疫调节和组织修复的功能, 可以通过多种机制发挥治疗作用。MSCs 具备分泌多种抗炎因子的能力, 包括转化生长因子- β (TGF- β)和干扰素- γ (IFN- γ)等[10], 这些抗炎因子的存在能够有效地抑制炎症反应的发生, 并减少炎症介质的生成[11] [12], 从而减轻 AS 患者炎症症状。并且 MSCs 能够调节免疫系统, 抑制免疫细胞的活化和增殖, 降低免疫反应的强度, 还可以调节免疫细胞的分化和功能, 促进免疫耐受的建立[13]。此外 MSCs 的分化细胞功能可以促进软骨和骨组织的修复和再生, 减轻 AS 患者骨质增生和关节损伤[14]。

本研究基于 GEO 数据库获得 3 名 AS 患者组与 3 名正常对照组的数据信息, 利用生物信息学方法分析 AS 潜在枢纽基因, 通过 R 软件 DEG 分析得到 101 个 DEGs, 其中上调基因 55 个, 下调基因 46 个。然后对 DEGs 进一步进行 GO 和 KEGG 富集分析, GO 分析显示 DEGs 主要涉及多生物繁殖过程, 多细胞生物过程, PiRNA 代谢过程, 负性调节肥大细胞参与免疫反应; 细胞通过质膜粘附分子, 髓系白细胞介导免疫的负调控等。AS 是一种慢性炎症性疾病, 炎症反应导致免疫细胞的聚集和活化, 进而影响多细胞生物过程; PiRNA 在生物体中起着重要的基因调控和基因沉默作用, 通过免疫反应影响 AS 进程; 肥大细胞是免疫系统中的重要细胞类型, 参与调节炎症反应和免疫反应。根据 KEGG 富集分析结果显示, DEGs 与细胞外基质 - 受体相互作用、蛋白质降解和吸收、糖胺聚糖生物合成以及其他聚糖降解等关联密切。此外, DEGs 还主要参与了 PI3K-Akt 信号通路。PI3K-Akt 信号通路在多个细胞功能和生理过程中扮演重要角色, 包括细胞存活、增殖、分化以及炎症反应等。在 AS 中, PI3K-Akt 信号通路异常激活与疾病的发生和发展密切相关。研究发现[15], AS 患者的免疫细胞中 PI3K-Akt 信号通路活性增强, 导致炎症反应的过度激活。这主要表现为炎症介质的产生增加、炎细胞浸润和炎症因子释放。这些炎症反应导致关节和脊柱的炎症和损伤, 并促进关节的骨质增生。另外, PI3K-Akt 信号通路也参与了关节软骨的代谢调控和炎症因子的产生。研究表明[16], 在 AS 患者的关节软骨细胞中, PI3K-Akt 通路的激活导致关节软骨的退化和损伤。这些变化促进了骨质增生和关节破坏的发生。

为了进一步分析差异基因在 AS 发病机制中的作用, 通过构建 PPI 网络, 筛选 Hub 基因, 并对它们的表达水平进行相关性分析。筛选得到 ZIC1、EN1、TBX15、PITX2、PSG3、PSG4、PSG6、CPE、HOXC8、MAP2 等 Hub 基因, 其中 ZIC1、EN1、TBX15、PITX2、PSG3 的 MMC 值最高; CPE 与 ZIC1 的相关性最高, EN1、TBX15、PITX2 和 PSG4 相关性次之, 提示这些 Hub 基因可能在 AS 致病过程中发挥主要或协同作用。ZIC1 (Zinc finger protein of the cerebellum 1)是一个编码转录因子, 属于 ZIC 家族, 在胚胎发育

和成年后的细胞功能调控中发挥重要作用, 通过调控基因组的转录, 影响细胞生长过程[17]。ZIC1 在多个组织和器官中表达, 包括大脑、小脑、眼睛、心脏和脊柱骨骼等。ZIC1 在脊柱的节段化和分节发育中起到关键作用, 它调控脊柱的前后轴向模式和分节模式的形成, 影响椎骨的数量、大小和形态, ZIC1 的突变或缺失与脊柱裂、脊柱侧弯和脊柱畸形等疾病有关, 同时 ZIC1 可以促进 MSCs 成骨细胞的分化, 并参与骨骼发育和骨再生过程[18]。ZIC1 与 AS 关系密切, 研究表明[19], AS 患者的外周血和关节组织中 ZIC1 的表达水平显著升高, 这表明 ZIC1 的高表达与 AS 的发生和炎症反应的激活相关, 其可能通过调控炎症反应和骨骼代谢来影响疾病。

EN1 (engrailed homeobox 1) 是一种转录因子, 主要在脊髓和小脑中表达, 可以促进 MSCs 向神经细胞的分化, 并参与神经系统的发育和再生[20]。研究表明, EN1 在脊柱的节段化和分节发育中起到关键作用, 它调控椎骨的形成和分化, 影响脊柱的数量、大小和形态。EN1 的突变或异常表达与脊柱畸形和脊柱相关疾病的发生和发展有关。EN1 的过表达可以促进炎症因子的产生和炎症反应的加剧。这些炎症反应导致关节和脊柱的炎症和损伤, 并最终导致 AS 的发展[21]。此外, EN1 也参与了骨骼发育和骨质代谢的调控, 研究发现, EN1 可以调控骨细胞的增殖和分化, 影响骨骼的形成和骨质的稳态。在 AS 中, EN1 的异常表达可能导致骨质增生和骨质破坏的不平衡, 进一步加剧关节的病变[22]。TBX15 (T-box 15), PITX2 (Pituitary homeobox 2) 可维持细胞功能和组织稳态。二者共同参与调控基因的转录和表达, 影响细胞生长, 同时参与免疫调节、脊髓发育等生理过程[23]。炎症反应和免疫系统的异常活化是 AS 的主要特征, TBX15、PITX2 可能通过调节相关基因的表达来影响炎症反应、免疫调节和骨骼重塑等途径参与 AS 的病理过程。此外, 它们在 MSCs 的软骨和脂肪分化中起到关键作用。研究表明[24], TBX15 可以促进 MSCs 向软骨细胞和脂肪细胞的分化, 并参与软骨和脂肪组织的发育和修复。

CPE (Carboxypeptidase E) 是一种内质网膜蛋白, 其在调节炎症因子和神经肽的合成和处理过程中发挥作用[25]。目前尚无直接证据表明 CPE 与 ZIC1 的相关性, 推测 ZIC1 可能通过调控 CPE 的转录活性来影响 CPE 的表达水平, 进而影响神经肽的合成加工, 调节神经细胞的增殖、分化和迁移等过程, 而这些过程可能与 AS 的发展有关。炎症反应在 AS 的发生中起到重要的作用, CPE 和 ZIC1 均可调控炎症因子, 可共同通过影响炎症反应和骨骼代谢等途径间接参与 AS 的发生和发展。PITX2 和 PSG4、EN1 和 TBX15 尚无直接证据表明其关联性, 但根据它们的特点, 猜测其也可能通过影响免疫调节和炎症反应等途径间接参与 AS 的发生和发展。此外, ZIC1、EN1 和 TBX15 在 MSCs 的分化和功能调控中均发挥重要作用[26], 这些转录因子可以调控 MSCs 的分化能力和分化方向, 影响它们分化成特定细胞类型的能力。

综上所述, DEGs 和 Hub 基因可能在 AS 的发生发展中发挥着重要作用, 主要与炎症反应, 骨骼代谢, 软骨细胞增殖分化等相关。但本研究存在一定局限性, 仍处于早期生物信息数据分析阶段, 它们与疾病的关联性还缺乏直接的研究证据, 尚需进一步的基础研究和临床试验来明确其作用机制。

参考文献

- [1] 隋聪, 卜海富. 强直性脊柱炎发病机制与治疗的研究进展[J]. 临床骨科杂志, 2010, 13(2): 217-220.
- [2] 谭希, 徐永跃, 邱冬妮, 等. 强直性脊柱炎动物模型归类及其机制研究与进展[J]. 中国组织工程研究, 2017, 21(11): 1783-1789.
- [3] 李毓, 张强. 抗核抗体检测受试者核谱及核型特征分析[J]. 蚌埠医学院学报, 2022, 47(9): 1254-1258.
- [4] 齐坤, 刘云, 唐滔, 等. 1,25(OH)₂D₃ 通过调节 Th17/Treg 比值和 RANKL/OPG 轴缓解胶原诱导的关节炎[J]. 陆军军医大学学报, 2023, 45(15): 1656-1665.
- [5] 纵何香. R10K3 调控强直性脊柱炎成骨相关通路及骨髓间充质干细胞分化的潜在作用研究[D]: [博士学位论文]. 合肥: 安徽医科大学, 2023.
- [6] 梁朝鑫, 周安远, 王伟, 等. 骨髓间充质干细胞治疗骨科疾病研究进展[J]. 陕西医学杂志, 2022, 51(1): 121-124, 129.

- [7] 王嘉璐, 陈洪波. 益肾蠲痹丸联合理筋手法治疗强直性脊柱炎的病例报告及体会[J]. 湖北中医杂志, 2022, 44(8): 47-49.
- [8] Abdolmohammadi, K., Pakdel, F.D., Aghaei, H., *et al.* (2019) Ankylosing Spondylitis and Mesenchymal Stromal/Stem Cell Therapy: A New Therapeutic Approach. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, **109**, 1196-1205. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.10.137>
- [9] Zeng, L., Yu, G., Yang, K., *et al.* (2022) Efficacy and Safety of Mesenchymal Stem Cell Transplantation in the Treatment of Autoimmune Diseases (Rheumatoid Arthritis, Systemic Lupus Erythematosus, Inflammatory Bowel Disease, Multiple Sclerosis, and Ankylosing Spondylitis): A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trial. *Stem Cells International*, **2022**, Article 9463314. <https://doi.org/10.1155/2022/9463314>
- [10] 孔旭辉, 黄梁焘. 间充质干细胞调节炎症反应的研究进展[J]. 中华细胞与干细胞杂志(电子版), 2017, 7(6): 374-377.
- [11] 梁大飞. MsPGN 大鼠外周血 Th17、Treg 与炎症因子演变特征及 PB-MSCs 干预研究[D]: [硕士学位论文]. 遵义: 遵义医科大学, 2023.
- [12] 燕春州. 大鼠骨髓间充质干细胞对 LPS 诱导的 BV2 细胞炎症反应的作用及机制研究[D]: [硕士学位论文]. 济宁: 济宁医学院, 2023.
- [13] Shandil, R.K., Dhup, S. and Narayanan, S. (2022) Evaluation of the Therapeutic Potential of Mesenchymal Stem Cells (MSCs) in Preclinical Models of Autoimmune Diseases. *Stem Cells International*, **2022**, Article 6379161. <https://doi.org/10.1155/2022/6379161>
- [14] Layh-Schmitt, G., Lu, S., Navid, F., *et al.* (2017) Generation and Differentiation of Induced Pluripotent Stem Cells Reveal Ankylosing Spondylitis Risk Gene Expression in Bone Progenitors. *Clinical Rheumatology*, **36**, 143-154. <https://doi.org/10.1007/s10067-016-3469-5>
- [15] Fang, Y., Liu, J., Long, Y., *et al.* (2022) Knockdown of Circular RNA Hsa_Circ_0003307 Inhibits Synovial Inflammation in Ankylosing Spondylitis by Regulating the PI3K/AKT Pathway. *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, **31**, 781-788. <https://doi.org/10.17219/acem/146830>
- [16] Liu, Z., Min, S., Lu, X., *et al.* (2022) [Hyperactivation of PI3K/AKT/mTOR Signal Pathway Impairs TNF- α -Induced Autophagy in Mesenchymal Stem Cells from Patients with Ankylosing Spondylitis]. *Journal of Southern Medical University*, **42**, 272-277.
- [17] Aruga, J. and Millen, K.J. (2018) ZIC1 Function in Normal Cerebellar Development and Human Developmental Pathology. In: Aruga, J., Eds., *Zic Family*, Springer, Singapore, 249-268. https://doi.org/10.1007/978-981-10-7311-3_13
- [18] Datta, H.K., Kringen, M.K., Tuck, S.P., *et al.* (2022) Mechanical-Stress-Related Epigenetic Regulation of ZIC1 Transcription Factor in the Etiology of Postmenopausal Osteoporosis. *International Journal of Molecular Sciences*, **23**, Article 2957. <https://doi.org/10.3390/ijms23062957>
- [19] Kalogeropoulos, M., Varanasi, S.S., Olstad, O.K., *et al.* (2010) Zic1 Transcription Factor in Bone: Neural Developmental Protein Regulates Mechanotransduction in Osteocytes. *The FASEB Journal*, **24**, 2893-2903. <https://doi.org/10.1096/fj.09-148908>
- [20] Alves, D.S.M. and Smidt, M.P. (2011) En1 and Wnt Signaling in Midbrain Dopaminergic Neuronal Development. *Neural Development*, **6**, Article No. 23. <https://doi.org/10.1186/1749-8104-6-23>
- [21] Eymard, F., Pigenet, A., Rose, C., *et al.* (2019) Contribution of Adipocyte Precursors in the Phenotypic Specificity of Intra-Articular Adipose Tissues in Knee Osteoarthritis Patients. *Arthritis Research & Therapy*, **21**, Article No. 252. <https://doi.org/10.1186/s13075-019-2058-9>
- [22] Zheng, H.F., Forgetta, V., Hsu, Y.H., *et al.* (2015) Whole-Genome Sequencing Identifies EN1 as a Determinant of Bone Density and Fracture. *Nature*, **526**, 112-117. <https://doi.org/10.1038/nature14878>
- [23] Hilton, T., Gross, M.K. and Kioussi, C. (2010) Pitx2-Dependent Occupancy by Histone Deacetylases Is Associated with T-Box Gene Regulation in Mammalian Abdominal Tissue. *Journal of Biological Chemistry*, **285**, 11129-11142. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.087429>
- [24] Hashem, B.M., Hosseinpour, S.V., Maqbool, M., *et al.* (2022) Directional Capacity of Human Mesenchymal Stem Cells to Support Hematopoietic Stem Cell Proliferation *in vitro*. *Gene*, **820**, Article ID: 146218. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2022.146218>
- [25] Fricker, L.D. (2018) Carboxypeptidase E and the Identification of Novel Neuropeptides as Potential Therapeutic Targets. *Advances in Pharmacology*, **82**, 85-102. <https://doi.org/10.1016/bs.apha.2017.09.001>
- [26] Montzka, K., Lassonczyk, N., Tschöke, B., *et al.* (2009) Neural Differentiation Potential of Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells: Misleading Marker Gene Expression. *BMC Neuroscience*, **10**, Article No. 16. <https://doi.org/10.1186/1471-2202-10-16>