

## 基础研究

DOI:10.13406/j.cnki.cxyb.003345

# 转录组测序结合TMT蛋白质组学技术对脊髓损伤小鼠关键基因预测及相关病理机制研究

杨祝歆<sup>1</sup>, 唐成林<sup>1</sup>, 赵鸿娣<sup>2</sup>, 李明娇<sup>1</sup>, 王嘉培<sup>1</sup>, 黄思琴<sup>1</sup>

(1. 重庆医科大学中医药学院, 重庆 400016; 2. 赤峰学院附属医院中医科, 赤峰 025550)

**【摘要】**目的:通过转录组测序(RNA sequencing, RNA-Seq)和TMT蛋白质组学技术,筛选差异表达的基因及蛋白,探讨脊髓损伤后复杂的病理机制。方法:50只雌性C57BL/6小鼠随机分为假手术组、模型组,每组25只。采用钳夹法在腰1处制备小鼠脊髓损伤模型,14 d后进行取材。采用后肢运动功能评分(basso mouse scale, BMS)评估小鼠后肢运动功能变化;HE染色法观察脊髓损伤区病理形态学变化;RNA-Seq技术筛选差异基因;TMT蛋白组学分析筛选差异蛋白;结合2种测序技术筛选变化趋势吻合的mRNA和蛋白并进行生物信息学分析。结果:与假手术组相比,模型组中BMS评分明显降低( $P<0.05$ );HE染色显示脊髓损伤区域结构疏松紊乱,出现空洞,细胞核固缩,炎性浸润严重,神经元坏死;RNA-Seq共筛选出565个差异mRNA,其中545个上调,20个下调,TMT蛋白组学共筛选出339个差异蛋白,其中278个上调,61个下调;2种测序的聚类热图显示2组样本的表达模式差异大;韦恩图分析获得83个趋势上调的mRNA或蛋白;蛋白互作(protein-protein interaction, PPI)网络分析获得11个核心靶点;GO富集分析显示分子功能或生物过程主要在免疫应答、溶酶体途径、细菌反应、液泡裂解等方面;KEGG富集通路主要在结核病变、溶酶体、吞噬小体途径等通路。结论:本研究筛选出的11个mRNA或蛋白可能是调控脊髓损伤病理过程的核心靶点,病理机制可能与免疫应答途径、溶酶体和吞噬小体等通路密切相关。

**【关键词】**脊髓损伤;转录组测序;TMT蛋白组学;核心靶点;病理机制

【中图分类号】R651.2

【文献标志码】A

【收稿日期】2023-03-01

## Prediction of key genes and study of related pathological mechanisms in mice with spinal cord injury by RNA sequencing combined with TMT proteomics technology

Yang Zhuxin<sup>1</sup>, Tang Chenglin<sup>1</sup>, Zhao Hongdi<sup>2</sup>, Li Mingjiao<sup>1</sup>, Wang Jiabei<sup>1</sup>, Huang Siqin<sup>1</sup>

(1. College of Traditional Chinese Medicine, Chongqing Medical University;

2. Department of Traditional Chinese Medicine, Affiliated Hospital of Chifeng University)

**【Abstract】****Objective:** To screen for differentially expressed genes and proteins by RNA sequencing (RNA-Seq) and tandem mass tag (TMT) proteomics analysis, and to explore the complex pathological mechanism of spinal cord injury (SCI). **Methods:** Fifty female C57BL/6 mice were equally randomized into two groups: sham group and model group. The SCI model was established by compressing the 1st lumbar vertebra with an aneurysm clip, and spinal cord tissues were harvested 14 days later. The hindlimb locomotor function was assessed by basso mouse scale (BMS); pathomorphological changes of the injured area of the spinal cord were determined by hematoxylin-eosin (HE) staining; RNA-Seq was used to screen for differentially expressed genes, and TMT proteomics analysis was used to screen for differentially expressed proteins. The two sequencing techniques were combined to screen for the messenger RNAs

(mRNAs) and proteins with consistent change trends and perform bioinformatics analysis. **Results:** Compared with the sham group, the model group had significantly decreased BMS scores ( $P<0.05$ ). HE staining showed loose and disordered structure, cavitation, karyopyknosis, serious inflammatory infiltration, and neuronal necrosis in the injured area of the spinal cord. A total of 565 differentially expressed mRNAs (including 545 up-regulated mRNAs and 20 down-regulated mRNAs) were screened out by RNA-Seq, and 339 differentially expressed proteins (including 278 up-regulated

作者介绍:杨祝歆,Email:645146201@qq.com,

研究方向:脊髓损伤的电针疗法及机制。

通信作者:黄思琴,Email:huangsinqin@cqmu.edu.cn。

基金项目:国家青年科学基金资助项目(编号:81403466);重庆市科委资助项目(编号:cstc2017jcyjAX0363);重庆市基础研究与前沿探索资助项目(编号:cstc2018jcyjAX0036);2020年重庆市科委卫计委资助项目(编号:2021ZY023890);2021年重庆市科技局资助项目(编号:cstc2021jcyj-msxmX0203)。

优先出版:<https://link.cnki.net/urlid/50.1046.R.20231008.1532.008>  
(2023-10-10)

proteins and 61 down-regulated proteins) were screened out by TMT proteomics analysis. The cluster heat maps of the two sequencing methods showed that the expression patterns of the two groups of samples were very different. A total of 83 up-regulated mRNAs or proteins were obtained by the Venn diagram. Eleven core targets were obtained by the protein-protein interaction network analysis. Gene ontology enrichment analysis showed that molecular functions or biological processes were mainly found in immune response, lysosome pathway, bacterial reaction, and vacuole lysis. Kyoto encyclopedia of genes and genomes analysis showed that enrichment pathways were mainly tuberculosis, lysosome, and phagosome pathways. **Conclusion:** In this study, the 11 mRNAs or proteins identified may be core targets for regulating the pathological process of SCI, and the pathological mechanism may be closely related to immune response, lysosome, and phagosome pathways.

**[Key words]** spinal cord injury; RNA sequencing; tandem mass tag proteomics analysis; core target; pathological mechanism

脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)是具有复杂发病机制的中枢神经系统疾病,会造成患者感觉、运动及括约肌功能障碍,是致残率和死亡率极高的神经损伤<sup>[1]</sup>。SCI分为外力导致的原发性机械损伤,以及随后由于微循环障碍、神经炎症、组织缺氧、轴突变性、神经元坏死和凋亡等导致的继发性损伤<sup>[2-3]</sup>,SCI病理过程分为急性期、亚急性期和慢性期,其中亚急性期大概7~14 d,是神经细胞死亡及各种炎症反应的高峰期<sup>[4]</sup>。错综复杂的病理过程使SCI的治疗和康复成为医学领域的重大难题之一,也成为神经科学领域研究的热点与重点。寻找SCI病理过程中关键的分子变化有助于提高药物设计的特异性,对SCI的靶向治疗和神经修复尤为重要。

近些年,转录组学和蛋白组学的发展为疾病病理机制研究和治疗靶点的发现提供了新的路径。在一个有机生物体中,基因表达的主要过程为DNA转录生成mRNA,然后再翻译合成蛋白质<sup>[5]</sup>,所以转录组和蛋白组是关系非常紧密且处于上下游的2个组学。要了解具体的基因表达调控过程,就要对mRNA和蛋白进行关联分析,这属于多组学联合的研究<sup>[6]</sup>。由于脊髓损伤潜在的病理机制错综复杂,因此本研究通过建立小鼠脊髓损伤亚急性期模型,采用转录组测序(RNA sequencing, RNA-Seq)和TMT定量蛋白质组学2种技术,深入挖掘脊髓损伤后关键的差异表达分子及相关病理机制,通过蛋白互作(protein-protein interaction, PPI)网络分析筛选SCI的关键靶标,有助于为脊髓损伤的治疗提供新的方向。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物及分组

健康清洁级雌性C57BL/6小鼠50只,体质量18~20 g,由

重庆医科大学实验动物中心提供,生产许可证号:SYXK(渝)2022-0016,代养于重庆医科大学实验动物中心SPF级动物房。适应性喂养1周后,将动物随机分为假手术组、模型组,每组25只。假手术组:仅行第一腰椎(L<sub>1</sub>)椎板切除术,不损伤脊髓;模型组:采用钳夹法制备SCI小鼠模型,称重后用1%戊巴比妥钠(0.08 mL/10 g)腹腔注射麻醉,躯体俯卧位固定,使用弯剪钝性剥离脊柱后正中线肌肉,暴露出棘突、椎板和横突,行L<sub>1</sub>椎板切除术,充分暴露L<sub>1</sub>对应的脊髓,采用血管夹钳夹该段脊髓15 s,造成该段脊髓不完全性损伤。伤口处敷青霉素溶液30 s后逐层缝合,等待苏醒后,若小鼠双后肢瘫痪,大小便失禁,尾巴瘫软即为造模成功。本研究符合重庆医科大学实验动物伦理委员会所制定的伦理学标准。

### 1.2 实验材料

4%多聚甲醛购自重庆瀚非生物科技有限公司;TRIzol购自上海Invitrogen;Fragmentation Buffer购自上海起发试剂有限公司;Oligo(dT)磁珠购自上海华雅思创生物科技有限公司;BCA蛋白定量试剂盒购自赛默飞世尔科技公司;TMT试剂购自赛默飞世尔科技公司;TCEP还原剂购自赛默飞世尔科技公司;TEAB试剂购自赛默飞世尔科技公司;3.7 cm弯全齿血管夹购自上海艾德医疗器械有限公司;切片机购自德国Leica;Illumina NovaSeq6000基因测序仪购自上海美吉生物医药科技有限公司;Q Exactive质谱仪购自上海美吉生物医药科技有限公司。

### 1.3 组织采集

各组造模后14 d进行小鼠脊髓样本采集,具体操作步骤如下:①称重后1%戊巴比妥钠对SCI小鼠(0.08 mL/10 g)腹腔注射麻醉;②小鼠四肢固定于取材板上,仰卧位固定,用镊子夹起肌肉层,再逐步扩大切口区域,直到视野内充分暴露心、肝、肺脏和主动脉;③弯头止血钳固定心脏,寻找主动脉区,将连接灌注器的无菌输液针头尖刺入小鼠心尖,随后进入主动脉,剪开右心耳后立刻开启灌注器,推动PBS缓冲液进入心脏以致全身循环,待肝脏颜色变淡偏灰白色时,立刻换用多聚甲醛固定液进行灌注,小鼠将出现四肢、尾巴抽搐,最终造成内脏和全身僵硬;④灌注结束后,解剖小鼠损伤段的脊柱,在冰上快速完整剥离该段脊髓,放入标注好的冻存

管后,立马将其转移至液氮罐存放1夜,再保存于-80℃冰箱;⑤取材结束后,动物尸体必须用专用塑料袋包装暂存于冷冻冰柜中(填写并粘贴动物尸体标签),定期会由持有动物尸体和废弃物处置许可证的机构运走,及时进行无害化处理,废弃注射器及其他污物等倒入黄色医疗垃圾桶。

#### 1.4 BMS 评分

后肢运动功能评分(basso mouse scale, BMS)<sup>[7]</sup>:于造模前1天和造模后第1、第14天对小鼠后肢运动功能进行评分。观察小鼠后肢踝关节活动度、协调性、脚爪姿态、躯干稳定性和尾巴姿态。评分为0~9分,评分越低运动功能障碍越重。评分由2名熟悉评分标准但非本课题组人员独立进行,每只小鼠观察5 min,取两者平均数作为被测小鼠的最终得分。

#### 1.5 HE 染色

造模后第14天,每组各取1只小鼠,1%戊巴比妥钠(0.08 mL/10 g)腹腔注射麻醉,0.01 mol/L PBS和4%多聚甲醛经左心室快速灌注固定,取下损伤脊髓(距损伤中心0.5 cm),4%多聚甲醛固定12 h,常规脱水,石蜡包埋,连续横向切片,厚度为6 μm,室温保存。检测时,取一半切片脱蜡、水化后,行常规HE染色,光镜下观察脊髓组织完整性及局部细胞浸染程度。

#### 1.6 转录组测序及分析

造模前提前了解测序的取样要求,每个样本至少200 mg,而每只小鼠脊髓组织大约60 mg,因此需要4只小鼠的脊髓组织量组合成一个样本,每组至少3个样本满足统计学要求,综上每组12只小鼠。造模后第14天,每组各取12只小鼠(4只/样本,3个样本/组)的脊髓(距损伤中心0.5 cm),液氮速冻1 h后于-80℃环境内保存用于检测。随后样本送至上海美吉生物医药科技有限公司进行检测,先用TRIzol(Invitrogen)法提取各组脊髓组织总RNA,利用带有Oligo(dT)的磁珠与ployA进行A-T碱基配对,可以从总RNA中分离出mRNA,需要加入片段化缓冲液将其断裂成小片段,在逆转录酶的作用下,再反转合成一链cDNA,随后进行二链合成形成稳定的双链结构,对这些cDNA进行纯化、黏性末端修复,并进行PCR扩增,最后利用Illumina NovaSeq6000基因测序仪进行上机测序。为了保证后续生物信息分析的准确性,首先对原始测序数据进行过滤,最终得到高质量的测序数据。使用软件HiSat2将质控后的原始数据与参考基因组比对,进而使用软件RSEM分别对基因和转录本的表达水平进行定量分析。获得基因的读取计数后,运用DESeq2软件对多样本(>2)项目进行样本间基因的表达差异分析,鉴定出样本间差异表达的基因(筛选条件为校正 $P<0.05$ 且 $|\log_2\text{FC}|>1$ ),进而研究差异表达基因的功能。将获取的差异基因对比到GO(<http://www.geneontology.org/>)数据库,利用软件Goatools进行GO注释分析;将获取的差异基因对比到KEGG(<http://www.genome.jp/kegg/>)数据库,利用软件KOBAS将进行

KEGG PATHWAY富集分析。

#### 1.7 TMT 定量蛋白质组学及分析

TMT由美国Thermo公司研发的多肽体外标记定量技术,采用16种同位素标签,通过特异性标记多肽的氨基酸基团,一次上机可实现16个样本中蛋白质的相对定量。造模后第14天,同上每组各取12只小鼠(4只/样本,3个样本/组)的脊髓(距损伤中心0.5 cm),液氮速冻1 h后于-80℃环境内保存用于检测。随后样本送至上海美吉生物医药科技有限公司进行检测。首先使用BCA试剂盒配制BCA工作液和不同质量浓度的标准蛋白质溶液,提取蛋白;再取蛋白样品100 μg,用裂解液补充体积到90 μL,加入终浓度10 mmol/L TCEP还原剂进行还原烷基化;再用50 mmol/L TEAB充分溶解样品进行酶解过夜;再取出TMT试剂进行TMT标记与混样;然后采用反相液相一维色谱法(reverse-phase liquid chromatography, RPLC),用UPLC上样缓冲液复溶多肽样品,用反相C18柱进行高pH液相分离多肽混合物;第二维采用纳升级液相色谱串联质谱技术(Q Exactive质谱仪)进行分析;对质谱下机的原始文件在数据库([www.uniprot.org](http://www.uniprot.org))进行蛋白搜索,通过R语言计算筛选出明显差异表达蛋白并分析(筛选条件: $P<0.05$ 且上调蛋白 $\text{FC}>1.2$ 且下调蛋白 $\text{FC}<0.83$ )。选择GO数据库对所有的差异蛋白进行功能聚类分析,采用KEGG通路数据库对差异蛋白涉及的代谢通路进行分析。

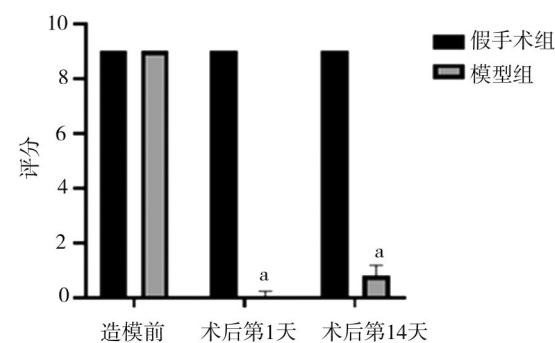
#### 1.8 统计学方法

采用GraphPad Prism 8.0统计分析软件对数据进行统计学处理。数据的表达方式采用均数±标准差( $\bar{x}\pm s$ )形式表达,组间比较采用单因素方差分析,测序及蛋白组学采用Bonferroni多重检验校正方法。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

## 2 结 果

#### 2.1 各组小鼠BMS评分比较

造模前,假手术组和模型组小鼠BMS评分差异无统计学意义( $P>0.05$ );造模后第1天,与假手术组比较,模型组小鼠BMS评分明显下降( $P<0.05$ );造模后第14天,与假手术组比较,模型组小鼠BMS评分明显下降( $P<0.05$ )(图1)。

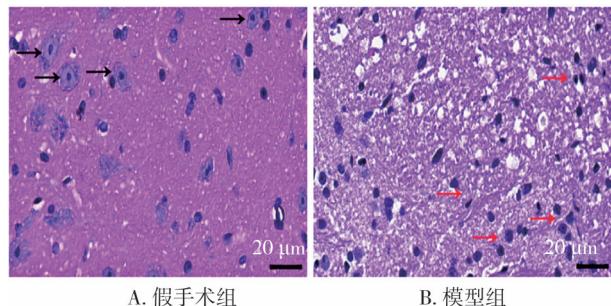


注:a,与同时间点假手术组相比, $P<0.05$

图1 各组小鼠造模前后BMS评分比较( $n=8, \bar{x}\pm s$ )

## 2.2 各组小鼠脊髓损伤区域病理形态学比较

造模 14 d 后,假手术组小鼠脊髓组织结构致密,神经元形态正常,胞质丰富(图 2A);与假手术组相比,模型组小鼠脊髓损伤区域神经纤维空泡变,结构疏松紊乱,小胶质细胞浸润,神经元数量减少(图 2B)。



注:正常神经元如黑色箭头所示,炎性浸润如红色箭头所示

图 2 各组小鼠脊髓组织 HE 染色比较

## 2.3 聚类热图

根据基因及蛋白在不同样本的表达量信息绘制出聚类热图,可以直观地呈现各样本间的多基因或多蛋白的表达量变化和聚类关系。结果表明,转录组测序中,假手术组、模型组之间样本存在明显的分离,颜色变化大,说明这 2 组的样本基因的表达模式和相关性差异大,但组内的样本不存在较远分离,说明组内的各样本基因的表达模式较接近(图 3A);同理蛋白组学分析中,假手术组、模型组之间样本同样存在明显的分离,颜色变化大,说明这 2 组的样本蛋白的表达模式差异大,但组内的样本不存在较远分离,说明组内的各样

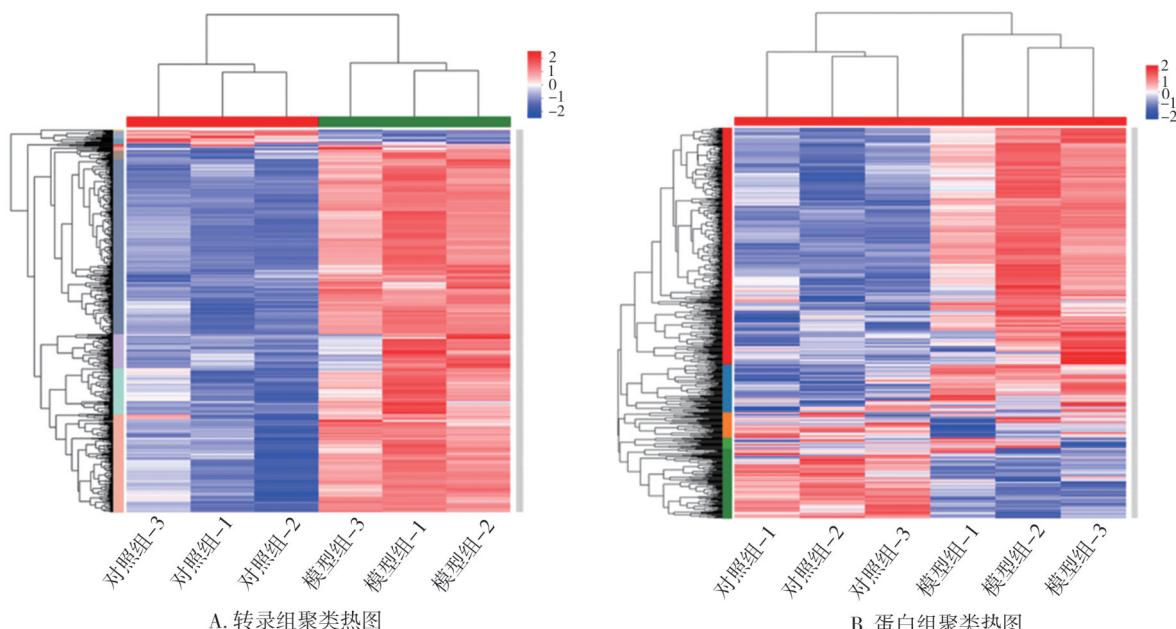
本蛋白的表达模式相近(图 3B)。

## 2.4 火山图

火山图将筛选的基因或蛋白映射到图中便能可视化,蓝点为下调的基因或蛋白,红点为上调的基因或蛋白。转录组测序中使用 DESeq2 软件对假手术组、模型组进行分析,默认  $P < 0.05$  且  $|\log_2 \text{FC}| \geq 1$  的筛选条件获得组间差异表达的基因。在假手术组 vs. 模型组的差异基因中,共筛选出 565 个差异基因(即 mRNA),其中 545 个上调,20 个下调(图 4A)。蛋白组学分析中使用 R 软件包对假手术组、模型组进行分析,默认  $P < 0.05$  且上调蛋白  $\text{FC} > 1.2$  且下调蛋白  $\text{FC} < 0.83$  的筛选条件获得组间差异表达的蛋白。在假手术组 vs. 模型组的差异蛋白中,共筛选出 339 个差异蛋白,其中 278 个上调,61 个下调(图 4B)。

## 2.5 韦恩图

利用美吉生信云分析平台将转录组与蛋白组的数据进行关联分析,只得到 83 个在 2 种测序里都差异表达且都上调的基因与蛋白,并未发现共表达且下调的基因与蛋白,以上可以通过韦恩图(图 5)展示出来,将脊髓损伤后下调的基因集(含 20 个 mRNA)与脊髓损伤后下调的蛋白集(含 61 个蛋白)进行合并,结果未得到交集(图 5A);同理将脊髓损伤后上调的基因集(含 545 个 mRNA)与脊髓损伤后上调的蛋白集(含 278 个蛋白)进行合并,结果得到含有 83 个共表达的 mRNA 或蛋白的交集,表明这 83 个基因或蛋白在 2 种测序结果里都表现脊髓损伤后上调,更倾向病理性的研究指标(图 5B)。



注:图中每列表示 1 个样本,每行表示 1 个基因或 1 个蛋白,下侧为样本名称,图中的颜色越红基因或蛋白表达量越高,颜色越蓝表达量越低

图 3 各组样本 mRNA、蛋白的聚类热图

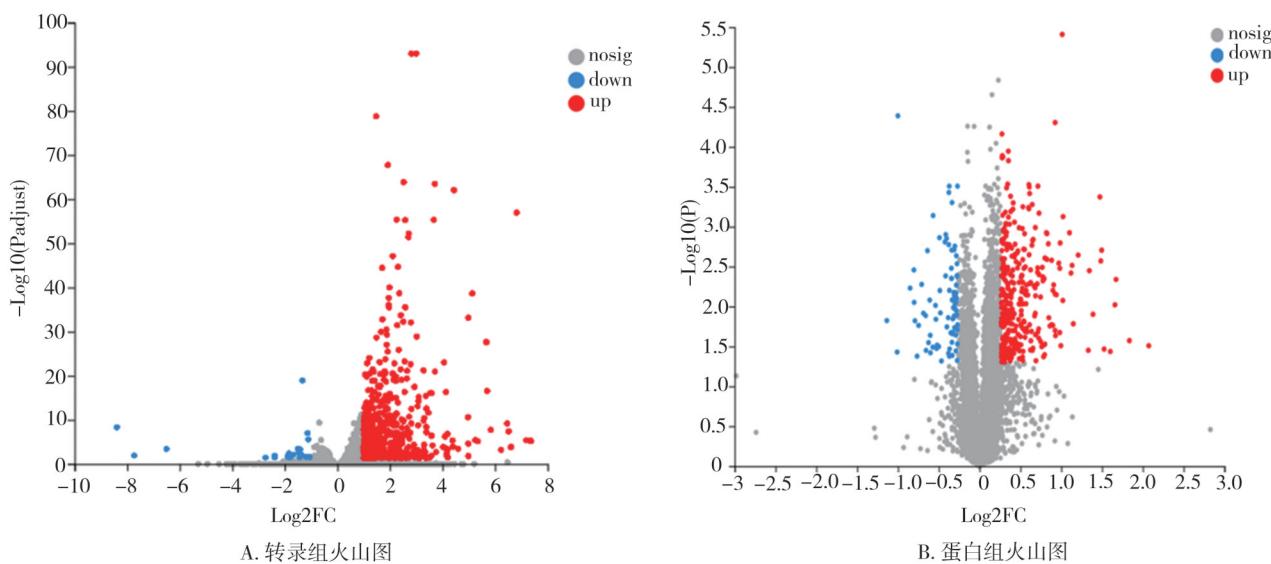
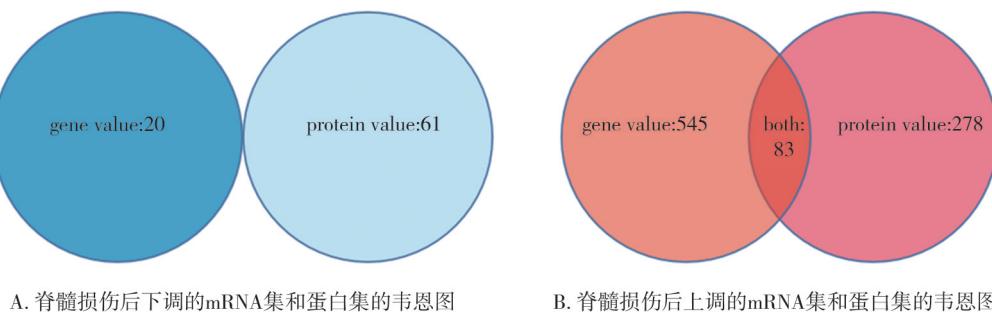


图4 差异 mRNA 及差异蛋白的火山图



注:不同颜色的圆圈代表不同的集,数值代表不同集间共有和特有的基因或蛋白数目

图5 韦恩图

## 2.6 PPI 网络分析

将关联分析获得的 83 个基因或蛋白可视化到 PPI 网络图中,挖掘出重要蛋白间相互作用关系,结果显示网络连接度前 11 位的蛋白 Itgb2、Ptprc、Aif1、Ctss、C1qa、C1qb、Fce1g、Myo1f、Lyz2、Plek、Hcls1 都集中在网络核心密集的区域,它们之间不仅具有相互作用关系,而且涉及有关联的蛋白数目较多,可能是调控脊髓损伤病理阶段的关键靶点,因此研究意义更大(图 6)。

## 2.7 核心基因蛋白信息

PPI 网络分析发现 Itgb2、Ptprc、Aif1、Ctss、C1qa、C1qb、Fce1g、Myo1f、Lyz2、Plek、Hcls1 这 11 个基因或蛋白处于核心网络位置,并将基本信息总结到表 1,具体研究见讨论部分。

## 2.8 GO 富集分析

将关联分析筛选出的 83 个基因或蛋白进行 GO 富集分析。结果发现,富集差异基因或差异蛋白数目较多且差异明

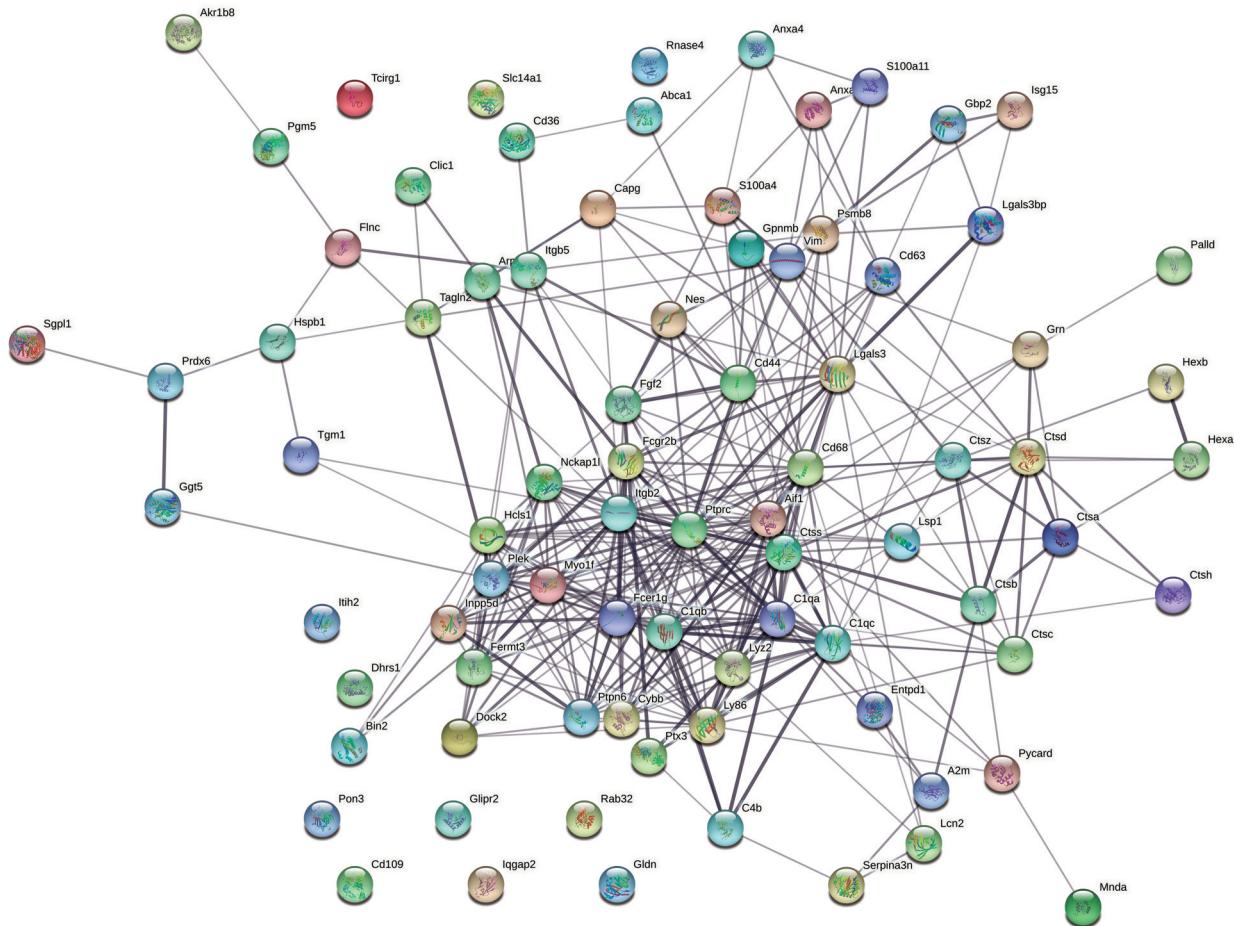
显性越明显的分子功能或生物学过程主要在免疫应答、溶酶体途径、细菌反应等方面(图 7)。

## 2.9 KEGG 富集分析

将关联分析筛选出的 83 个基因或蛋白进行 KEGG 富集分析。结果显示,富集差异基因或差异蛋白数目较多且差异越明显的通路主要在结核病变、溶酶体途径、吞噬小体等通路(图 8)。

## 3 讨 论

SCI 的病理机制是多种因素共同作用的结果,各种因素相互关联,共同放大,最终导致神经细胞坏死及运动功能障碍<sup>[8]</sup>。因此通过研究脊髓损伤的病理生理改变,不仅可以提高诊断准确率,还能发现潜在的恢复机制。本研究采用 BMS 评分评估小鼠后肢的运动功能,HE 染色法观察脊髓损伤区的



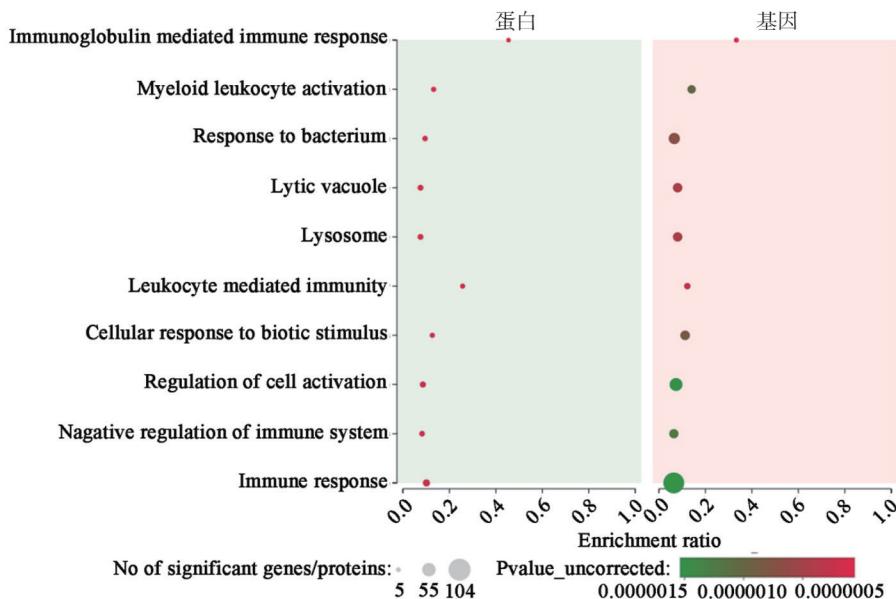
注:彩色“玻璃球”(节点)之间的连线表示蛋白具有相互作用关系,线的粗细、疏密度表示相互作用的数据支持度,即将 string 数据库中认证过或验证过的实验数据进行整合,得到最终得分,分数越高,线越粗越密集

图 6 PPI 网络分析

表 1 核心基因蛋白信息

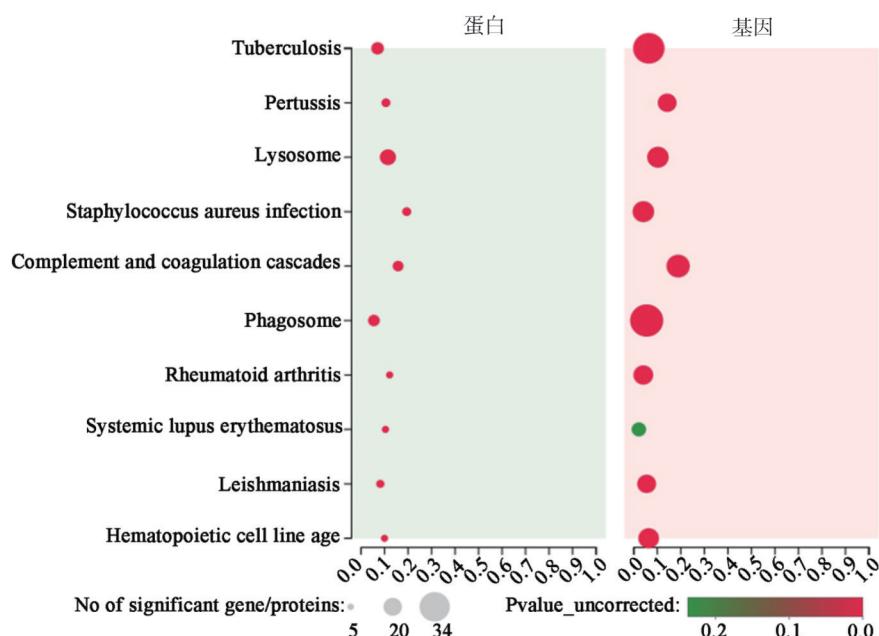
基因名称	蛋白名称	蛋白/基因 ID	蛋白 FC	基因 $\log_2$ FC	明显性差异	研究领域
Aif1	同种异体移植炎症因子 1	ENSMUSP00000134214 ENSMUSG00000024397	1.489 728	1.919 970 470	是	小胶质细胞, 神经系统疾病
C1qa	补体成分 1q 子成分 A	ENSMUSP00000048836 ENSMUSG00000036887	1.565 672	2.587 031 806	是	补体 C1q, 自身免疫疾病
C1qb	补体成分 1q 子成分 B	ENSMUSP00000040246 ENSMUSG00000036905	1.551 910	2.307 493 983	是	补体 C1q, 神经疼痛, 肿瘤
Ctss	组织蛋白酶 S	ENSMUSP00000015667 ENSMUSG00000038642	1.570 141	2.255 268 550	是	肿瘤, 炎性反应, 溶酶体
Fcer1g	免疫球蛋白 E 的 Fc 组分高亲和性 I 受体 $\gamma$ 肽	ENSMUSP00000078875 ENSMUSG00000058715	1.831 387	2.108 998 056	是	免疫应答, 肿瘤
Hcls1	造血系细胞特异蛋白 1	ENSMUSP00000023531 ENSMUSG00000022831	1.705 072	1.403 720 109	是	肿瘤
Itgb2	整合素 $\beta$ 2	ENSMUSP00000000299 ENSMUSG0000000290	1.409 705	2.002 522 183	是	肿瘤, 免疫调节
Lyz2	溶菌酶样 2	ENSMUSP00000089801 ENSMUSG00000069516	1.322 791	3.290 847 206	是	溶酶菌
Myo1f	肌球蛋白 1f	ENSMUSP00000084887 ENSMUSG00000024300	1.673 541	1.822 330 932	是	调节中性粒细胞
Plek	血小板-白细胞 C 激酶底物	ENSMUSP00000099945 ENSMUSG00000020120	1.736 240	1.663 261 641	是	肿瘤
Ptprc	蛋白酪氨酸磷酸酶 C 型受体	ENSMUSP00000138350 ENSMUSG00000026395	1.693 658	1.389 950 938	是	PTP 家族进展

注:蛋白组学一般默认取 FC(2 组间表达量的差异倍数)数值比较;转录组学一般默认取  $\log_2$ FC 数值比较;明显性差异 yes 表示在 2 种测序里都具有统计学意义



注:蛋白绿色区域为蛋白组GO富集分析结果,基因红色区域为转录组GO富集分析结果。图中的每一个气泡代表1个GO二级分类。气泡的大小与此GO二级分类富集到的蛋白或基因数目成正比。气泡的不同颜色代表P值,颜色越红表示明显差异越大,右下侧颜色梯度表示P值大小

图7 GO富集分析



注:蛋白绿色区域为蛋白组KEGG富集分析结果,基因红色区域为转录组KEGG富集分析结果。图中的每一个气泡代表1个通路。气泡的大小与此通路富集到的蛋白或基因数目成正比。气泡的不同颜色代表P值,颜色越红表示差异越大,右下侧颜色梯度表示P值大小

图8 KEGG通路富集分析

病理改变,结果显示SCI小鼠损伤部位出现神经纤维空泡变、组织水肿、结构疏松、小胶质细胞浸润、神经元数量减少,引起严重运动功能障碍。

目前,虽然开展了广泛的工作来研究SCI的病理生理学过程,但仍然缺乏对潜在分子和作用途径

的全面了解。由于资源和技术的限制,既往SCI研究通常集中在相关文献中寻找研究指标。本研究将假手术组、模型组对应的小鼠脊髓组织进行RNA-Seq和TMT定量蛋白质组学分析,结合2种技术鉴定及筛选出差异表达的mRNA和蛋白,进一步

分析相关的分子功能及通路,可以更深入地了解 SCI 的病理过程。

首先通过聚类热图,发现无论是转录组还是蛋白组,假手术组与模型组之间样本都存在明显的分离,说明这 2 组样本的基因或蛋白表达模式差异大。然后通过火山图发现脊髓损伤后 90% 以上的 mRNA 呈上调趋势,80% 以上的蛋白也呈上调趋势,于是重点挑选出上调的 mRNA 集和蛋白集取交集,利用美吉生信云分析平台进行关联分析,最终得到 83 个共表达 mRNA 或蛋白,表示这 83 个 mRNA 或蛋白在 2 种测序结果里都是脊髓损伤后上调。由于 83 个差异基因的数量较多,于是采用网络建模的方法,将这 83 个基因或蛋白可视化到 PPI 网络图中,通过网络连接度发现 Itgb2、Ptprc、Aif1、Ctss、C1qa、C1qb、Fc1g、Myo1f、Lyz2、Plek、Hcls1 处于核心网络位置,因此这 11 个基因或蛋白可能是调控 SCI 病理阶段的关键靶点,研究意义较大。

根据以上筛选的 Itgb2、Ptprc、Aif1、Ctss、C1qa、C1qb、Fc1g、Myo1f、Lyz2、Plek、Hcls1,结合文献检索发现它们大多与信号转导、免疫功能等相关,其中 C1qa、C1qb 在 SCI 中有大量研究,其余 9 个核心基因在 SCI 中研究极少,因此对其功能进行研究也许能发现更多与 SCI 发病有关的分子,若后期进行一系列的验证,便能为临床研发靶向治疗 SCI 的药物提供新选择和新方向。

Itgb2 称为整合素  $\beta 2$ ,是整合素的一类亚基,而整合素是一种跨膜糖蛋白,可以识别配体并调控细胞的运动、增殖和凋亡,参与许多病理反应过程,如炎症、恶性肿瘤的生长浸润和转移等<sup>[9-10]</sup>。其中 Itgb2 具有促炎性,在细胞黏附炎症反应中具有重要作用,介导并加强白细胞向活化的内皮细胞黏附,进一步促进白细胞穿过内皮细胞层迁移入病理组织内,诱导炎性反应发生<sup>[11]</sup>。本研究发现 Itgb2 在小鼠脊髓损伤中差异表达,表明 Itgb2 可能通过调控白细胞的黏附运动来诱导 SCI 炎性反应发生。

Ptprc 属于 PTPs 家族成员,在真核细胞中可以参与磷酸化水平调节和信号转导<sup>[12]</sup>。在自身免疫性疾病研究中发现 Ptprc 蛋白具有调节 CD4 $^{+}$ 和 CD8 $^{+}$ 自身反应性 T 细胞的重要作用<sup>[13-14]</sup>,根据本研究 Ptprc

上调的结果,推测 Ptprc 可能通过调控 T 细胞功能来影响 SCI 疾病的免疫过程。

Aif1 称为同种异体移植炎症因子-1,被认为是调节各种免疫反应的关键因子<sup>[15]</sup>。研究发现当巨噬细胞中 AIF-1 过表达时,可刺激分泌特定的促炎细胞因子如白细胞介素(interleukin, IL)-6、IL-10 和 IL-12 等,说明 AIF-1 在免疫炎症反应中能发挥重要作用<sup>[16]</sup>。本研究还发现 Aif1 在小鼠脊髓损伤后上调,表明该指标经后期验证后有望成为临床诊断 SCI 后神经炎性反应的特异性生物标记物。

Ctss 是组织蛋白酶 S,与炎症因子相互作用,在自身免疫性疾病过程中发挥重要作用<sup>[17]</sup>。有研究显示 Ctss 抑制剂通过抑制小胶质细胞的活化来减轻类风湿关节炎大鼠的机械性超敏反应,可作为治疗类风湿关节炎疼痛的潜在药物<sup>[18]</sup>。本研究发现 Ctss 在 SCI 后上调,推测 Ctss 也许与脊髓损伤后的神经病理性疼痛密切相关。

C1qa、C1qb 分别是补体成分 1q 子成分 A 和补体成分 1q 子成分 B,它们都属于补体系统的起始分子,是补体级联反应的启动者<sup>[19]</sup>。随着对神经免疫学的深入认识,越来越多研究证实补体系统在 SCI 的发生发展中扮演重要角色<sup>[20]</sup>,补体表达含量的增加是 SCI 后重要的病理现象<sup>[21]</sup>。但最近研究又表明,补体系统在 SCI 后介导干细胞增殖分化<sup>[22]</sup>、维护神经元结构<sup>[23]</sup>等方面也扮演重要角色。综上所述,干预补体系统能为 SCI 的治疗带来新希望。

Myo1f 属于长尾 I 类肌球蛋白的一种,主要在免疫系统中表达,可以对中性粒细胞的黏附和运动进行调节,特别在急性炎症期间 Myo1f 便是中性粒细胞在 3D 环境中迁移的特异性必需物质<sup>[24]</sup>。本研究显示 SCI 后 Myo1f 上调,表明 Myo1f 也可能通过调节中性粒细胞的转运来调控脊髓损伤后的免疫反应。

Lyz2 称为溶菌酶样 2,属于溶菌酶的一种,具有杀菌免疫功能,是生物体内重要的非特异性免疫因子<sup>[25]</sup>。Smedowski A 等<sup>[26]</sup>在真菌性角膜炎研究中发现:角膜炎症细胞的浸润平均密度是细菌性感染的 2 倍,溶菌酶可抑制高迁移率族蛋白 1 的产生,减少内皮细胞中的 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  等炎性因子的释放,表

明溶菌酶在真菌感染时可控制产生过强的炎症反应。因此,本研究中 *Lyz2* 的上调可能是为了缓解脊髓损伤后强烈的应激反应。

*Fce1g*(免疫球蛋白 E 的 Fc 组分高亲和性 I 受体  $\gamma$  肽)、*Plek*(血小板-白细胞 C 激酶底物)、*Hcls1*(造血系细胞特异蛋白 1)这 3 种基因或蛋白主要在肿瘤发生发展和转移过程中起调控作用,在其他领域研究极少,而本研究显示它们在脊髓损伤后有差异表达,表明 *Fce1g*、*Plek*、*Hcls1* 可能参与了脊髓损伤后的病理过程,但相关的功能需要后期挖掘与验证,才可为预测 SCI 的新靶点提供新的理论依据。

上述结果显示 SCI 的病理阶段及治疗过程非常复杂,除了多靶点的调控,还需要多途径、多环节的调控,因此本研究将关联分析获得的 83 个 mRNA 和蛋白进行 GO 富集分析和 KEGG 富集通路分析。GO 富集分析显示富集程度较高的分子功能及生物学过程主要在免疫应答、溶酶体途径、细菌反应等方面。结合 PPI 网络图分析发现枢纽基因大部分也与免疫应答功能相关。研究显示脊髓损伤后的继发性病变会引发一系列细胞和分子事件,包括小胶质细胞/星形胶质细胞激活、巨噬细胞介导的自噬-溶酶体调控以及各种免疫细胞因子的产生,如白细胞介素、肿瘤坏死因子、免疫球蛋白、溶菌酶等<sup>[27]</sup>,均与以上 GO 富集的免疫应答、溶酶体途径、细菌反应相关,表明炎性免疫反应的放大严重阻碍了 SCI 的修复,因此改善 SCI 后的免疫环境是治疗 SCI 最紧迫和重要的目标。除此之外,KEGG 富集通路分析显示富集程度较大的通路主要在结核病变、溶酶体、吞噬小体途径等通路。结核病变通路可能与结核性脊髓炎密切相关,结核性脊髓炎是由结核杆菌经血液循环到达脊柱部位直接浸润而形成的脊髓炎,是中枢神经系统比较少见的类型,这种情况大多有结核接触史或者结核病史,通常需要进行正规的抗结核治疗,选用抗结核病药物即可<sup>[28]</sup>。而溶酶体和吞噬小体途径的通路可以相结合进行分析,因为吞噬小体在免疫过程中能与溶酶体相融合形成吞噬溶酶体,发挥其吞噬功能<sup>[29]</sup>。巨噬细胞又是吞噬细胞的一种,在病原体入侵机体时表现出强大的吞噬能力,与溶酶体相融合,吞噬组织碎片、凋亡细胞和

抗原-抗体免疫复合物,在特异性免疫应答的诱导与调节中起关键作用<sup>[30]</sup>。脊髓损伤后巨噬细胞极化和组织修复是一个动态连续的过程,分别表现出 M1 促炎型和 M2 抗炎型,极化后的巨噬细胞具有强大的吞噬能力,可以吞噬 SCI 后的细胞碎片及病原微生物,或释放炎症介质并启动适应性免疫应答功能<sup>[31]</sup>。因此脊髓损伤后,调节巨噬细胞的不同极化状态或所处微环境,都能为今后脊髓损伤的修复提供新的方向,然而通路中具体的分子机制还有待进一步挖掘与验证。

综上所述,通过 RNS-Seq 和 TMT 蛋白质组学技术进行差异表达分析和 PPI 网络构建,预测出了 11 个 SCI 病理阶段的核心调控点。除此之外,GO 和 KEGG 富集分析发现 SCI 与免疫应答途径、溶酶体和吞噬小体通路密切相关,都能为 SCI 的发病机制及治疗药物的研发提供新见解,尚有更深层次的问题需要进一步验证并探讨。

## 参 考 文 献

- [1] Lee BB, Cripps RA, Fitzharris M, et al. The global map for traumatic spinal cord injury epidemiology: update 2011, global incidence rate[J]. Spinal Cord, 2014, 52(2):110-116.
- [2] Oyinbo CA. Secondary injury mechanisms in traumatic spinal cord injury: a nugget of this multiply cascade[J]. Acta Neurobiol Exp, 2011, 71(2):281-299.
- [3] Li C, Wu ZR, Zhou LQ, et al. Temporal and spatial cellular and molecular pathological alterations with single-cell resolution in the adult spinal cord after injury[J]. Signal Transduct Target Ther, 2022, 7(1):65.
- [4] Adegeest CY, van Gent JAN, Stolwijk-Swüste JM, et al. Influence of severity and level of injury on the occurrence of complications during the subacute and chronic stage of traumatic spinal cord injury: a systematic review[J]. J Neurosurg Spine, 2021, 36(4):632-652.
- [5] 郑邦璉. 基础分子生物学[M]. 北京:高等教育出版社, 2007.
- [6] Marshall JL, Peshkin BN, Yoshino T, et al. The essentials of multiomics[J]. Oncologist, 2022, 27(4):272-284.
- [7] Basso DM, Fisher LC, Anderson AJ, et al. Basso Mouse Scale for locomotion detects differences in recovery after spinal cord injury in five common mouse strains[J]. J Neurotrauma, 2006, 23(5):635-659.
- [8] Anjum A, Yazid MD, Fauzi Daud M, et al. Spinal cord injury:

- pathophysiology, multimolecular interactions, and underlying recovery mechanisms[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(20):7533.
- [9] Slack RJ, MacDonald SJF, Roper JA, et al. Emerging therapeutic opportunities for integrin inhibitors[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2022, 21(1):60–78.
- [10] Huang RX, Rofstad EK. Integrins as therapeutic targets in the organ-specific metastasis of human malignant melanoma[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2018, 37(1):1–14.
- [11] Sun ZQ, Costell M, Fässler R. Integrin activation by talin, kindlin and mechanical forces[J]. *Nat Cell Biol*, 2019, 21(1):25–31.
- [12] 刘志坚, 艾世超, 管文贤. 蛋白酪氨酸磷酸酶调控机制的研究进展[J]. 生命科学, 2017, 29(11):1119–1125.
- Liu ZJ, Ai SC, Guan WX. Advance in regulatory mechanism research of protein tyrosine phosphatases[J]. *Chin Bull Life Sci*, 2017, 29(11):1119–1125.
- [13] Courtney AH, Shvets AA, Lu W, et al. CD45 functions as a signaling gatekeeper in T cells[J]. *Sci Signal*, 2019, 12(604):eaaw8151.
- [14] 蔡安季. 强直性脊柱炎患者外周血单个核细胞蛋白组和小 RNA 关联性研究[D]. 重庆: 重庆医科大学, 2013.
- Cai AJ. Study on the correlation between proteome and small RNA of peripheral blood mononuclear cells in patients with ankylosing spondylitis [D]. Chongqing: Chongqing Medical University, 2013.
- [15] Kishikawa S, Sato S, Kaneto S, et al. Allograft inflammatory factor 1 is a regulator of transcytosis in M cells[J]. *Nat Commun*, 2017, 8:14509.
- [16] Sikora M, Kopeć B, Piotrowska K, et al. Role of allograft inflammatory factor-1 in pathogenesis of diseases[J]. *Immunol Lett*, 2020, 218:1–4.
- [17] 王林燕, 王博, 戴灵豪, 等. 组织蛋白酶 S 的研究进展[J]. 浙江医学, 2017, 39(6):488–492.
- Wang LY, Wang B, Dai LH, et al. Research progress of cathepsin S[J]. *Zhejiang Med J*, 2017, 39(6):488–492.
- [18] Weitoff T, Larsson A, Manivel VA, et al. Cathepsin S and cathepsin L in serum and synovial fluid in rheumatoid arthritis with and without autoantibodies[J]. *Rheumatology (Oxford)*, 2015, 54(10):1923–1928.
- [19] Ziabska K, Ziemka-Nalecz M, Pawelec P, et al. Aberrant complement system activation in neurological disorders[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(9):4675.
- [20] Roselli F, Karasu E, Volpe C, et al. Medusa's head: the complement system in traumatic brain and spinal cord injury[J]. *J Neurotrauma*, 2018, 35(2):226–240.
- [21] Carpanini SM, Torvell M, Morgan BP. Therapeutic inhibition of the complement system in diseases of the central nervous system[J]. *Front Immunol*, 2019, 10:362.
- [22] Hooshmand MJ, Nguyen HX, Piltti KM, et al. Neutrophils induce astroglial differentiation and migration of human neural stem cells via C1q and C3a synthesis[J]. *J Immunol*, 2017, 199(3):1069–1085.
- [23] Peterson SL, Nguyen HX, Mendez OA, et al. Complement protein C1q modulates neurite outgrowth *in vitro* and spinal cord axon regeneration *in vivo*[J]. *J Neurosci*, 2015, 35(10):4332–4349.
- [24] Salvermoser M, Pick R, Weckbach LT, et al. Myosin 1f is specifically required for neutrophil migration in 3D environments during acute inflammation[J]. *Blood*, 2018, 131(17):1887–1898.
- [25] 赵荣文, 谭丽萍, 刘同军. 溶菌酶及其应用研究进展[J]. 齐鲁工业大学学报, 2021, 35(1):12–18.
- Zhao RW, Tan LP, Liu TJ. Research progress of lysozyme and its application[J]. *J Qilu Univ Technol*, 2021, 35(1):12–18.
- [26] Smedowski A, Tarnawska D, Orski M, et al. Cytoarchitecture of epithelial inflammatory infiltration indicates the aetiology of infectious keratitis[J]. *Acta Ophthalmol*, 2017, 95(4):405–413.
- [27] Zhang Y, Al Mamun A, Yuan Y, et al. Acute spinal cord injury: Pathophysiology and pharmacological intervention (review)[J]. *Mol Med Rep*, 2021, 23(6):417.
- [28] Salvador GLO, Basso ACN, Barbieri PP, et al. Central nervous system and spinal cord tuberculosis: revisiting an important disease[J]. *Clin Imaging*, 2021, 69:158–168.
- [29] Sprenkeler EGG, Gresnigt M, Veerdonk F. LC3-associated phagocytosis: a crucial mechanism for antifungal host defence against *Aspergillus fumigatus*[J]. *Cell Microbiol*, 2016, 18:1208–1216.
- [30] Wong CO, Gregory S, Hu HX, et al. Lysosomal degradation is required for sustained phagocytosis of bacteria by macrophages[J]. *Cell Host Microbe*, 2017, 21(6):719–730.
- [31] 徐保平, 姚敏, 王晓涛, 等. 巨噬细胞极化在脊髓损伤中的作用机制[J]. 中国骨伤, 2018, 31(1):88–92.
- Xu BP, Yao M, Wang XT, et al. Mechanism of macrophage polarization on spinal cord injury[J]. *China J Orthop Traumatol*, 2018, 31(1):88–92.

(责任编辑:冉明会)