

生物信息分析

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.002455

大鼠脊髓损伤后差异表达基因的筛选与分析

武作龙,任恩惠,邓亚军,解琪琪,张广智,袁文华,张海鸿

(兰州大学第二医院骨科、甘肃省骨关节疾病研究重点实验室,兰州 730000)

【摘要】目的:通过对大鼠脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)相关基因芯片进行生物信息学分析,为阐明继发性 SCI 的分子机制提供新思路。**方法:**首先从 GEO 数据库下载大鼠 SCI 的 mRNA 表达谱数据集 GSE464 和 GSE45006,利用 R 语言 limma 包筛选损伤和正常脊髓的差异表达基因(differential expression genes, DEGs)并取交集。然后进行 GO、KEGG 及 GSEA 分析。随后使用 STRING 在线工具和 Cytoscape 软件构建蛋白-蛋白互作(protein-protein interaction, PPI)网络并将其进行可视化,利用 cytoHubba 插件选择 hub 基因。最后使用 GOSemSim 包预测 hub 基因编码蛋白间的相互作用。**结果:**共筛选出 226 个 DEGs。功能注释及通路富集分析显示,DEGs 主要涉及细胞对炎症的反应、离子的调节、再生及修复等生物学过程(biological process, BP);主要参与突触前膜、轴突末端、神经元投射终点站等细胞组分(cellular component, CC);介导 ATP 磷酸化、细胞骨架的结构组成、与钙依赖蛋白结合等分子功能(molecular function, MF)。富集的通路主要有 TNF、AGE-RAGE、NF- κ B 和 Toll 样受体等信号通路。共获得 10 个 hub 基因,分别为 *Tubb5*、*Prkcd*、*Anxa2*、*Gns*、*Fabp5*、*Ctsc*、*Lyz2*、*Gusb*、*Vat1* 和 *Grn*,并且与 SCI 密切相关,其中 *Prkcd*、*Ctsc*、*Vat1*、*Gns* 和 *Lyz2* 基因在 SCI 中缺乏相关研究,值得进一步研究。**结论:**本研究鉴定了可能参与继发性 SCI 的 hub 基因和信号通路,为继发性 SCI 的分子机制提供了新的理论依据。

【关键词】脊髓损伤;差异表达基因;生物信息学分析**【中图分类号】**R745.4**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2019-12-17

Screening and analyzing differentially expressed genes in rats after spinal cord injury

Wu Zuolong, Ren Enhui, Deng Yajun, Xie Qiqi, Zhang Guangzhi, Yuan Wenhua, Zhang Haihong

(Department of Orthopaedics, The Second Hospital of Lanzhou University,

Key Laboratory of Bone and Joint Disease Research)

【Abstract】Objective: To perform a bioinformatics analysis of the gene chip associated with spinal cord injury (SCI) in rats, so as to provide new ideas for clarifying the molecular mechanism of secondary SCI. **Methods:** Firstly, data sets GSE464 and GSE45006 of rat SCI mRNA expression profile were downloaded from the GEO database. The R language limma package was used to screen differential expression genes (DEGs) of injured and normal spinal cord and obtain the intersection. Then GO, KEGG and GSEA analyses were performed. Subsequently, the STRING online tool and Cytoscape software were used to construct and visualize a protein-protein interaction (PPI) network, and the cytoHubba plug-in was used to select the hub gene. Finally, the GOSemSim package was used to predict interactions between proteins encoded by the hub gene. **Results:** A total of 226 DEGs were screened. Functional annotation and pathway enrichment analysis showed that DEGs were mainly involved in biological processes (BP), which contained response of cells to inflammation, regulation of ions, regeneration and repair; mainly participated in the main cellular components (CC) including presynaptic membrane, axonal ends and neuron projection endpoints; mediated the molecular function (MF): ATP phosphorylation, structural composition of the cytoskeleton, and binding to calcium-dependent proteins. Enriched pathways were mainly TNF, AGE-RAGE, NF- κ B and Toll-like receptors. A total of 10 hub genes were obtained, namely *Tubb5*, *Prkcd*, *Anxa2*, *Gns*, *Fabp5*, *Ctsc*, *Lyz2*, *Gusb*, *Vat1*, and *Grn*, and were closely related with SCI. Among them, *Prkcd*, *Ctsc*, *Vat1*, *Gns* and *Lyz2* genes in SCI lacked studies,

and were worthy of further study. **Conclusion:** This study identifies hub genes and signaling pathways that may be involved in secondary SCI, and provides a new theoretical basis for the molecular mechanism of secondary SCI.**【Key words】**spinal cord injury; differentially expressed genes; bioinformatics analysis

作者介绍:武作龙, Email: wuzl18@lzu.edu.cn,

研究方向:脊柱脊髓损伤。

通信作者:张海鸿, Email: zhanghaihong1968@sina.com。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:31960175);甘肃省自然科学基金青年科技基金资助项目(编号:18JR3RA331)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20200420.1732.016.html>

(2020-04-21)

脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)是脊柱损伤最严重的并发症之一,也是导致机体致死致残的主要原因^[1]。据统计,每年我国约有 6 万多新发病例。北美地区有 100 万人受其影响,每位患者为此需花费 110 万~460 万美元^[2]。这不仅损害了患者的身心健康,也给家庭和社会带来沉重的经济负担。目前研究认为,SCI 是一种由机械等因素引发的继发性级联损伤过程,包括神经元细胞死亡、氧化应激和炎症反应等改变^[3]。然而 SCI 后继发级联损伤的确切分子机制仍不完全清楚,临床上也缺乏有效的干预措施。近些年,越来越多的证据表明,多种基因的异常参与了 SCI 的发生发展过程^[4-5]。然而,对于这些异常表达基因的相互作用以及在损伤反应中发挥的分子机制知之甚少。因此,充分认识这些异常表达基因,有望为揭示继发性 SCI 的分子机制提供新的见解。

生物信息学是一门生物学与信息学交叉的新型学科,现已广泛应用于基因筛查、疾病诊断和靶点预测等方面^[6]。这有助于识别参与 SCI 后生理病理变化的关键基因和功能信号通路,并有望找到阻断 SCI 后引起的继发性损伤的有效靶点。本研究从基因表达谱数据库(gene expression omnibus, GEO)获取大鼠 SCI 后的差异表达基因(differentially expressed genes, DEGs),并进行一系列的生物信息学分析,筛选参与 SCI 发展过程的相关基因和信号通路,为进一步阐明 SCI 后生理病理变化的分子机制提供新的依据。

1 材料及方法

1.1 原始数据下载

使用 R 语言 GEOquery 包^[7]从 GEO(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)^[8]数据库下载样本来源可靠、物种为大鼠的 SCI 表达谱数据集 GSE464 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gds/?term=GSE464>)和 GSE45006 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gds/?term=GSE45006>),其中 GSE464 数据集测序平台为 GPL85 [Rat230_2] Affymetrix Rat Genome U34 Array,包括对照组样本 19 个,SCI 样本 70 个;GSE45006 数据集测序平台为 GPL1355 [Rat230_2] Affymetrix Rat Genome 230 2.0 Array,包含 4 个对照样本和 20 个 SCI 样本。2 个数据集共有 23 个对照样本和 90 个 SCI 样本。

1.2 数据预处理及 DEGs 的筛选

使用 affy 包^[9]对 GSE464 和 GSE45006 数据集中的原始数据进行质量控制、背景化校正及标准化预处理。然后通过 limma 包^[10]筛选 DEGs,DEGs 的截取值为 $P < 0.05$ 且 $|\log_2(\text{fold change})| > 0.6$ 。然后用 ggplot2 软件包^[11]绘制火山图;最后使

用 VennDiagram 包^[12]将 2 个数据集获得的 DEGs 取交集以降低假阳性率并以韦恩图进行可视化分析。

1.3 GO、KEGG 分析与 GSEA 分析

使用 R 语言 clusterProfiler 包^[13]对 DEGs 进行 GO 功能注释和京都基因和基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)通路富集分析,以明确这些基因参与的生物学功能。显著性基因富集的临界值为 $q < 0.05$ 。与 GO 和 KEGG 分析相比,基因集富集分析(gene set enrichment analysis, GSEA)^[14]检测的是基因集合而不是单个基因的表达变化,因此相比于传统的 GO 和 KEGG 富集分析保留了更多信息。本研究选择 c2.cp.kegg.v6.0.symbols.gmt 作为参考基因集对 GSE464 和 GSE45006 原始表达矩阵进行 GSEA 分析,显著相关基因定义为 $P < 0.05$ 。采用 R 软件进行统计分析和图形绘制。

1.4 PPI 网络和 hub 基因

通过 Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes (STRING, <http://string-db.org>; version: 11.0)在线数据库^[15]构建蛋白-蛋白互作(protein-protein interaction, PPI)网络, Cytocape (version 3.6.1)软件^[16]将 PPI 网络进行可视化,并通过 cytoHubba 插件^[17]寻找 hub 基因, hub 定义为得分前 10 的 DEGs。

1.5 基因互作关系紧密度分析

为了揭示 hub 基因在 SCI 后发挥相似的生物学过程,本研究使用 GO 注释来计算基因间的相似性。使用 GOSemSim 包^[18]和 clusterProfiler 包^[13]计算 hub 基因分子功能(molecular function, MF)和细胞组分(cellular component, CC)的相似性来定义 hub 基因的相似程度,并使用 ggplot2 包^[11]进行可视化处理。

2 结果

2.1 DEGs 的筛选结果

GSE464 和 GSE45006 数据集校正前后结果以主成分(principal component analysis, PCA)三维聚类图展示(图 1)。结果表明经过标准化处理后,样本间 DEGs 一致性较高,数据集质量可靠,可用于做后续的生物信息学分析。从 GSE464 数据集共得到 309 个 DEGs(图 2A), GSE45006 数据集得到 2 387 个 DEGs(图 2B), 2 个数据集重叠部分共有 226 个 DEGs(图 2C)。

2.2 GO 和 KEGG 通路富集分析

对共表达的 DEGs 进行 GO 分析发现,这些基因的 BP 有细胞对炎症的反应、离子的调节、再生及修复等方面(图 3A);参与的 CC 有突触前膜、轴突末端及神经元投射终点站等(图 3B);涉及的 MF 有 ATP 磷酸化、细胞骨架的结构组成、与钙依赖蛋白结合及离子跨膜转运等方面(图 3C)。KEGG 通路富集分析发现,这些 DEGs 主要参与肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)信号通路、低氧诱导因子-1(hypoxia inducible factor-1, HIF-1)信号通路、cAMP 信号通路及 AGE-RAGE 信号通路等(图 3D)。

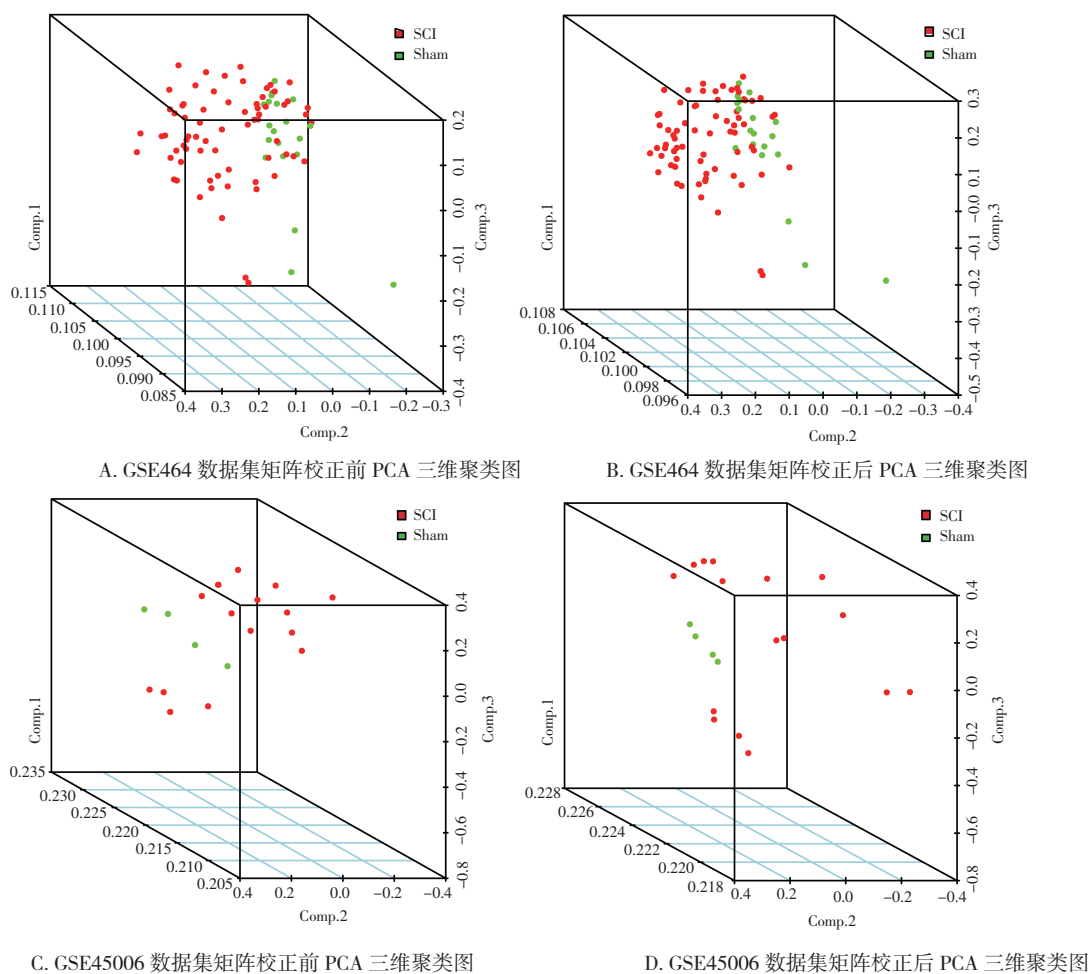
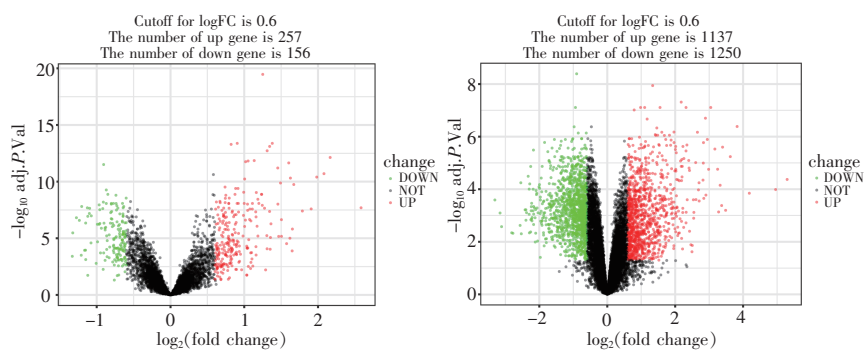
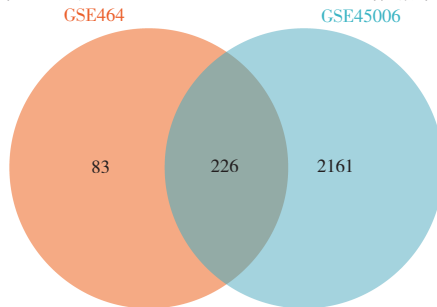


图 1 数据集矩阵校正前后 PCA 三维聚类图



A. GSE464 数据集 DEGs 火山图

B. GSE45006 数据集 DEGs 火山图

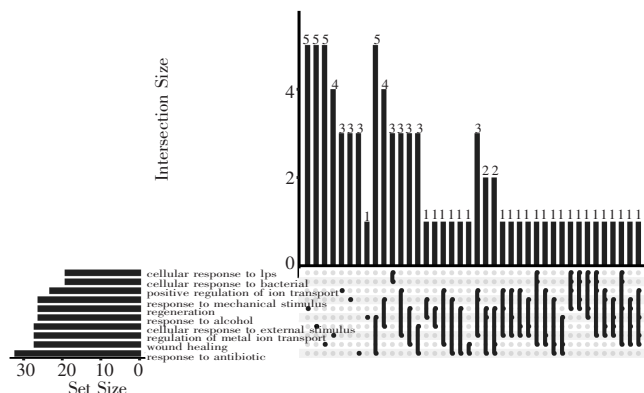


注:右上方红点代表上调的 DEGs;左上方绿点代表下调的 DEGs;中间的黑点代表无显著差异的表达基因

图 2 DEGs 筛选结果

2.3 GSEA 分析

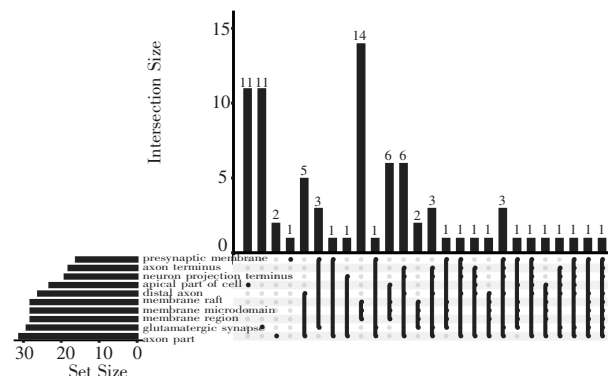
GSEA 分析结果显示,富集的通路涉及 NF- κ B 和 Toll 样受体信号通路(图 4),其中 Myd88、Cd14、Cd40、Casp8 和 Ly96 分子通过以上 2 条通路发挥重要作用。



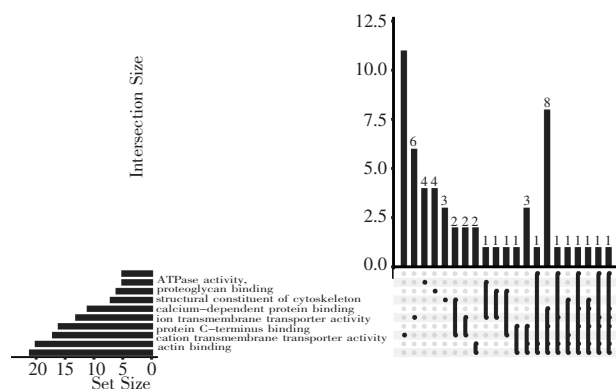
A. 生物学过程

2.4 PPI 网络和 hub 基因

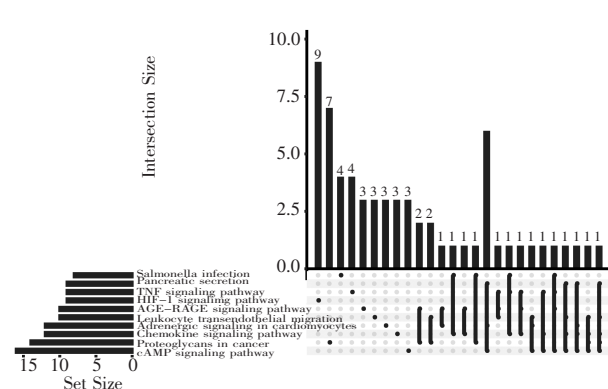
通过 STRING 在线数据库构建 DEGs 的 PPI 网络,并使用 Cytoscape 将其可视化,结果如图 5A 所示。根据最大相关标准(MCC)共获得 10 个 hub 基因,分别为 *Anxa2*、*Fabp5*、*Tubb5*、*Gush*、*Grn*、*Prkcd*、*Gns*、*Ctsc*、*Lyz2* 和 *Vat1*(图 5B)。



B. 细胞组分



C. 分子功能



D. KEGG

图 3 GO 和 KEGG 通路富集分析

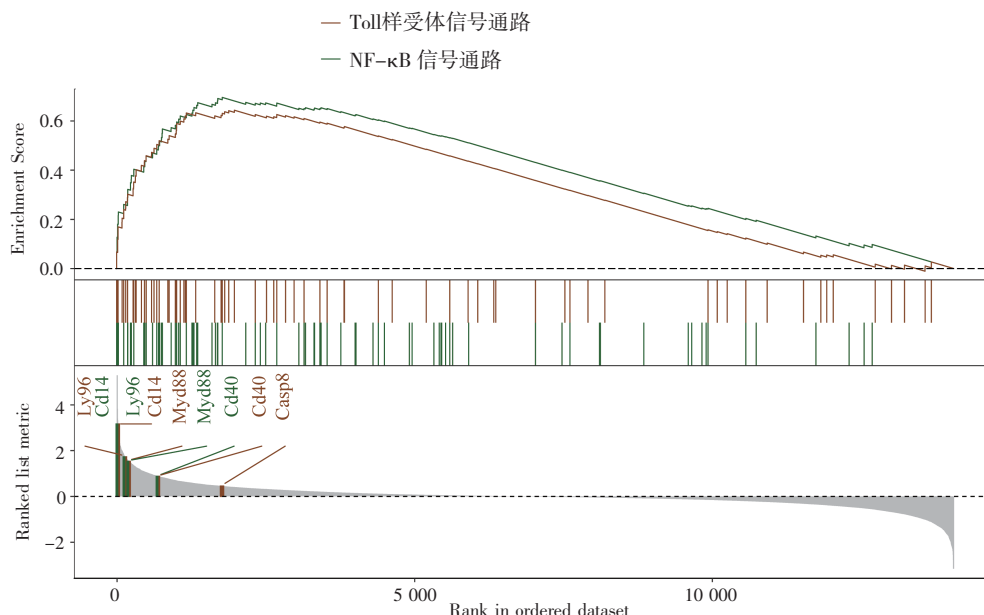
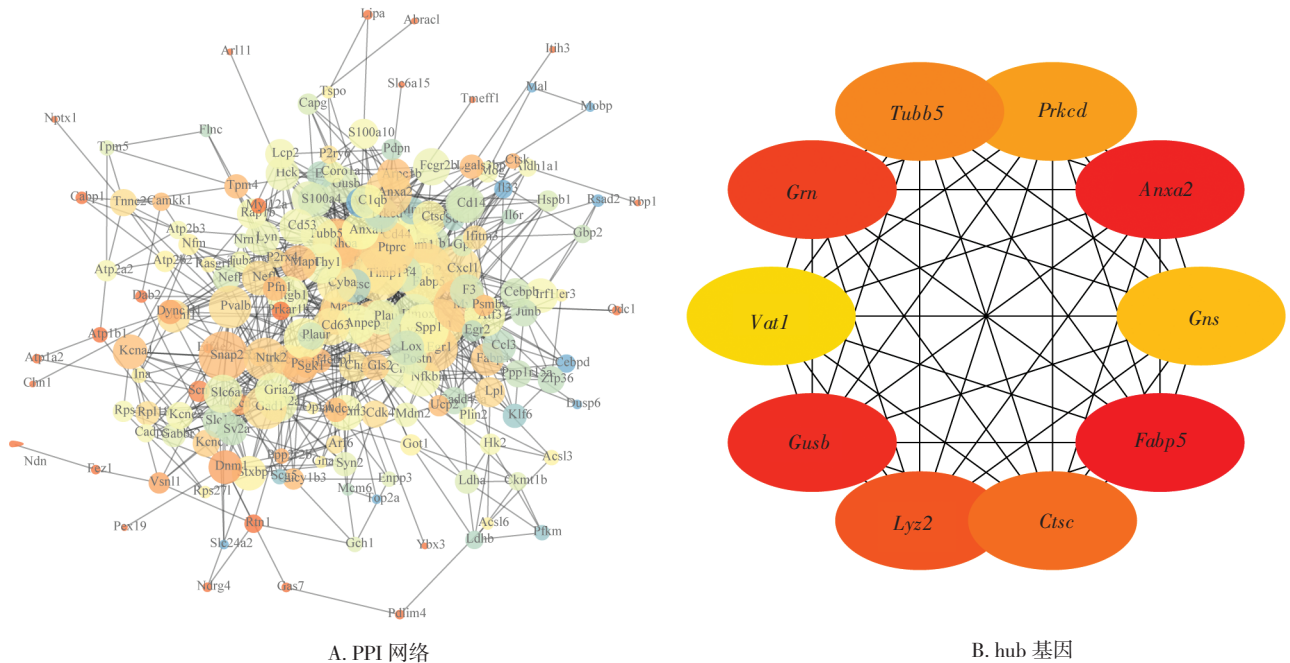


图 4 GSEA 功能富集分析

2.5 DEGs 间互作关系

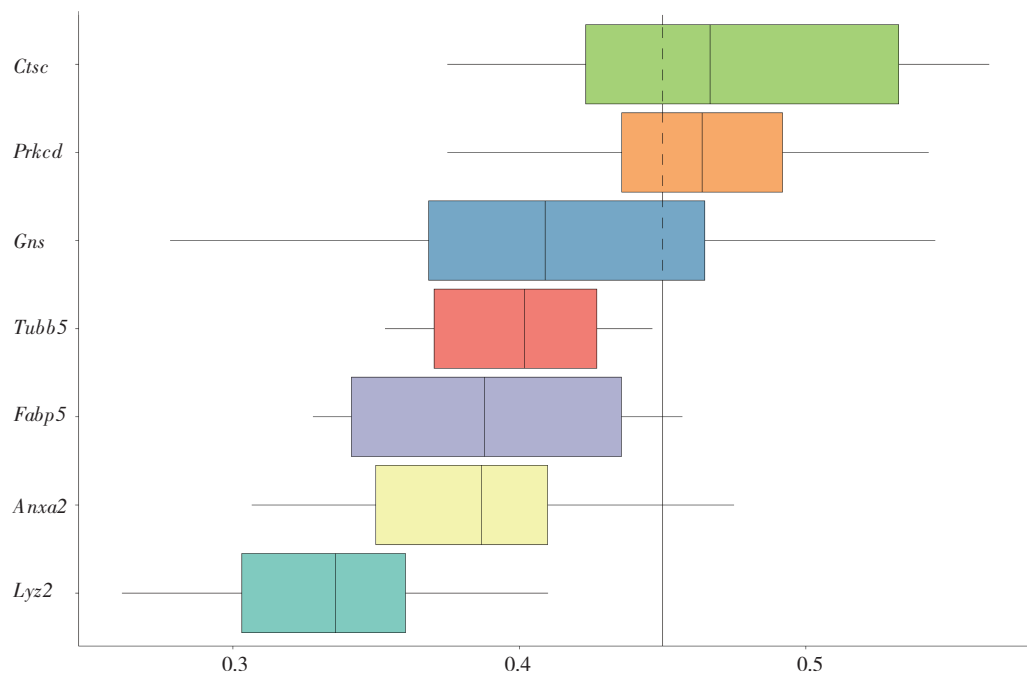
为了揭示 hub 基因之间的相互作用在不同细胞类型中发挥共同的生物学过程,使用 GO 注释间的语义相似度来聚

集紧密相关的基因(图 6)。结果显示 *Ctsc* 和 *Prkcd* 排列在一起,表明它们之间关系比较密切。



注:网络中节点的大小表示聚类系数,节点越大,聚类系数越大,说明该基因在网络中占据比重就越大;节点颜色表示度,度越大,说明该节点连线就越多,度从大到小分别为蓝、黄、橙色;线的粗细代表综合得分,分越高线越粗,说明两蛋白间存在互作;基因颜色越红,说明富集分数越高,黄色代表富集分数相对较小

图 5 PPI 网络与 hub 基因



注:方框代表 50% 的相似点;上下边界显示第 75 和第 25 百分位;方框中的线条表示功能相似性的平均值

图 6 DEGs 功能相似箱形图

3 讨论

本研究共鉴定出 226 个 DEGs。对这些 DEGs 进行 GO 和 KEGG 通路富集分析的结果显示,DEGs 参与细胞对炎症的反应、再生及修复等 BP;涉及突触前膜、轴突末端、神经元投射终点站等 CC;介导 ATP 磷酸化、细胞骨架组成、钙依赖蛋白的结合及离子跨膜转运等 MF。KEGG 通路富集分析发现,这些 DEGs 主要参与 TNF 信号通路、HIF-1 信号通路、CAMP 信号通路及 AGE-RAGE 信号通路等,以上通路在 SCI 的发病机制密切相关。例如,Han X 等^[19]研究表明,SCI 后 HIF- α 表达水平升高,且 HIF- α 的上调可以显著改善 SCI 大鼠的神经功能恢复。另有研究表明,脊髓中 CAMP 上调可显著增强神经轴突的生长和再生^[20]。此外,TNF 作为一种炎症介质,也广泛参与 SCI 后炎症反应,介导小胶质细胞的活化及神经元细胞的凋亡过程^[21]。然而,AGE-RAGE 信号通路在 SCI 中的作用尚未见报道。有研究表明,AGE-RAGE 信号通路参与炎症反应、氧化应激及小胶质细胞活化等过程^[22-23]。而炎症反应、氧化应激及小胶质细胞活化与 SCI 密切相关^[24-25]。由此推测 AGE-RAGE 信号通路在 SCI 中发挥重要作用,值得进一步研究。

为了弥补 DEGs 分析思路的不足,本研究对所有的表达基因数据进行了 GSEA 分析。GSEA 富集到 NF- κ B 和 Toll 样受体 2 个重要信号通路。NF- κ B^[26-27] 和 Toll 样受体^[28-29] 信号通路在 SCI 中已有大量研究,并且通过介导炎症反应^[30] 和氧化应激^[31] 参与 SCI 过程。例如,Myd88^[32]、CD40^[33]、CD14^[34]、Ly96^[35] 通过 TLR4 信号通路参与 SCI 后的神经炎症反应。Casp8^[36] 激活 NF- κ B 信号通路^[37] 参与小胶质细胞的活化。这进一步说明本研究结果质量的可靠性。

本研究得到 10 个 hub 基因,分别为 *Anxa2*、*Fabp5*、*Tubb5*、*Gusb*、*Grn*、*Prkcd*、*Gns*、*Ctsc*、*Lyz2* 和 *Vat1*。以上部分基因在先前的研究中被证实与 SCI 密切相关。例如,*Anxa2* 的高表达与 SCI 后的炎症反应和星型胶质细胞的增生相关^[4]。*Fabp5* 参与 SCI 后神经功能的恢复^[5]。另外 *Tubb5*^[38]、*Gusb*^[39] 和 *Grn*^[40] 在 SCI 后呈明显高表达,与本研究结果相符。然而,目前缺乏 *Prkcd*、*Ctsc*、*Vat1*、*Gns* 和 *Lyz2* 在 SCI 中相关研究。

Prkcd 基因编码一种磷脂和二酰甘油依赖的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,对细胞的死亡和存活起重要作用^[41]。在帕金森大鼠模型中发现,*Prkcd* 驱动了小胶质细胞活化后引起的炎症反应^[42]。*Prkcd* 还可以激

活 NADPH 氧化酶,而 NADPH 氧化酶的活化促进 ROS 的产生^[43]。Dang DK 等^[44]研究表明,*Prkcd* 是甲基苯丙胺诱导的 NADPH 氧化酶激活的关键调节剂,而通过抑制 *Prkcd* 能够有效抵抗甲基苯丙胺引起的氧化应激过程从而避免对神经元的损伤。在另 1 项研究中,给外周神经损伤的大鼠胶质细胞源性神经营养因子能够抑制小胶质细胞的激活并通过 p38 和 PKC 信号通路抑制细胞因子的产生来增强神经营养作用^[45]。虽然该基因在 SCI 中缺乏相关研究报道,推测 *Prkcd* 在 SCI 中发挥重要作用。

Ctsc 基因编码蛋白酶 C1 和溶酶体半胱氨酸蛋白酶。它似乎是免疫细胞中许多丝氨酸蛋白酶激活的中心协调者。在多发硬化症之类的脱髓鞘疾病中发现,过表达 *Ctsc* 加速 Plp4^{-/-} 转基因大鼠的脱髓鞘改变。相反,在慢性脱髓鞘期,抑制 *Ctsc* 可有效改善神经脱髓鞘改变^[46]。研究还发现,*Ctsc* 通过激活 Ca²⁺ 依赖的 PKC/p38MAPK/NF- κ B 途径促进小胶质细胞向 M1 极化来加剧神经炎症反应^[47]。SCI 后的炎症反应和脱髓鞘改变是导致脊髓继发性级联损伤和神经功能难以恢复的主要原因^[48]。本研究团队猜想 *Ctsc* 基因应该也参与 SCI 过程,靶向抑制该基因,可能会改善 SCI。

Vat1 是一种蛋白编码基因,负责调节神经末梢递质的储存和释放。关于该基因的研究较少,仅有的几篇报道了该基因参与肿瘤的增殖和转移过程。例如,Mertsch S 等^[49]报道 *Vat1* 在胶质母细胞瘤中表达上调并促进细胞迁移。最近发现大鼠糖尿病周围神经病变模型中敲减 *Vat1* 减少轴突的生长^[50]。值得欣慰的是,本研究分析发现该基因在 SCI 后明显下调,推测其参与 SCI 损伤机制应该是抑制了轴突的再生和胶质细胞迁移的缘故。

Gns 基因的产物是 1 种在所有细胞中都存在的溶酶体酶。它参与肝素、硫酸肝素和硫酸角蛋白的分解代谢。该基因缺失导致糖胺聚糖在体内储存,从而导致以神经系统脱髓鞘改变为主的溶酶体贮积病发生^[51]。由于对该基因研究报道较少,因此其在 SCI 中扮演什么角色仍然不知,值得进一步研究。

Lyz2 基因编码的溶菌酶 M (LysM) 被认为在成纤维细胞、未成熟和成熟的巨噬细胞中表达^[52]。小胶质细胞作为巨噬细胞的近缘亲戚,也是中枢神经系统的重要组成部分,然而它的异常活化加速了 SCI 过程^[53]。另外,溶菌酶在神经损伤期间通过神经元的 TLR4 活化引起疼痛反应^[54]。有趣的是,TLR4 在 SCI 中也介导炎症反应^[55]。然而 *Lyz2* 是否在小胶质细胞表达,以及是否通过 TLR4 信号通路介导 SCI 值得

深入研究。

考虑到 *hub* 基因在 CC 和 MF 中有相似性,通过语义相似度进行排序,发现 *Ctsc* 和 *Prkcd* 关系比较紧密。现有的研究发现 *Ctsc* 和 *Prkcd* 都是编码蛋白酶的基因,在 SCI 后都显著高表达,并有活化小胶质细胞参与神经炎症反应作用^[42,47];炎症反应恰恰也是 SCI 的主要原因之一^[56];由此推测以上 2 个基因对 SCI 后引发的继发性损伤起着某种协同作用,但这还需要进一步研究证实。

综上所述,本研究通过生物信息学方法对大鼠 SCI 相关基因表达谱进行综合分析,成功筛选出 226 个 DEGs。通过对这些基因进行 GO、KEGG、GSEA 富集分析,进一步发现炎症反应、NF- κ B、Toll 样受体在 SCI 中扮演重要角色。此外,通过构建 PPI 共得到 10 个 *hub* 基因,其中 *Prkcd*、*Gns*、*Ctsc*、*Lyz2* 和 *Vat1* 在 SCI 中缺乏相关研究报道,提示其可能是 SCI 后继发性级联损伤分子机制的研究靶点,值得进一步探讨。总之,本研究确定了参与 SCI 的关键基因和信号通路,为进一步阐明继发性 SCI 分子机制提供了新的理论依据,有助于制定治疗 SCI 的新策略。

参 考 文 献

- [1] Baker G, Matveychuk D, Mackenzie EM, et al. Attenuation of the effects of oxidative stress by the MAO-inhibiting antidepressant and carbonyl scavenger phenelzine[J]. *Chem Biol Interact*, 2019, 304: 139–147.
- [2] Rubiano AM, Carney N, Chesnut R, et al. Global neurotrauma research challenges and opportunities[J]. *Nature*, 2015, 527(7578): S193–197.
- [3] Kramer JLK, Minhas NK, Jutzeler CR, et al. Neuropathic pain following traumatic spinal cord injury: models, measurement, and mechanisms[J]. *J Neurosci Res*, 2017, 95(6): 1295–1306.
- [4] Chen J, Cui Z, Yang S, et al. The upregulation of annexin A2 after spinal cord injury in rats may have implication for astrocyte proliferation[J]. *Neuropeptides*, 2017, 61: 67–76.
- [5] Figueroa JD, Serrano-Illan M, Licero J, et al. Fatty acid binding protein 5 modulates docosahexaenoic acid-induced recovery in rats undergoing spinal cord injury[J]. *J Neurotrauma*, 2016, 33(15): 1436–1449.
- [6] Villaseñor-Park J, Ortega-Loayza AG. Microarray technique, analysis, and applications in dermatology[J]. *J Invest Dermatol*, 2013, 133(4): e7.
- [7] Davis S, Meltzer PS. GEOquery: a bridge between the gene expression omnibus (GEO) and bioconductor[J]. *Bioinformatics*, 2007, 23(14): 1846–1847.
- [8] Edgar R, Domrachev M, Lash AE. Gene expression omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository[J]. *Nucleic Acids Res*, 2002, 30(1): 207–210.
- [9] Gautier L, Cope L, Bolstad BM, et al. Affy-analysis of affymetrix gene chip data at the probe level[J]. *Bioinformatics*, 2004, 20(3): 307–315.
- [10] 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.
- [11] Wagih O. ggseqlogo: a versatile R package for drawing sequence logos[J]. *Bioinformatics*, 2017, 33(22): 3645–3647.
- [12] Chen H, Boutros PC. VennDiagram: a package for the generation of highly-customizable Venn and Euler diagrams in R[J]. *BMC Bioinformatics*, 2011, 12: 35.
- [13] Yu G, Wang LG, Han Y, et al. clusterProfiler: an R package for comparing biological themes among gene clusters[J]. *OMICS*, 2012, 16(5): 284–287.
- [14] Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, et al. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(43): 15545–15550.
- [15] 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): D607–613.
- [16] 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.
- [17] Chin CH, Chen SH, Wu HH, et al. cytoHubba: identifying hub objects and sub-networks from complex interactome[J]. *BMC Syst Biol*, 2014, 8S4: 11.
- [18] Yu G, Li F, Qin Y, et al. GOSemSim: an R package for measuring semantic similarity among GO terms and gene products[J]. *Bioinformatics*, 2010, 26(7): 976–978.
- [19] Han X, Chen Y, Liu Y, et al. HIF-1 α promotes bone marrow stromal cell migration to the injury site and enhances functional recovery after spinal cord injury in rats[J]. *J Gene Med*, 2018, 20(12): e3062.
- [20] Batty NJ, Fenrich KK, Fouad K. The role of cAMP and its downstream targets in neurite growth in the adult nervous system[J]. *Neurosci Lett*, 2017, 652: 56–63.
- [21] Wang W, Huang X, Li J, et al. Methane suppresses microglial activation related to oxidative, inflammatory, and apoptotic injury during spinal cord injury in rats[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2017, 2017: 2190897.
- [22] Younessi P, Yoonessi A. Advanced glycation end-products and their receptor-mediated roles: inflammation and oxidative stress[J]. *Iran J Med Sci*, 2011, 36(3): 154–166.
- [23] Hayden MR. Type 2 diabetes mellitus increases the risk of late-onset Alzheimer's disease: ultrastructural remodeling of the neurovascular unit and diabetic gliopathy[J]. *Brain Sci*, 2019, 9(10): E262.
- [24] Wang C, Zhang L, Ndong JC, et al. Progranulin deficiency exacerbates spinal cord injury by promoting neuroinflammation and cell apoptosis in mice[J]. *J Neuroinflammation*, 2019, 16(1): 238.
- [25] Hellenbrand DJ, Reichl KA, Travis BJ, et al. Sustained interleukin-10 delivery reduces inflammation and improves motor function after spinal cord injury[J]. *J Neuroinflammation*, 2019, 16(1): 93.
- [26] Liu J, Zhang S, Fan X, et al. Dexmedetomidine preconditioning ameliorates inflammation and blood-spinal cord barrier damage after

- spinal cord ischemia-reperfusion injury by down-regulation high mobility group box 1-Toll-like receptor 4-nuclear factor κ B signaling pathway[J]. *Spine*(Phila Pa 1976), 2019, 44(2):E74-81.
- [27] Sun L, Li M, Ma X, et al. Inhibition of HMGB1 reduces rat spinal cord astrocytic swelling and AQP4 expression after oxygen-glucose deprivation and reoxygenation via TLR4 and NF- κ B signaling in an IL-6-dependent manner[J]. *J Neuroinflammation*, 2017, 14(1):231.
- [28] Zusso M, Mercanti G, Belluti F, et al. Phenolic 1,3-diketones attenuate lipopolysaccharide-induced inflammatory response by an alternative magnesium-mediated mechanism[J]. *Br J Pharmacol*, 2017, 174(10):1090-1103.
- [29] Pallott A, Ratnayake A, Ni L, et al. A Toll-like receptor 9 antagonist restores below-level glial glutamate transporter expression in the dorsal horn following spinal cord injury[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1):8723.
- [30] Xie XK, Xu ZK, Xu K, et al. DUSP19 mediates spinal cord injury-induced apoptosis and inflammation in mouse primary microglia cells via the NF- κ B signaling pathway[J]. *Neuro Res*, 2020, 42(1):31-38.
- [31] Li H, Kong W, Chambers CR, et al. The non-psychoactive phyto-cannabinoid cannabidiol (CBD) attenuates pro-inflammatory mediators, T cell infiltration, and thermal sensitivity following spinal cord injury in mice[J]. *Cell Immunol*, 2018, 329:1-9.
- [32] Li H, Wang Y, Hu X, et al. Thymosin beta 4 attenuates oxidative stress-induced injury of spinal cord-derived neural stem/progenitor cells through the TLR4/MyD88 pathway[J]. *Gene*, 2019, 707:136-142.
- [33] Morris G, Puri BK, Olive L, et al. Emerging role of innate B1 cells in the pathophysiology of autoimmune and neuroimmune diseases: association with inflammation, oxidative and nitrosative stress and autoimmune responses[J]. *Pharmacol Res*, 2019, 148:104408.
- [34] Wu Z, Zhang Z, Lei Z, et al. CD14: biology and role in the pathogenesis of disease[J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2019, 48:24-31.
- [35] Walter S, Letiembre M, Liu Y, et al. Role of the toll-like receptor 4 in neuroinflammation in Alzheimer's disease[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2007, 20(6):947-956.
- [36] Kavanagh E, Burguillos MA, Carrillo-Jimenez A, et al. Deletion of caspase-8 in mouse myeloid cells blocks microglia pro-inflammatory activation and confers protection in MPTP neurodegeneration model[J]. *Aging*(Albany NY), 2015, 7(9):673-689.
- [37] Ando M, Kawazu M, Ueno T, et al. Cancer-associated missense mutations of caspase-8 activate nuclear factor- κ B signaling[J]. *Cancer Sci*, 2013, 104(8):1002-1008.
- [38] Afjehi-Sadat L, Brejnikow M, Kang SU, et al. Differential protein levels and post-translational modifications in spinal cord injury of the rat[J]. *J Proteome Res*, 2010, 9(3):1591-1597.
- [39] Yashon D, Bingham WG, Friedman SJ, et al. Intracellular enzyme liberation in primate spinal cord injury[J]. *Surg Neurol*, 1975, 4(1):43-51.
- [40] Naphade SB, Kigerl KA, Jakeman LB, et al. Progranulin expression is upregulated after spinal contusion in mice[J]. *Acta Neuropathol*, 2010, 119(1):123-133.
- [41] Doller A, Akool E, Huwiler A, et al. Posttranslational modification of the AU-rich element binding protein HuR by protein kinase C δ elicits angiotensin II-induced stabilization and nuclear export of cyclooxygenase 2 mRNA[J]. *Mol Cell Biol*, 2008, 28(8):2608-2625.
- [42] Gordon R, Singh N, Lawana V, et al. Protein kinase C δ upregulation in microglia drives neuroinflammatory responses and dopaminergic neurodegeneration in experimental models of Parkinson's disease[J]. *Neurobiol Dis*, 2016, 93:96-114.
- [43] Reeves EP, Dekker LV, Forbes LV, et al. Direct interaction between p47phox and protein kinase C: evidence for targeting of protein kinase C by p47phox in neutrophils[J]. *Biochem J*, 1999, 344 Pt 3:859-866.
- [44] Dang DK, Shin EJ, Kim DJ, et al. PKC δ -dependent p47phox activation mediates methamphetamine-induced dopaminergic neurotoxicity[J]. *Free Radic Biol Med*, 2018, 115:318-337.
- [45] Chou AK, Yang MC, Tsai HP, et al. Adenoviral-mediated glial cell line-derived neurotrophic factor gene transfer has a protective effect on sciatic nerve following constriction-induced spinal cord injury[J]. *PLoS One*, 2014, 9(3):e92264.
- [46] Shimizu T, Wisessmith W, Li J, et al. The balance between cathepsin C and cystatin F controls remyelination in the brain of Plp1-over-expressing mouse, a chronic demyelinating disease model[J]. *Glia*, 2017, 65(6):917-930.
- [47] Liu Q, Zhang Y, Liu S, et al. Cathepsin C promotes microglia M1 polarization and aggravates neuroinflammation via activation of Ca²⁺-dependent PKC/p38MAPK/NF- κ B pathway[J]. *J Neuroinflammation*, 2019, 16(1):10.
- [48] Zeng H, Huang Y, Li Z, et al. Effects of emodin on oxidative stress and inflammatory response in rats with acute spinal cord injury[J]. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, 2018, 43(9):1886-1893.
- [49] Mertsch S, Becker M, Lichota A, et al. Vesicle amine transport protein-1 (VAT-1) is upregulated in glioblastomas and promotes migration[J]. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 2009, 35(4):342-352.
- [50] Jia L, Chopp M, Wang L, et al. MiR-34a regulates axonal growth of dorsal root ganglia neurons by targeting FOXP2 and VAT1 in post-natal and adult mouse[J]. *Mol Neurobiol*, 2018, 55(12):9089-9099.
- [51] Gieselmann V, von Figura K. Advances in the molecular genetics of metachromatic leukodystrophy[J]. *J Inher Metab Dis*, 1990, 13(4):560-571.
- [52] Cross M, Mangelsdorf I, Wedel A, et al. Mouse lysozyme M gene: isolation, characterization, and expression studies[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, 85(17):6232-6236.
- [53] Lin J, Pan X, Huang C, et al. Dual regulation of microglia and neurons by Astragaloside IV-mediated mTORC1 suppression promotes functional recovery after acute spinal cord injury[J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(1):671-685.
- [54] Yadav S, Suroliya A. Lysozyme elicits pain during nerve injury by neuronal Toll-like receptor 4 activation and has therapeutic potential in neuropathic pain[J]. *Sci Transl Med*, 2019, 11(504):eaav4176.
- [55] Li XH, Fu NS, Xing ZM. MiR-100 suppresses inflammatory activation of microglia and neuronal apoptosis following spinal cord injury via TLR4/NF- κ B pathway[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(20):8713-8720.
- [56] Guo Y, Hong W, Wang X, et al. MicroRNAs in microglia: how do microRNAs affect activation, inflammation, polarization of microglia and mediate the interaction between microglia and glioma?[J]. *Front Mol Neurosci*, 2019, 12:125.