

• 论 著 •

脊髓损伤中差异表达基因的生物信息学分析及其在神经炎症细胞内的变化水平研究

王应辉¹, 龙霞^{2△}, 李琴³

(1. 黔南州人民医院医学检验科, 贵州 都匀 558000; 2. 三都县人民医院检验科, 贵州 三都 558100;

3. 罗甸县边阳卫生院, 贵州 罗甸 550100)

[摘要] **目的** 使用生物信息学方法筛选参与脊髓损伤发展过程中的差异表达基因(DEGs), 并于体外实验探索脂多糖(LPS)激活的 BV2 细胞 DEGs 的变化情况, 以期脊髓损伤的治疗提供新靶点。**方法** 从 GEO 数据库下载基因芯片数据, 并将数据集中的样本分为脊髓损伤 Day2 组和 Day5 组, 应用 R 软件处理来自不同数据集样本间的批次效应, 对基因芯片的表达数据进行标准化处理, 应用 R 软件分析标准化后的基因表达矩阵, 以得到差异基因。将差异基因导入 DAVID 数据库进行基因本体论(GO)分析, 并通过 KEGG 数据库进行通路分析。应用 STRING 蛋白数据库构建蛋白-蛋白相互作用(PPI)网络, 并通过 Cytoscape 软件分析得到 10 个 Hub 基因。实时荧光定量聚合酶链反应(RT-qPCR)分析 LPS 激活后 BV2 小胶质细胞 Hub 基因中分值高的前 2 个基因。**结果** 与 Day2 组比较, Day5 组有 340 个 DEGs, 对其生物信息分析发现, DEGs 富集于细胞炎症反应和物质代谢中。通过 STRING 软件进行模块分析得出 10 个中心节点, 10 个基因经 KEGG 再次分析后发现 CXCL10、CCR3、CCR10 和 CCL2 基因显著富集于趋化因子信号通路和细胞因子-细胞因子受体相互作用。体外实验中, 与正常组比较, LPS 组炎性细胞因子[白细胞介素-1 β (IL-1 β)、IL-6 和肿瘤坏死因子 α (TNF- α)]表达水平及趋化因子 CXCL10、CCR9/10 和 CCL2 mRNA 表达量均增加, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** CXCL10、CCR3、CCR10 和 CCL2 趋化因子信号通路和细胞因子-细胞因子受体相互作用等可能与脊髓损伤发展机制关系密切。CXCL10、CCR9/10 和 CCL2 介导了 BV2 细胞炎症反应。

[关键词] 脊髓损伤; 生物信息学; 差异表达基因; BV2 小胶质细胞; 神经炎症

DOI: 10.3969/j.issn.1009-5519.2023.12.005 **中图法分类号:** R741

文章编号: 1009-5519(2023)12-2007-09 **文献标识码:** A

Bioinformatics analysis of differentially expressed genes in spinal cord injury and their changes in neuroinflammatory cells

WANG Yinghui¹, LONG Xia^{2△}, LI Qin³

(1. Department of Clinical Laboratory, Qiannan People's Hospital, Duyun, Guizhou 558000, China;

2. Department of Clinical Laboratory, Sandu County People's Hospital, Sandu, Guizhou 558100, China; 3. Bianyang Health Center of Luodian County, Luodian, Guizhou 550100, China)

[Abstract] **Objective** To screen for differentially expressed genes(DEGs) involved in the development of spinal cord injury using bioinformatics methods, and to explore the changes of lipopolysaccharide(LPS) activated BV2 cells DEGs in vitro, in order to provide a new target for the treatment of spinal cord injury. **Methods** The gene-chip data were downloaded from GEO database, and the samples in the data set were divided into the spinal cord injury Day 2 group and the Day 5 group. R software was used to process the batch effect between the samples from different data sets, and the expression data of the gene-chip was standardized. R software was used to analyze the standardized gene expression matrix to obtain the differential genes. The differential genes were imported into the DAVID database for gene ontology(GO) analysis, and the pathway analysis was performed through the KEGG database. The protein-protein interactions(PPI) network was constructed using STRING protein database, and 10 Hub genes were analyzed by Cytoscape software. Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction(RT-qPCR) was used to analyze the top two genes with high scores in the Hub gene of BV2 microglia activated by LPS. **Results** Compared with the Day 2 group, there were 340 DEGs in the Day 5 group. Analysis of the bioinformation showed that DEGs were enriched in

cell inflammatory response and substance metabolism. A total of 10 central nodes were obtained through module analysis with STRING software. KEGG re-analysis of 10 genes revealed that CXCL10, CCR3, CCR10 and CCL2 genes were significantly enriched in chemokine signaling pathway and cytokine-cytokine receptor interaction. In vitro experiment, compared with normal group, the expression levels of inflammatory cytokines [interleukin-1 β (IL-1 β), IL-6 and tumor necrosis factor α (TNF- α)] and mRNA expressions of chemokines CXCL10, CCR9/10 and CCL2 were increased in the LPS group, with statistical significance($P < 0.05$). **Conclusion**

CXCL10, CCR3, CCR10 and CCL2 chemokine signaling pathways and cytokine-cytokine receptor interactions may be closely related to the development mechanism of spinal cord injury. CXCL10, CCR9/10 and CCL2 mediate the inflammatory responses of BV2 cells.

[Key words] Spinal cord injury; Bioinformatics; Differentially expressed gene; BV2 microglia; Neuroinflammation

脊髓损伤是中枢神经系统(CNS)受损的一种严重疾病,临床表现为患者损伤节段以下部位神经功能丧失,通常会造成瘫痪等严重的后果。目前,该病治疗手段主要以手术减压、药物抗炎消肿为主,但却未明显降低患者的致残率和截瘫率。因此,脊髓损伤给患者和家庭带来了沉重的心理和经济压力^[1]。脊髓损伤可分为原发性脊髓损伤和继发性脊髓损伤。原发性脊髓损伤常造成神经不可逆损伤,损伤部位伴脊髓水肿、组织缺血、炎症反应、氧自由基生成增多等症状,是继发性脊髓损伤发生的基础^[2-3]。继发性主要由炎症反应和细胞凋亡反应介导,是导致神经细胞受损及功能丧失的重要原因,故在脊髓损伤的发病机制中处于重要地位^[4]。而继发性脊髓损伤主要是由小胶质细胞等中枢神经免疫细胞过度活化释放多种神经毒性物质所致,因此,抑制小胶质细胞的过度活化是减缓脊髓损伤发展的重要途径^[5]。然而,小胶质细胞介导的神经炎症为继发性慢性炎症反应^[6],病原体 and 神经退行性疾病中的多个组分(β -淀粉样蛋白、 α -Syn 等)均能激活其膜上的 TLR2、TLR4 受体,激活下游通路,诱导促炎性细胞因子白细胞介素(IL-1 β)、IL-6 和肿瘤坏死因子 α (TNF- α)等的表达,导致神经元损伤和死亡^[7-8]。故小胶质细胞过度活化是神经退行性疾病的致病因素之一。因此,对于脊髓损伤发展过程中的差异表达基因(DEGs)的探索,可以帮助临床预测继发性脊髓损伤潜在的作用靶点和新的治疗药物。

在本研究中,通过对公共数据库 GEO 来源的脊髓损伤数据集 GSE21497 基因组微阵列分析,包括评估 DEGs 和功能富集分析。构建蛋白-蛋白相互作用(PPI)网络运用相关插件分析差异表达关键基因,提供可能与脊髓损伤发病相关的分子机制。此外,本研究使用体外细胞炎症模型验证 DEGs 的变化水平,以期脊髓损伤的治疗提供新靶点。

1 资料与方法

1.1 芯片数据信息 本文分析的基因芯片数据来自

GEO 数据库,分析的数据集为 GSE21497,测序平台为 GPL570[HG-U133_Plus_2] Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array。样本来源于 Homo sapiens,将 20 份样本分为脊髓损伤后第 2 天组(Day2 组)和第 5 天组(Day5 组)。

1.2 差异基因数据标准化处理及筛选 基因芯片数据下载后,通过 R 语言处理不同数据集样本之间的批次效应。对数据进行标准化,用 R 语言处理标准化后的基因芯片数据,剔除基因重复项,得到差异基因^[9-10]。差异基因筛选条件为 $|\log_2(\text{fold change})| > 1, P < 0.05$,并对数据结果进行下载。

1.3 DEGs 的功能富集分析 得到 DEGs 后,为了探究这些基因可能存在的生物过程(BP)、细胞组分(CC)和分子功能(MF),故运用 DAVID(<https://david.ncifcrf.gov/tools.jsp>)数据库进行基因本体论(GO)注释差异基因的功能,该数据库是目前进行差异基因功能注释的权威数据库^[11]。同时,利用京都基因与基因组百科全书(KEGG)数据库(<https://www.kegg.jp/>)对差异基因进行通路富集分析^[12], $P < 0.05$ 为筛选标准,从而得到差异基因富集的重要通路。

1.4 PPI 网络构建和模块分析 STRING(<https://www.string-db.org/>)是一个可以构建 PPI 网络的数据库^[13]。通过 STRING 构建 PPI 网络,并用 Cytoscape 软件进行可视化,然后利用 Cytoscape 中的 CytoHubba 插件预测关键基因并定义为 Hub 基因。

1.5 BV2 细胞炎症模型

1.5.1 材料与试剂 DMEM/F12 培养基(C1133 0500BT)购自美国 Gibco 公司,脂多糖(LPS)L-6529 购自美国 Sigma 公司,胎牛血清(04-001-1ACS)、磷酸盐缓冲液(PBS, 02-024-1ACS)购自以色列 Biological Industries, RNA 提取试剂盒(R6834)购自美国 O-MEGA Bio-Tek 公司, Hifair III 1st Strand cDNA Synthesis SuperMix for qPCR (gDNA dige) (11141ES60)、Hieff UNICON Universal Blue qPCR SYBR Green Master Mix(11184ES08)购自上海 Ye-

asen,引物序列合成(2OD)购自生工生物工程(上海)股份有限公司。

1.5.2 细胞培养与分组 细胞在含 1% 双抗(青-链霉素)和 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基 37 ℃ 二氧化碳培养箱中培养,BV2 小胶质细胞分为正常对照组和 LPS 组(1 μg/mL LPS 诱导)2 组。

1.5.3 实时荧光定量聚合酶链反应(RT-qPCR) 将 BV2 细胞按 5 × 10⁵ 个/mL 密度接种到 6 孔板中,LPS(1 μg/mL)^[14] 刺激 12 h 后收集细胞,用 PBS 清洗 2 次。根据 E. Z. N. A Total RNA Kit 1 试剂盒说明书提取 BV2 细胞总 RNA。用 NanoDrop(Thermo Fischer Science 美国)测定 RNA 纯度和浓度。逆转录程序:25 ℃ 5 min,55 ℃ 15 min,85 ℃ 5 min 合成 cDNA 链。RT-qPCR 扩增按照 Yeasen 公司方法进行,热循环过程包括初始保持步骤预变性 95 ℃ 2 min 和 95 ℃ 变性 5 s,随后 60 ℃ 40 次循环 30 s(退火/延伸),60 ℃ 5 s/step(熔化曲线)分析。引物序列见表 1。

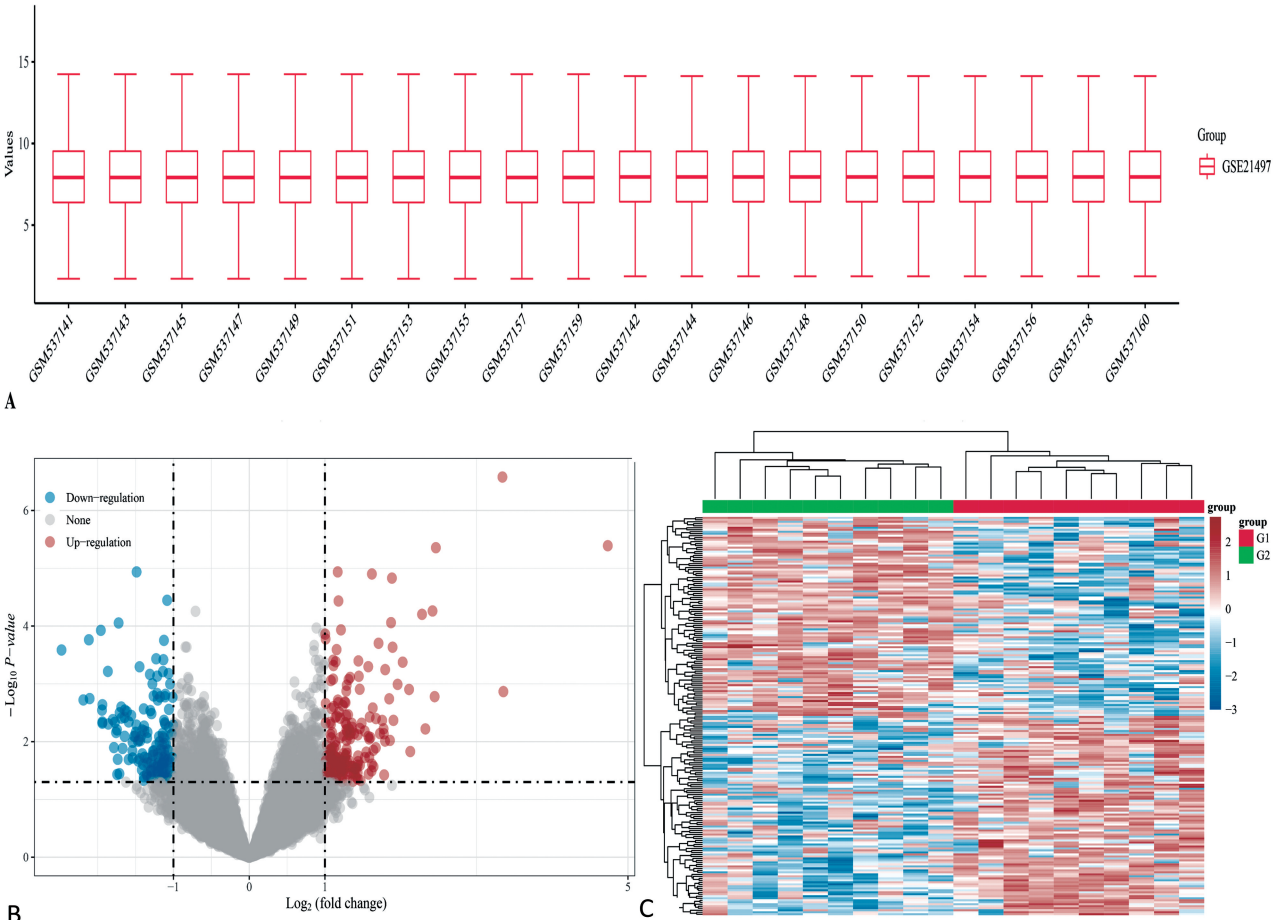
1.6 统计学处理 采用 GraphPad Prism version 8.0.1 统计软件进行统计分析,2 组间比较采用 *t* 检验,多组间均数比较采用方差分析。*P* < 0.05 为差异

有统计学意义。

2 结 果

2.1 确定 DEGs 从 GEO 数据库下载 GSE21497 数据文件,对数据进行批次效应和标准化处理,标准化后的数据可用于后续分析(图 1A)。总共得到 349 个差异基因。以火山图和热图形式展示了差异基因的分布情况(图 1B,C)。

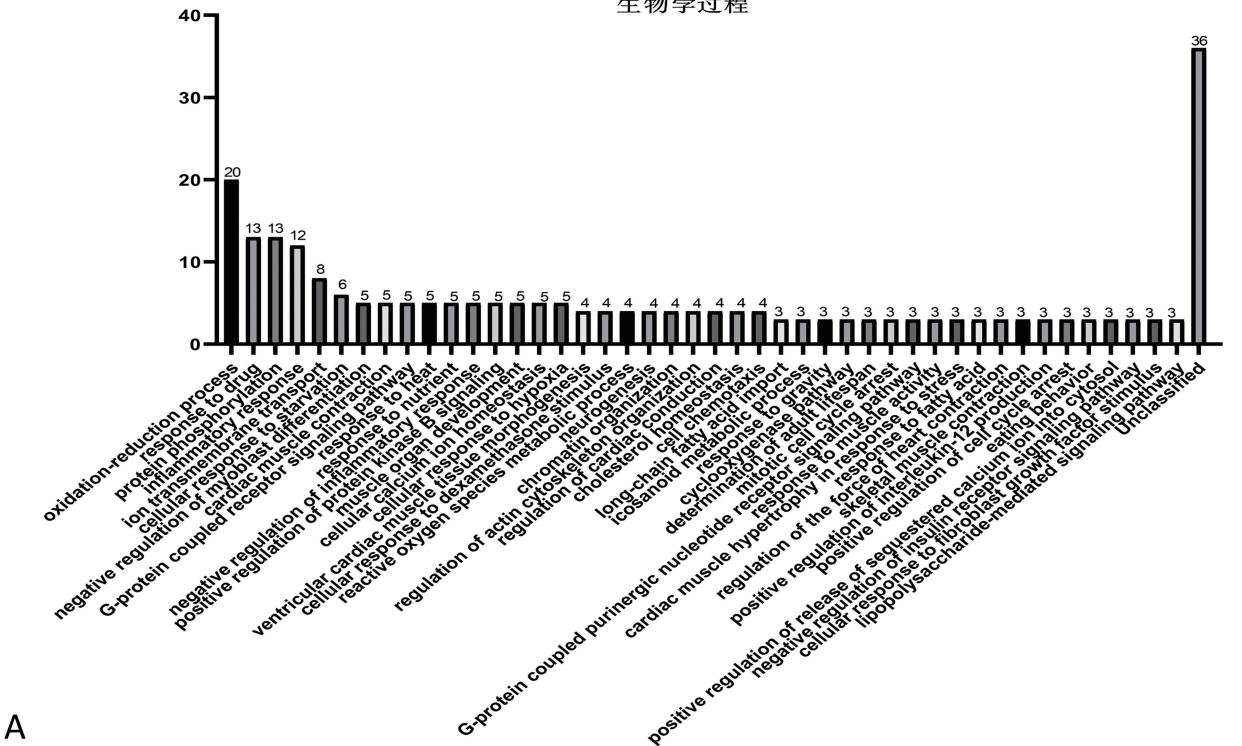
2.2 GO 分析和 KEGG 分析 用 DAVID 数据库对得到的 349 个差异基因进行 GO 分析,其中 9 个基因未被识别。340 个差异基因 GO 分析结果如图 2 所示,差异基因主要参与氧化还原过程、对药物的反应、蛋白质磷酸化、炎症反应和 G 蛋白偶联通路等生物过程。就细胞组分而言,差异基因主要分布在胞外区、细胞外间隙、内质网膜、细胞表面、细胞器膜、细胞-细胞连接和基底外侧质膜等部位。就分子功能而言,差异基因主要与蛋白质异二聚化活性、血红素结合、肌动蛋白丝结合、铁离子结合、氧化还原酶活性、分子氧还原、氧结合和钙依赖性蛋白结合等相关。KEGG 分析结果表明,脊髓损伤后碳水化合物,甘油脂代谢、PPAR 信号通路、类风湿关节炎、花生四烯酸代谢相关通路激活(表 2)。



注:A.数据标准化后箱线图;B.差异基因火山图;C.差异基因表达热图(此处分别展示差异改变最大的50个上调基因和50个下调基因)。

图 1 数据集 DEGs 分布情况

基因名	正向引物(5'→3')	反向引物(5'→3')
GAPDH	GGTTGTCTCCTGCGACTTCA	TGGTCCAGGGTTTCTTACTCC
IL-1β	GCAGAGCACAAAGCCTGTCTTCC	ACCTGTCTTGCCGAGGACTAAG
IL-6	AGGAGTGGCTAAGGACCAAGACC	CTGACCACAGTGAGGAATGTCCAC
TNF-α	CTTGTTGCCTCCTCTTTTGCTTA	CTTTATTTCTCTCAATGACCCGTAG
CXCL10	CTCTCTCCATCACTCCCCTTTA	AACTTAGAACTGACGAGCCTGAG
CCR9/10	CAGCCTTATTCTGGCATGT	CTTGCAAAGTGCCTGACATT
CCL2	AGCTGTAGTTTTTGTCACCAAGC	GTGCTGAAGACCTTAGGGCA



细胞组分

细胞组分	基因数量
extracellular region	37
extracellular space	32
endoplasmic reticulum membrane	22
cell surface	19
apical plasma membrane	11
organelle membrane	7
cell-cell junction	7
basolateral plasma membrane	7
sarcomere	5
phagocytic vesicle membrane	4
early endosome	2
Ndc80 complex	2

分子功能

分子功能	基因数
terodimerization activity	14
home binding	10
actin filament binding	9
oxidoreductase activity	9
mononuclear iron ion binding	9
calcium-dependent protein binding	6
RNA polymerase II activating transcription factor binding	5
G-protein coupled purinergic nucleotide receptor binding	5
bHLH transcription factor binding	4
histone H3 binding	4
geranyl pyrophosphate binding	4
sterol binding	3
poly(ADP-ribose) polymerase binding	3
aldehyde dehydrogenase activity	3
integrin binding	3
ATP binding	3
acid-sensing ion channel activity	2
acid-sensing ion channel binding	2
voltage-gated potassium channel activity	2
voltage-gated potassium channel binding	2
voltage-gated calcium channel activity	2
voltage-gated calcium channel binding	2
voltage-gated sodium channel activity	2
voltage-gated sodium channel binding	2
voltage-gated chloride channel activity	2
voltage-gated chloride channel binding	2
beta-glucosidase activity	2

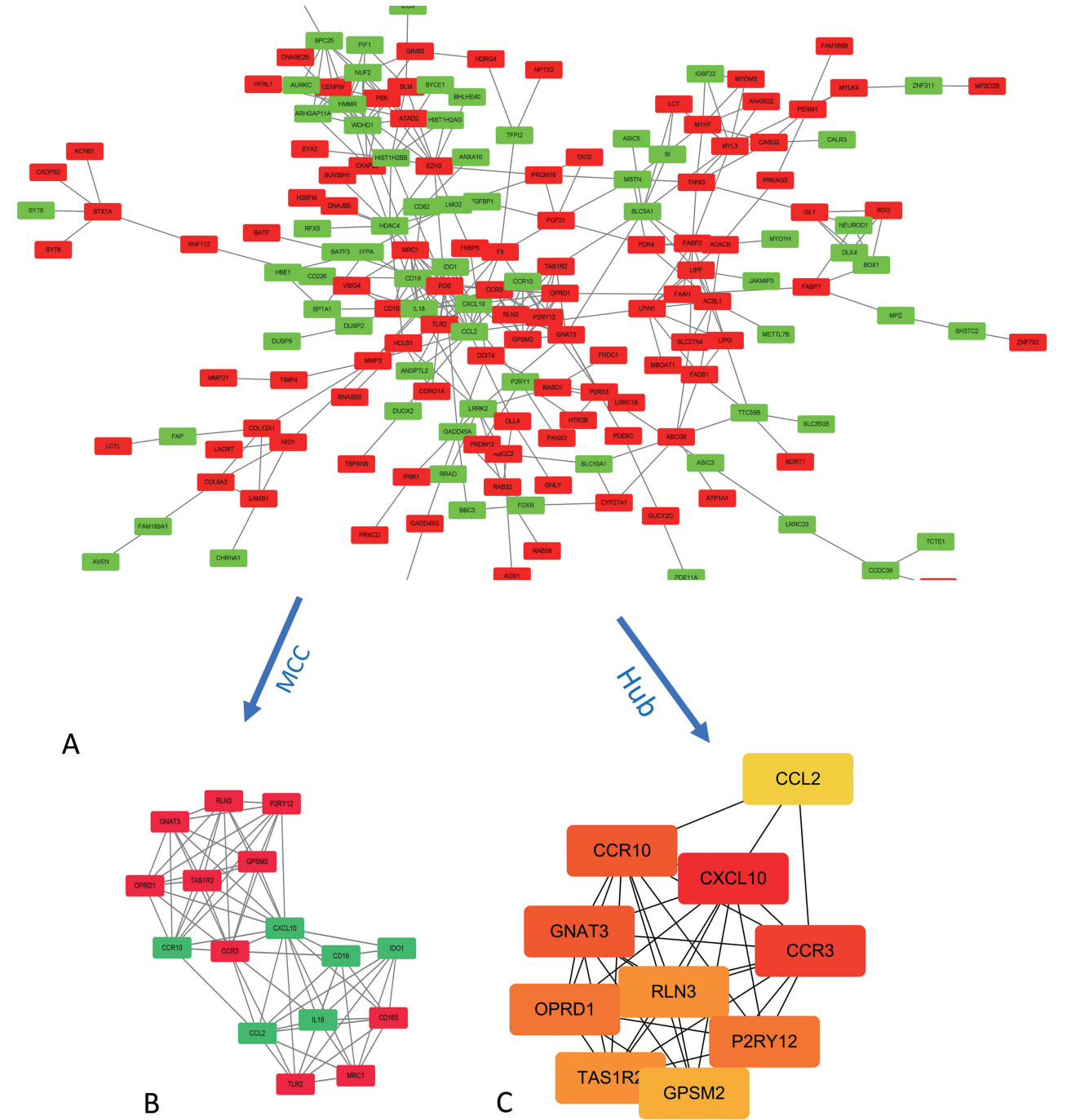
注:A.生物学过程;B.细胞组分;C.分子功能。

图 2 对脊髓损伤 Day2 和 Day5 的 340 个差异基因 GO 分析

表 2 对脊髓损伤 Day2 和 Day5 的 340 个差异基因 KEGG 分析

KEGG Term	计数	P	FDR
Carbohydrate digestion and absorption	5	7.40E-03	0.59
PPAR signaling pathway	6	7.90E-03	0.59
Bile secretion	6	9.00E-03	0.59
Glycerolipid metabolism	5	2.20E-02	0.88
Rheumatoid arthritis	6	2.40E-02	0.88
Arachidonic acid metabolism	5	2.60E-02	0.88

2.3 PPI 网络和 Hub 基因 将 340 个差异基因导入 STRING 数据库,分析得到其所编码蛋白质之间的相互作用关系(图 3A),随后使用 MCODE 模块分析 16 个节点结果(图 3B)所示。通过 Cytoscape 中的 cyto-Hubba 插件分析得到 CXCL10、CCR3、CCR10、GNAT3、OPRD1、P2RY12、RLN3、TAS1R2、GPSM2 和 CCL2 基因(图 3C)。



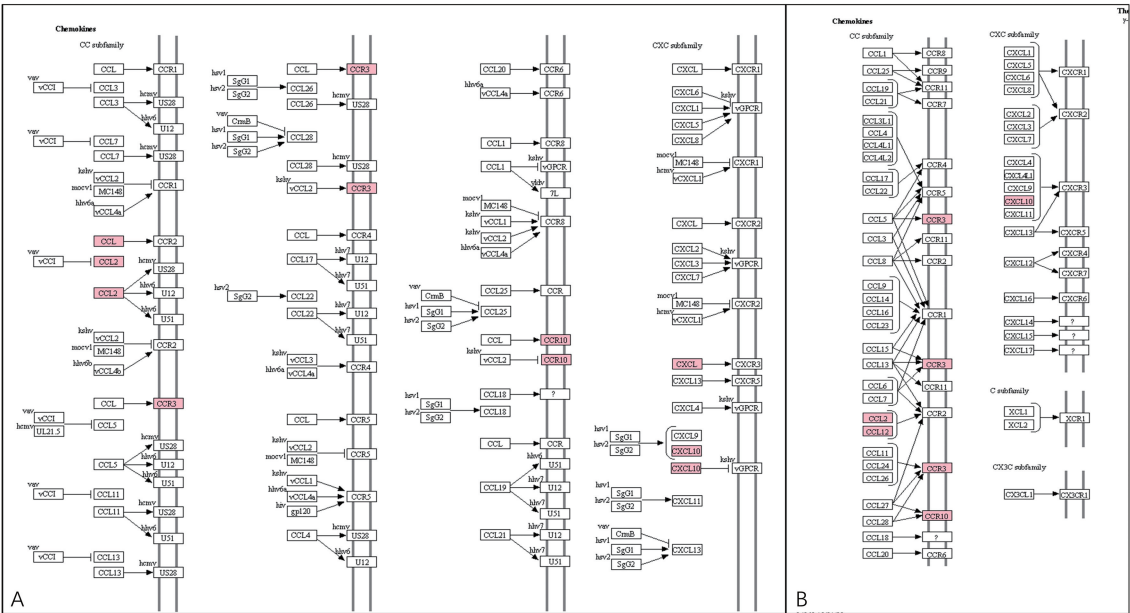
注:A. 节点代表蛋白质,节点之间的线条表示蛋白质之间的连接程度(红色为上调基因,绿色为下调基因,B图同);B. 通过 Cytoscape 中的 MCODE 模块分析得到 16 个节点(Degree cut-off=2,node score cut-off=0.2,k-core=2,and max. Depth=100);C. 通过 CytoHubba 插件分析得到 10 个 Hub 基因互作网络,颜色由红到黄表明基因得分由高到低。

图 3 差异基因 PPI 网络构建及 MCC 算法和 Hub 基因筛选结果

2.4 10 个 Hub 基因重新富集分析 为了进一步了解 10 个 DEGs 可能涉及的通路途径及参与的生物学功能,再次使用 DAVID 数据库进行了 KEGG 分析,然后使用 KEGG Mapper (<https://www.kegg.jp/kegg/mapper/>)进行验证。结果显示,4 个基因(CXCL10、CCR3、CCR10、CCL2)显著富集于趋化因子信号通路和细胞因子-细胞因子受体相互作用途径中,见图 4。

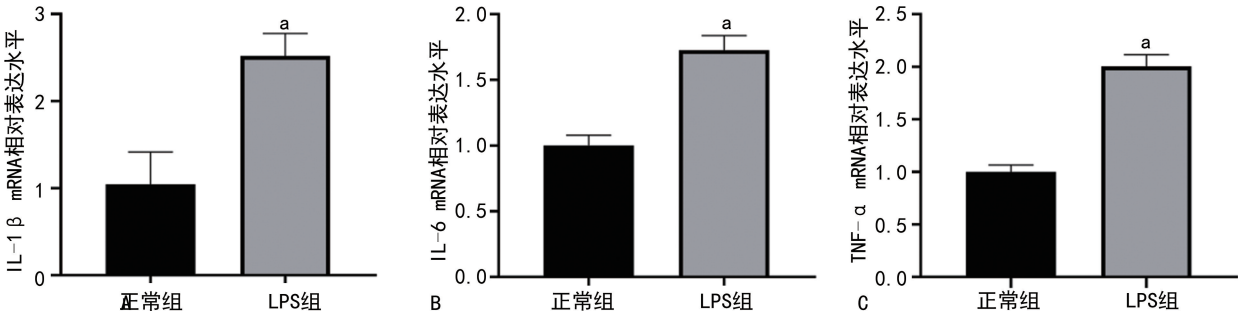
2.5 各组炎症细胞因子 mRNA 表达水平比较 通过 RT-qPCR 可知,与正常组比较,LPS 组 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α mRNA 表达均明显增加,差异均有统计学意义($P<0.01$),见图 5。

2.6 各组细胞趋化因子 mRNA 表达水平比较 与正常组相比,LPS 组趋化因子 CXCL10、CCR9/10 和 CCL2 表达水平明显上调,差异有统计学意义($P<0.01$),见图 6。



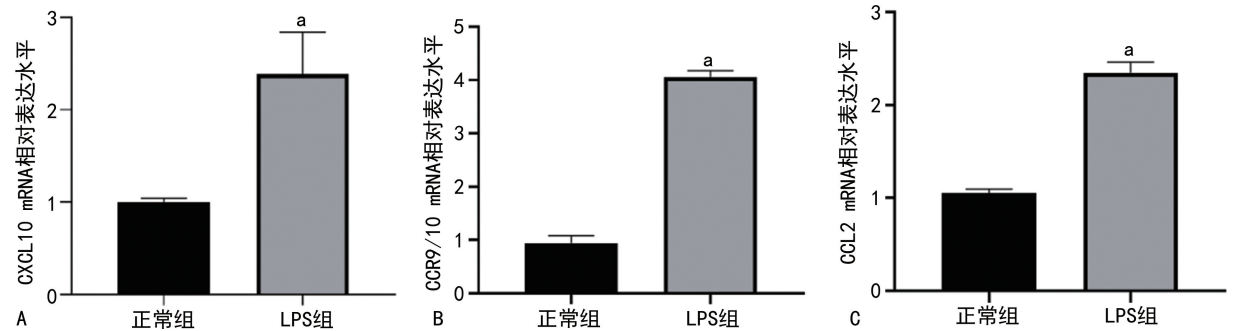
注:A. 趋化因子信号通路;B. 细胞因子-细胞因子受体相互作用。

图 4 通过数据库再次对 10 个 Hub 基因进行 KEGG 分析



注:A. IL-1 β 相对表达水平;B. IL-6 相对表达水平;C. TNF- α 相对表达水平;与正常组比较, $^aP<0.01$ 。

图 5 各组 BV2 细胞中 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α mRNA 表达情况



注:A. CXCL10 相对表达水平;B. CCR9/10 相对表达水平;C. CCL2 相对表达水平;与正常组比较, $^aP<0.01$ 。

图 6 各组 BV2 细胞中 CXCL10、CCR9/10 和 CCL2 mRNA 表达情况

3 讨 论

脊髓损伤是最具致残性的神经系统疾病之一,主要由交通事故、跌倒或暴力等外伤造成^[15]。脊髓损伤不仅会导致不可逆转的神经功能障碍,还会引起多系统并发症,严重影响患者的生活质量^[16]。脊髓损伤后机体产生的炎症反应、水肿、缺血、凋亡、自由基和脂质过氧化、轴突再生抑制等可导致继发性损伤^[17]。继发性损伤中主要是小胶质细胞和星形胶质细胞被激活后释放大量致炎性细胞因子,如 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、诱导型一氧化氮合酶(iNOS)和环氧化酶(COX-2)等^[18-19]。这些致炎性细胞因子促进神经元损伤,使脊髓损伤进一步加重^[20]。由于神经元再生能力有限,脊髓损伤后的再生修复能力极其微弱,虽然现在临床上有多种治疗途径,但目前尚无有效的临床治疗措施来完全修复神经功能^[21],因此脊髓损伤再生修复研究成为当今医学界难题。然而针对脊髓损伤后相关分子机制的研究,一方面可以加强人们对脊髓损伤发展机制的认识,同时也可临床治疗提供新的思路。因此,本研究通过对脊髓损伤后第 2 天和第 5 天的基因数据进行分析,得到了 340 个 DEGs 进行 GO 和 KEGG 富集分析,并对 Hub 分值在前 2 位及 CCL2 的 DEGs 进行体外细胞炎症模型分析,结果发现,LPS 激活的 BV2 细胞中趋化因子 CXCL10、CCR9/10 和 CCL2 表达水平明显增高。因此,降低上述趋化因子的表达可能是治疗神经退行性疾病的有效途径。

GO 和 KEGG 富集结果表明,脊髓损伤后第 2 天和第 5 天差异基因主要分布在胞外区、细胞质膜表面,与氧化还原、蛋白质磷酸化、炎症反应和物质代谢有关。通过对 PPI 网络分析,得到 10 个 Hub 基因: CXCL10、CCR3、CCR10、GNAT3、OPRD1、P2RY12、RLN3、TAS1R2、GPSM2 和 CCL2。其中 CXCL10、CCR3、CCR10 和 CCL2 基因主要在炎症免疫反应方面发挥作用^[22-24],然而这些分子的调控机制尚不清楚。有研究发现,CXCL10、CCR3、CCR10 属于趋化因子超家族蛋白,在参与神经炎症反应方面起到重要调节作用^[25-28]。因此,本研究的 Hub 基因筛选结果为继发性脊髓损伤诱发的神经炎症反应提供了新的研究思路。

趋化因子是由免疫或非免疫细胞分泌的小分子蛋白多肽,在炎性细胞因子、生长因子及病理刺激因素诱导分泌,相对分子质量为 $8 \times 10^3 \sim 12 \times 10^3$,其在炎症疾病、伤口愈合、白细胞的稳定等过程中起重要作用^[29-30]。根据 N 末端 2 个半胱氨酸的位置关系分为 C、CC、CX3C 和 CXC 等 4 种不同的亚型。对受体而言,根据所结合的配体类型的不同分为 4 种,即 C 类受体(CR)、CC 类受体(CCR)、CX3C 受体(CX3CR)和 CXC 类受体(CXCR)。趋化因子受体可表达于神经细

胞、内皮细胞等多种类型的细胞^[31]。趋化因子通过结合并激活受体参与细胞的炎症、分化、凋亡等多种生理功能^[32]。有研究发现,趋化因子受体可以结合自身配体外的其他趋化因子配体,因此在一定程度上增加了配体和受体的结合概率,从而促进疾病的发生发展^[33]。CCR3 是表达于嗜酸性粒细胞膜上的一种受体蛋白,损伤部位的嗜酸性粒细胞激活后上调 CCR3 并且促进多种炎症介质的释放,从而介导炎症反应^[34]。CCR9/CXCL10 信号在小胶质细胞招募和神经元重组中至关重要^[35]。脊髓损伤后,CXCL10 能够诱导细胞外信号调节激酶(ERK1/2)的激活,从而激活细胞内炎症信号通路,使炎症介质表达上调^[36]。CCL2 是神经损伤后释放的一种损害性因子,主要参与局部炎症反应^[37]。因此,趋化因子 CXCL10、CCR3、CCR10 和 CCL2 表达下调是降低脊髓损伤诱发神经炎症反应的重要途径之一。

为了补充脊髓损伤过程中差异基因筛选中的不足,本研究使用 LPS 激活 BV2 小胶质细胞,检测促炎性细胞因子 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 的表达水平,建立神经炎症体外模型,进而验证 Hub 基因得分最高的 CXCL10 和 CCR9/10 基因表达情况。结果显示,炎症细胞模型中,趋化因子表达水平明显上调,提示趋化因子水平增高可能是脊髓损伤发展的促进因素。本研究结果显示,LPS 激活后,BV2 小胶质细胞趋化因子 CXCL10、CCR9/10 和 CCL2 表达明显上调。但本研究筛选出的 DEGs 中,CXCL10、CCR9/10 和 CCL2 对于脊髓损伤后 Day2 组而言,Day5 组的表达下调。可能的原因有:(1)筛选的差异基因来自体内,体内的分子调控更为复杂,可能会利用自身的修复能力使其表达相对下调;(2)下调仅相对于 Day2 组而言,总体 CXCL10、CCR9/10 和 CCL2 应表达上调;(3)中枢神经损伤部位大多数细胞已受损或功能下降,致使细胞合成和分泌促炎症介质的能力相对下降;(4)脊髓损伤后,体内可能有抑制 CXCL10、CCR9/10 和 CCL2 基因转录和翻译的蛋白存在。综上,趋化因子 CXCL10、CCR3、CCR10 和 CCL2 等基因在脊髓损伤发展机制中有着重要的作用,然而由于趋化因子家族亚类繁多,其在脊髓损伤中的具体作用机制仍不完全清楚,但本研究结果为脊髓损伤机制的探究提供了新的方向,有助于发现脊髓损伤新的治疗靶点。相关研究表明,CXCL10、CCR9/10 参与了脊髓损伤后的炎症反应,从而可以促进继发性脊髓损伤,加重神经元的损伤和死亡^[22,34-35]。但趋化因子在脊髓损伤发展过程中可能发挥重要的作用,其具体机制仍有待进一步的研究。

综上所述,本研究通过生物信息学综合分析了脊髓损伤过程中 2 个时间段的基因芯片数据,成功预测了

CXCL10、CCR3、CCR10、GNAT3、OPRD1、P2RY12、RLN3、TAS1R2、GPM2 和 CCL2 有可能在脊髓损伤发展机制中产生重要作用,同时也通过 KEGG 预测到趋化因子信号通路和细胞因子-细胞因子受体相互作用等可能与脊髓损伤发展机制关系密切,为脊髓损伤分子机制的研究提供了生物信息学支持。此外,体外研究发现,LPS 刺激的 BV2 细胞 CXCL10、CCR9/10 和 CCL2 表达水平明显升高,提示趋化因子介导了 BV2 细胞炎症反应。当然,关于这些分子的具体机制,仍需要在原代小胶质细胞和体内实验进行验证,这样才能为脊髓损伤发展机制的认识提供更有力的证据。

参考文献

- [1] ZHENG Y, MAO Y R, YUAN T F, et al. Multimodal treatment for spinal cord injury: A sword of neuroregeneration upon neuromodulation[J]. *Neural Regen Res*, 2020, 15(8): 1437-1450.
- [2] GRAU J W, HUIE J R, LEE K H, et al. Metaplasticity and behavior: How training and inflammation affect plastic potential within the spinal cord and recovery after injury[J]. *Front Neural Circuits*, 2014, 8: 100.
- [3] 张志强, 杨怀洁, 张桂青. 脊髓损伤药物治疗的研究现状[J]. *中国医药指南*, 2012, 10(12): 401-403.
- [4] YANG W C, YANG Y, YANG J Y, et al. Treatment with bone marrow mesenchymal stem cells combined with plumbagin alleviates spinal cord injury by affecting oxidative stress, inflammation, apoptosis and the activation of the Nrf2 pathway[J]. *Int J Mol Med*, 2016, 37(4): 1075-1082.
- [5] JEONG J W, LEE W S, SHIN S C, et al. Anthocyanins downregulate lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in BV2 microglial cells by suppressing the NF- κ B and Akt/MAPKs signaling pathways[J]. *Int J Mol Sci*, 2013, 14(1): 1502-1515.
- [6] REGEN F, HELLMANN R J, COSTANTINI E, et al. Neuroinflammation and Alzheimer's disease: Implications for microglial activation[J]. *Curr Alzheimer Res*, 2017, 14(11): 1140-1148.
- [7] DE N D. Toll-like receptors: Activation, signaling and transcriptional modulation[J]. *Cytokine*, 2015, 74(2): 181-189.
- [8] KUCHARCZAK J, SIMMONS M, FAN Y, et al. To be, or not to be: NF-kappaB is the answer: Role of Rel/NF-kappaB in the regulation of apoptosis[J]. *Oncogene*, 2003, 22(56): 8961-8982.
- [9] 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.
- [10] ZHANG X, ZHANG W, JIANG Y, et al. Identification of functional lncRNAs in gastric cancer by integrative analysis of GEO and TCGA data[J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(10): 17898-17911.
- [11] HUANG D W, SHERMAN B T, LEMPICKI R A. Bioinformatics enrichment tools: Paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists[J]. *Nucleic Acids Res*, 2009, 37(1): 1-13.
- [12] TANABE M, KANEHISA M. Using the KEGG database resource [J]. *Current Protocols in Bioinformatics*, 2012, 38(1): 1.12.1-1.12.43.
- [13] SZKLARCZYK D, MORRIS J H, COOK H, et al. The STRING database in 2017: Quality-controlled protein-protein association networks, made broadly accessible[J]. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45(D1): D362-D368.
- [14] 王俊力, 邵卫, 杨运, 等. 脂多糖通过 TLR4-MyD88 信号通路诱导 BV2 小胶质细胞激活模型的建立[J]. *华中科技大学学报(医学版)*, 2020, 49(1): 45-49.
- [15] ASHAMMAKHI N, KIM H J, EHSANIPOUR A, et al. Regenerative therapies for spinal cord injury[J]. *Tissue Eng Part B Rev*, 2019, 25(6): 471-491.
- [16] ALIZADEH A, DYCK S M, KARIMI A S. Traumatic spinal cord injury: An overview of pathophysiology, models and acute injury mechanisms[J]. *Front Neurol*, 2019, 10: 282.
- [17] AHUJA C S, WILSON J R, NORI S, et al. Traumatic spinal cord injury[J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2017, 27(3): 17018.
- [18] LIU S, CHEN Z. Employing endogenous NSCs to promote recovery of spinal cord injury[J]. *Stem Cells Int*, 2019, 2019: 1958631.
- [19] LI Z W, LI J J, WANG L, et al. Epidermal growth factor receptor inhibitor ameliorates

- excessive astrogliosis and improves the regeneration microenvironment and functional recovery in adult rats following spinal cord injury[J]. *J Neuroinflammation*, 2014, 11:71.
- [20] LIDDELOW S A, GUTTENPLAN K A, CLARKE L E, et al. Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia[J]. *Nature*, 2017, 541(7638):481-487.
- [21] 田婷, 李晓光. 脊髓损伤再生修复中的问题与挑战[J]. *中国组织工程研究*, 2021, 25(19):3039-3048.
- [22] QIN Y, SUN X, SHAO X, et al. Macrophage-microglia networks drive M1 microglia polarization after mycobacterium infection[J]. *Inflammation*, 2015, 38(4):1609-1616.
- [23] KOPER O M, KAMIŃSKA J, SAWICKI K, et al. CXCL9, CXCL10, CXCL11, and their receptor (CXCR3) in neuroinflammation and neurodegeneration[J]. *Adv Clin Exp Med*, 2018, 27(6):849-856.
- [24] XU J W, DONG H Q, QIAN Q Q, et al. Astrocyte-derived CCL2 participates in surgery-induced cognitive dysfunction and neuroinflammation via evoking microglia activation[J]. *Behav Brain Res*, 2017, 332:145-153.
- [25] MOGHADAM A A, KHORRAMDELAZAD H, HASSANSHAHI G, et al. Eotaxins and C-C chemokine receptor type 3 in Parkinson's disease[J]. *Acta Neurol Belg*, 2020, 120(3):589-594.
- [26] ZHU C, XU B, SUN X, et al. Targeting CCR3 to reduce amyloid- β production, tau hyperphosphorylation, and synaptic loss in a mouse model of Alzheimer's disease[J]. *Mol Neurobiol*, 2017, 54(10):7964-7978.
- [27] YAO K, GRAHAM J, AKAHATA Y, et al. Mechanism of neuroinflammation: Enhanced cytotoxicity and IL-17 production via CD46 binding[J]. *J Neuroimmune Pharmacol*, 2010, 5(3):469-478.
- [28] LIBA Z, NOHEJLOVA H, CAPEK V, et al. Utility of chemokines CCL2, CXCL8/10 and 13 and interleukin 6 in the pediatric cohort for the recognition of neuroinflammation and in the context of traditional cerebrospinal fluid neuroinflammatory biomarkers[J]. *PLoS One*, 2019, 14(7):e0219987.
- [29] LEGLER D F, THELEN M. Chemokines: Chemistry, biochemistry and biological function[J]. *Chimia(Aarau)*, 2016, 70(12):856-859.
- [30] WU X S, LONSDORF A S, HWANG S T. Cutaneous T-cell lymphoma: Roles for chemokines and chemokine receptors[J]. *J Invest Dermatol*, 2009, 129(5):1115-1119.
- [31] ALLEGRETTI M, CESTA M C, GARIN A, et al. Current status of chemokine receptor inhibitors in development[J]. *Immunol Lett*, 2012, 145(1/2):68-78.
- [32] MILLER M C, MAYO K H. Chemokines from a structural perspective[J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(10):2088.
- [33] BENDALL L. Chemokines and their receptors in disease[J]. *Histol Histopathol*, 2005, 20(3):907-926.
- [34] HINKAI A, KOMUTA K M, SATO N N, et al. N-terminal domain of eotaxin-3 is important for activation of CC chemokine receptor 3[J]. *Protein Eng*, 2012, 15(11):923-929.
- [35] LI H, GANG Z, YU H, et al. Different neurotropic pathogens elicit neurotoxic CCR9-or neurosupportive CXCR3-expressing microglia[J]. *J Immunol*, 2006, 177(6):3644-3656.
- [36] XIA M Q, BACSKAI B J, KNOWLES R B, et al. Expression of the chemokine receptor CXCR3 on neurons and the elevated expression of its ligand IP-10 in reactive astrocytes: In vitro ERK1/2 activation and role in Alzheimer's disease[J]. *J Neuroimmunol*, 2000, 108(1/2):227-235.
- [37] NORDEN D M, FAW T D, MCKIM D B, et al. Bone marrow-derived monocytes drive the inflammatory microenvironment in local and remote regions after thoracic spinal cord injury[J]. *J Neurotrauma*, 2019, 36(6):937-949.

(收稿日期:2022-09-21 修回日期:2023-01-10)