

·数字中医药·

本文引用:唐丽亚,瞿启睿,吴霞,龙轶映,许明,张泓,刘琼,艾坤,周璐.T10脊髓损伤后T10~L2脊髓组织中差异表达蛋白的生物信息学分析[J].湖南中医药大学学报,2022,42(8):1289-1299.

# T10脊髓损伤后T10~L2脊髓组织中差异表达蛋白的生物信息学分析

唐丽亚<sup>1</sup>,瞿启睿<sup>1</sup>,吴霞<sup>2</sup>,龙轶映<sup>1</sup>,许明<sup>1</sup>,张泓<sup>1</sup>,刘琼<sup>1</sup>,艾坤<sup>1\*</sup>,周璐<sup>3\*</sup>

(1.湖南中医药大学,湖南长沙410208;2.长沙医学院,湖南长沙410219;3.郴州市第一人民医院,湖南郴州423000)

**[摘要]** **目的** 利用TMT标记定量蛋白质组学技术筛选出T10脊髓损伤后T10~L2脊髓组织的差异表达蛋白(differentially expressed proteins, DEPs)并对其进行生物信息学分析,以期挖掘出T10脊髓损伤后膀胱颈功能障碍(bladder neck dysfunction, BND)的潜在治疗靶点。**方法** 40只大鼠采用随机数字表法分为假手术组(12只)和造模组(28)只,造模组28只大鼠采用Hassan Shaker脊髓横断法制备T10脊髓损伤模型,从符合要求的模型大鼠中随机抽取12只作为模型组。所有大鼠行尿流动力学检测和HE染色,采用TMT检测出T10~L2脊髓组织中表达的蛋白质,将差异倍数(fold change, FC)>1.2或<1/1.2、 $P<0.05$ 、unique peptide $\geq 2$ 的蛋白质定义为DEPs,使用KOBAS 3.0对DEPs进行京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)通路富集分析。利用STRING及Cytoscape软件构建蛋白质-蛋白质相互作用(protein-protein interaction, PPI)网络,利用cytoHubba插件及DEPs的度(Degree)值筛选出排名前35位的关键DEPs,并通过GluGO插件对35个关键DEPs所参与的生物过程进行分析。**结果** 与假手术组相比,模型组大鼠漏尿点压力和最大膀胱容量明显增大( $P<0.01$ );HE染色结果显示,模型组膀胱颈组织中出现炎细胞浸润,平滑肌壁增厚;模型组T10~L2脊髓组织出现神经元崩解,坏死后空洞形成,神经胶质细胞增生。TMT结果显示,在T10~L2脊髓组织中共筛选出了151个DEPs,其中84个蛋白上调、67个蛋白下调;KEGG分析发现151个DEPs,主要参与趋化因子信号通路、NOD-样受体信号通路、细胞坏死、细胞凋亡、多巴胺能神经突触和谷氨酸能突触等16条信号通路。35个关键DEPs主要参与了巨噬细胞活化、神经胶质细胞的激活、小胶质细胞的激活和神经炎症反应等生物过程。**结论** T10脊髓损伤后,T10~L2脊髓组织中C1qa、Clu、Snca、Pycard、Glul、Capn1、Ctsz和Ctsd可能是降低脊髓继发性损伤风险的潜在治疗靶点;T10~L2脊髓组织中多巴胺能突触和谷氨酸能突触信号途径可能成为治疗T10脊髓损伤后BND的新方向。

**[关键词]** 脊髓损伤;T10~L2脊髓组织;膀胱颈功能障碍;TMT标记定量蛋白质组学;生物信息学;差异表达蛋白;多巴胺能突触;谷氨酸能突触

[中图分类号]R745;R285

[文献标志码]A

[文章编号]doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2022.08.011

## Bioinformatics analysis of differentially expressed proteins in T10~L2 spinal cord tissue after T10 spinal cord injury

TANG Liya<sup>1</sup>, QU Qirui<sup>1</sup>, WU Xia<sup>2</sup>, LONG Yiyi<sup>1</sup>, XU Ming<sup>1</sup>, ZHANG Hong<sup>1</sup>, LIU Qiong<sup>1</sup>, AI Kun<sup>1\*</sup>, ZHOU Lu<sup>3\*</sup>

(1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. Changsha Medical College, Changsha, Hunan 410219, China; 3. Chenzhou First People's Hospital, Chenzhou, Hunan 423000, China)

**[Abstract]** **Objective** Differentially expressed proteins (DEPs) in T10-L2 spinal cord tissue after spinal cord injury were screened by TMT labeled quantitative proteomics technique and bioinformatic analysis was performed on them, to discover potential

[收稿日期]2022-05-30

[基金项目]国家自然科学基金面上项目(81874510);湖南省自然科学基金项目(2022JJ30036, 2022JJ40312, 2022JJ40301);湖南省教育厅一般项目(20C1432);湖南省教育厅科学研究青年项目(21B0369)。

[第一作者]唐丽亚,女,硕士研究生,研究方向:神经系统疾病的中西医结合康复机制与临床研究。

[通信作者]\*艾坤,男,硕士,教授,硕士研究生导师,E-mail:aikun650@qq.com;周璐,女,硕士,副主任医师,E-mail:3263793@qq.com。

therapeutic targets for bladder neck dysfunction (BND) after SCI. **Methods** Forty rats were randomly divided into sham operation group ( $n=12$ ) and model group ( $n=28$ ) by random number table method. In the model group, 28 rats were used to prepare T10 spinal cord injury model by Hassan Shaker spinal cord transection method, then 12 model rats were randomly selected from the rats meeting the requirements of the model as the model group. All rats underwent urodynamics detection and HE staining. The proteins expressed in T10-L2 spinal cord were detected by TMT. DEPs were defined as proteins with fold change (FC)  $>1.2$  or  $<1/1.2$ ,  $P<0.05$  and unique peptide  $\geq 2$ . The DEPs were subjected to Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) pathway enrichment analysis using KOBAS3.0. The protein-protein interaction (PPI) network was constructed using the STRING and Cytoscape software. The cytoHubba plug-in and the Degree value of DEPs were used to screen the top 35 key DEPs, and the biological processes involved in the 35 key DEPs were analyzed by GluGO plug-in. **Results** Compared with the sham operation group, the leak point pressure and maximum cystometric volume in the model group were significantly higher ( $P<0.01$ ). HE staining showed that infiltration of inflammatory cells and thickening of smooth muscle were occurred in bladder neck of the model group. Neuronal disintegration cavity formation after necrosis, and proliferation of glial cells were appeared in T10-L2 spinal cord of model group. The TMT results showed that, 151 DEPs were screened in T10-L2 spinal cord, where 84 DEPs were up-regulated and 63 were down regulated. KEGG analysis found that 151 DEPs were mainly involved in 16 signaling pathways including chemokine signaling pathway, NOD-like receptor signaling pathway, necroptosis, apoptosis, dopaminergic synapse, glutamatergic synapse and etc. The 35 DEPs were mainly involved in biological processes such as macrophage activation, glial cell activation, microglia activation, neuroinflammatory response. **Conclusion** After T10 spinal cord injury, C1qa, Clu, Snca, Pycard, Glul, Capn1, Ctsz and Ctsd may be potential therapeutic targets to reduce the risk of secondary spinal cord injury. Dopaminergic synapse and glutamatergic synapse signaling pathway in spinal cord tissue may become new directions for the treatment of BND after T10 SCI.

[**Keywords**] spinal cord injury; T10-L2 spinal cord tissue; bladder neck dysfunction; TMT labeled quantitative proteomics; bioinformatics; differentially expressed protein; dopaminergic synapse; glutamatergic synapse

神经源性膀胱(neurogenic bladder, NB)是脊髓损伤后常见的并发症之一<sup>[1]</sup>。膀胱正常的排尿反射由脊髓的交感神经区(T10~L2 脊髓节段)、副交感神经区(S2~S4 脊髓节段)和脑桥等高级中枢共同控制。脊髓损伤后由于炎症反应、胶质细胞增生和氧化应激等继发性损伤,导致神经组织损伤范围进一步扩大,出现胶质瘢痕增生和轴突再生障碍。T10 及以上脊髓损伤后,支配膀胱的交感神经失去脑桥等高级排尿中枢的控制而出现过度兴奋,其支配的膀胱括约肌(膀胱颈)过度收缩,最终导致膀胱颈梗阻和膀胱排尿障碍<sup>[2]</sup>,继而引起尿液反流和肾功能损伤等一系列泌尿系统问题<sup>[3-4]</sup>。

因此,减轻脊髓损伤后的继发性损伤,保护神经组织,抑制 T10~L2 脊髓节段交感神经区过度兴奋是治疗脊髓损伤后膀胱颈功能障碍(bladder neck dysfunction, BND)的重要思路之一。目前,临床上主要通过膀胱颈切开术和注射  $\alpha$  受体阻滞剂来治疗 BND,虽然取得一定疗效,但依然存在术后并发症、药物毒副作用等缺陷<sup>[5-6]</sup>。因此,从 T10~L2 脊髓节段寻找其他潜在的干预靶点来指导治疗脊髓损伤后

BND,其临床意义尤为重要。

TMT 标记定量蛋白质组学技术能更全面地检测出组织中表达的蛋白质,这也为蛋白质组学的应用实现高灵敏度和高深度的蛋白质组覆盖<sup>[7]</sup>。通过筛选目标组织中的差异表达蛋白(differentially expressed proteins, DEPs),并对 DEPs 进行生物信息学分析,重点探讨潜在的关键靶点蛋白,能从多个角度探讨疾病的病理机制<sup>[8]</sup>,有助于挖掘出疾病潜在的临床干预靶点。

本研究通过横断T10 脊髓节段制备脊髓损伤后 BND 模型<sup>[9]</sup>,使用 TMT 标记定量蛋白质组学技术检测 T10~L2 脊髓节段的 DEPs,再对这些 DEPs 进行生物信息学分析,从而寻找新的生物标志物来指导治疗脊髓损伤后 BND。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物与分组

健康成年雌性 SD 大鼠 40 只,体质量 250~280 g,由湖南中医药大学动物实验中心提供,合格证编号:1107271911006889。标准条件下(温度 24~26 °C,湿度

50%~70%)分笼饲养于湖南中医药大学动物中心实验室,适应性喂养1周。40只大鼠采用随机数字表法分为假手术组(12只)和造模组(28只),造模组大鼠采用 Hassan Shaker 脊髓横断法<sup>[9]</sup>制备 T10 脊髓损伤模型,脊髓休克期过后共存活 25 只,其中 13 只模型组大鼠出现尿潴留,采用随机数字表法抽取 12 只纳入模型组。

### 1.2 主要试剂与仪器

水合氯醛(国药集团化学试剂有限公司,批号:20131031);青霉素钠(哈药集团有限公司,80万U/支,批号:H23021600);胰蛋白酶(上海嵘崑达科技公司,批号:11047841001);蛋白酶抑制剂(上海嵘崑达科技公司,批号:10109878001);BCA 蛋白质定量试剂盒(美国 Thermo Scientific 公司,批号:QB214754);TMT10plex™ 同量异序质量标签试剂盒(美国 Thermo Scientific 公司,批号:90113CH);碘乙酰胺(美国 SIGMA-ALDRICH 公司,批号:11149);无水乙腈(美国 SIGMA-ALDRICH 公司,批号:271004)。

MP-150 多通道生理记录仪(美国 BIOPAC 公司,型号:MP150-WSW);微量注射泵(浙江史密斯医学仪器有限公司,型号:WZ-50C6);Q Exactive 质谱仪(美国 Thermo Scientific 公司,型号:0726090);加热混合器(美国 Thermo Scientific 公司,型号:13687711);酶标仪(美国 Thermo Scientific 公司,型号:1425955)。

### 1.3 动物造模

大鼠造模前 2 h 腹腔注射青霉素钠 20 万 U/只以抗炎。用 10%水合氯醛按 30 mg/kg 腹腔麻醉,大鼠俯卧固定在鼠板上,以 T13 椎体作为骨性标志,往上数至 T8~T9 椎体处备皮、消毒,做 2~3 cm 的纵向切口,切开皮下组织,钝性分离两侧竖脊肌和棘突旁肌肉,暴露 T8 和 T9 的棘突和相邻椎弓。用显微咬骨器咬除 T8 椎板和两侧椎弓根,暴露脊髓,牙科弯钩勾出脊髓,11 号手术刀片横断,多次切断确保脊髓完全横断。缝合肌肉,用 5%聚维酮碘消毒切口及周围,缝合皮肤。

术后将大鼠放置恒温电热毯上直至苏醒,单笼饲养;术后 1 周早晚各 1 次腹腔注射青霉素钠(20 万 U/只);每天早、中、晚定时采用 Crede 手法<sup>[10]</sup>辅助排尿;出现压疮、自残现象者用 5%聚维酮碘消毒并在对应部位撒上青霉素粉。

对动物模型进行后肢运动功能评估(后肢不能参与行走,在前肢行走时处于拖动状态,BBB 评分<sup>[11]</sup>为 0 分)和膀胱排尿功能评估(在脊髓休克期过后,膀胱持续处于尿潴留状态,膀胱胀大明显,不能自主排尿),同时符合这两个条件则造模成功。

假手术组大鼠常规饲养直至尿流动力学检测,期间不做其他处理。

### 1.4 观察指标及检测方法

造模后第 19 天行尿流动力学检查<sup>[12]</sup>,而后断头处死大鼠,取 T10~L2 脊髓组织和膀胱颈备检,取 3 只大鼠的 T10~L2 脊髓组织液氮冷冻用于 TMT 蛋白质组学检测,剩余的膀胱颈组织和 T10~L2 脊髓组织用于 HE 染色。

**1.4.1 尿流动力学检测** 大鼠麻醉后进行膀胱灌注实验,导尿管插入膀胱顶后与膀胱水平放置,设置 MP150 主机压力基线为零。将 F3 导尿管、MP150-WSW 型 16 通道生理记录仪与 WZ-50C6 微量注射泵通过三通管相连接。打开微量注射泵,灌注速度为 6 mL/h,灌注的生理盐水温度为 25~35 ℃。观察并记录膀胱压力曲线的变化和漏尿情况:观察有无尿液从尿道口溢出,大鼠首次出现尿液溢出,此时记录的膀胱压力即为漏尿压(leak point pressure, LPP);最大膀胱容量(maximum cystometric capacity, MCC)则为从开始灌注生理盐水到尿液漏出尿道口所灌注液体的体积。继续灌注出现稳定波形。

**1.4.2 HE 染色** 大鼠腹腔注射 10%水合氯醛麻醉后剪开右心耳,用生理盐水从左心室快速灌注直至流出液体变清透后用 4%多聚甲醛固定,取 T10~L2 脊髓组织和膀胱颈用 4%多聚甲醛 48 h 固定、乙醇梯度脱水、二甲苯透明、浸蜡、包埋、切片、脱蜡、苏木精和伊红染色、脱水和中性树胶封片后,光学显微镜下观察 T10~L2 脊髓和膀胱颈的组织学变化。

### 1.5 TMT 蛋白质组学分析

**1.5.1 蛋白质样品制备** 在 10%水合氯醛麻醉下,提取大鼠 T10~L2 脊髓组织。样品中各加入 1000 μL 工作液(RIPA 裂解液与蛋白酶抑制剂混合,置于冰上预冷,得到工作液)充分混匀,冰浴超声 5 min,充分溶解;14 000 r/min、4 ℃离心 15 min,转移上清至新的 EP 管中;使用 BCA 蛋白测定试剂盒按照说明书要求定量测定蛋白浓度。

1.5.2 TMT 定量标记 每个样品取 100  $\mu\text{L}$  上清液进行还原、烷基化、丙酮沉淀和蛋白重溶,得到相应样品的多肽,吸取 20  $\mu\text{L}$  不同的 TMT 溶液至对应样品中,混匀并离心,室温孵育 1 h 后加入羟氨至 100 mmol/L,室温孵育 15 min 终止反应;将各组标记样品等量混合;去除脱氧胆酸钠(sodium deoxycholate, SDC)后取上清至新 EP 管,得到标记的多肽样品;经过多肽脱盐和 RP-RP 分级和真空干燥后 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冻存,用于 LC-MS/MS 分析。

1.5.3 蛋白质组学数据分析 经过 LC-MS/MS 分析后得到的原始数据使用 MaxQuant(version 1.6.1.0) 进行搜库和 TMT 定量分析,蛋白质数据库为 uniprot\_rattus\_20190711\_iso,多肽和蛋白水平 FDR $<0.01$ 。随后对样品进行标准化,使各组样品总蛋白或中位数一致。将差异倍数(fold change, FC) $>1.2$  或 $<1/1.2$ , $P<0.05$ ,unique peptide $\geq 2$  的蛋白定义为 DEPs,并对 DEPs 进行京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)通路富集分析、蛋白质-蛋白质相互作用(protein-protein interaction, PPI)分析。

### 1.6 DEPs 的生物信息学分析

将 DEPs 对应的基因名导入 kobass 数据库(<http://kobas.cbi.pku.edu.cn/>)<sup>[13]</sup>,选择物种 Rattus norvegicus, $P<0.05$  对 DEPs 进行 KEGG 分析。利用 STRING(<https://string-db.org/>)构建 PPI 网络,下载 tsv 格式的分析结果并导入到 Cytoscape 软件<sup>[14]</sup>,对 PPI 做进一步可视化分析。利用 cytoHubba 插件<sup>[15]</sup>并根据 DEPs 的度(Degree)值筛选出排名前 35 位的关键 DEPs,并通过 GluGO 插件<sup>[16]</sup>对 35 个关键 DEPs 参与的生物过程进行分析。

### 1.7 统计学分析

采用 SPSS 25.0 统计软件进行数据处理。计量资料符合正态分布,以“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,满足正态性和方差齐性用  $t$  检验,不满足则用 Wilcoxon 检验。以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 一般情况

假手术组一般情况良好。模型组大鼠脊髓休克期后后肢随意运动消失,爬行时处于拖动状态;膀胱胀大,可在下腹部触摸到“橄榄型”膀胱;大鼠下腹部

和笼内垫料轻度潮湿,手法排尿时可感觉到尿道口有阻力。

### 2.2 尿流动力学结果

与假手术组相比,模型组 LPP 和 MCC 均明显增高( $P<0.01$ )。详见表 1。

表 1 大鼠膀胱 LPP、MCC 比较( $\bar{x}\pm s$ )

组别	n	LPP/mmHg	MCC/mL
假手术组	12	18.05 $\pm$ 1.64	0.36 $\pm$ 0.08
模型组	12	49.78 $\pm$ 2.68**	4.68 $\pm$ 0.44**

注:与假手术组相比,\*\* $P<0.01$ 。

### 2.3 HE 染色结果

HE 染色显示,假手术组大鼠膀胱颈组织层次清晰,排列整齐紧密,无炎细胞浸润,部分区域有水肿改变;模型组膀胱颈组织中可见大量炎细胞浸润、弹性纤维减少,肌层可见肌纤维增粗、平滑肌壁增厚,详见图 1。假手术组大鼠脊髓组织结构完整、清晰,未见坏死神神经元;模型组脊髓组织结构破坏、排列紊乱,有神经元崩解现象,坏死后空洞增多,神经胶质细胞增生,详见图 2。

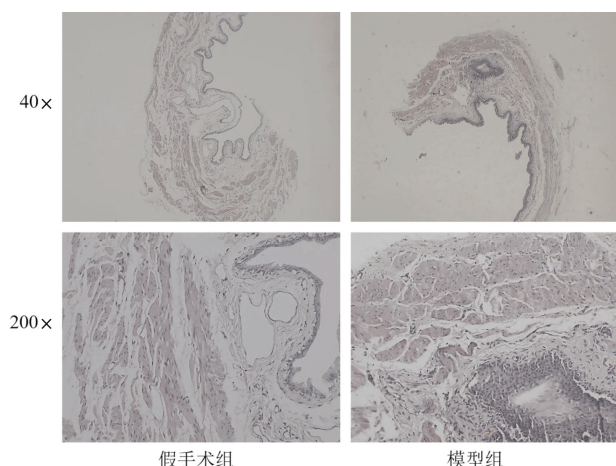


图 1 各组大鼠膀胱颈组织病理形态学比较(HE 染色)

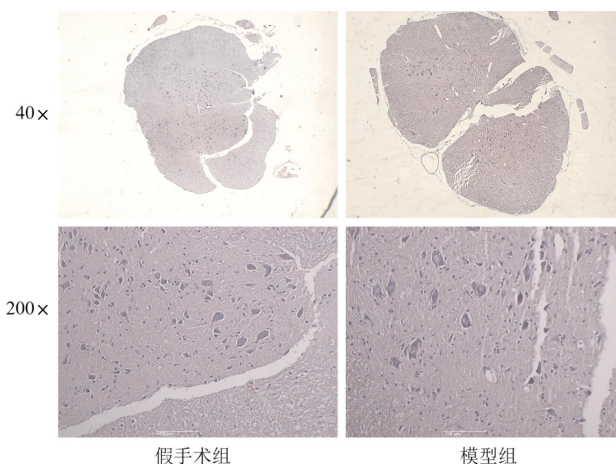


图 2 各组大鼠 T10~L2 脊髓组织病理形态学比较(HE 染色)

### 2.4 脊髓的 TMT 定量蛋白质组学分析

采用 TMT 定量蛋白质组学技术共检测到 47 947 个多肽,6684 个蛋白质,其中有 3439 个可量化的蛋白质。根据  $fc > 1.2$  或  $fc < 1/1.2$ 、 $P < 0.05$ 、unique pep-

ptide  $\geq 2$  筛选出模型组与假手术组中 T10~L2 脊髓组织的 151 个 DEPs, 其中 84 个表达升高、67 个表达下降, 详见图 3A。聚类分析直观地展示了 DEPs 在假手术组和模型组之间的表达, 详见图 3B。

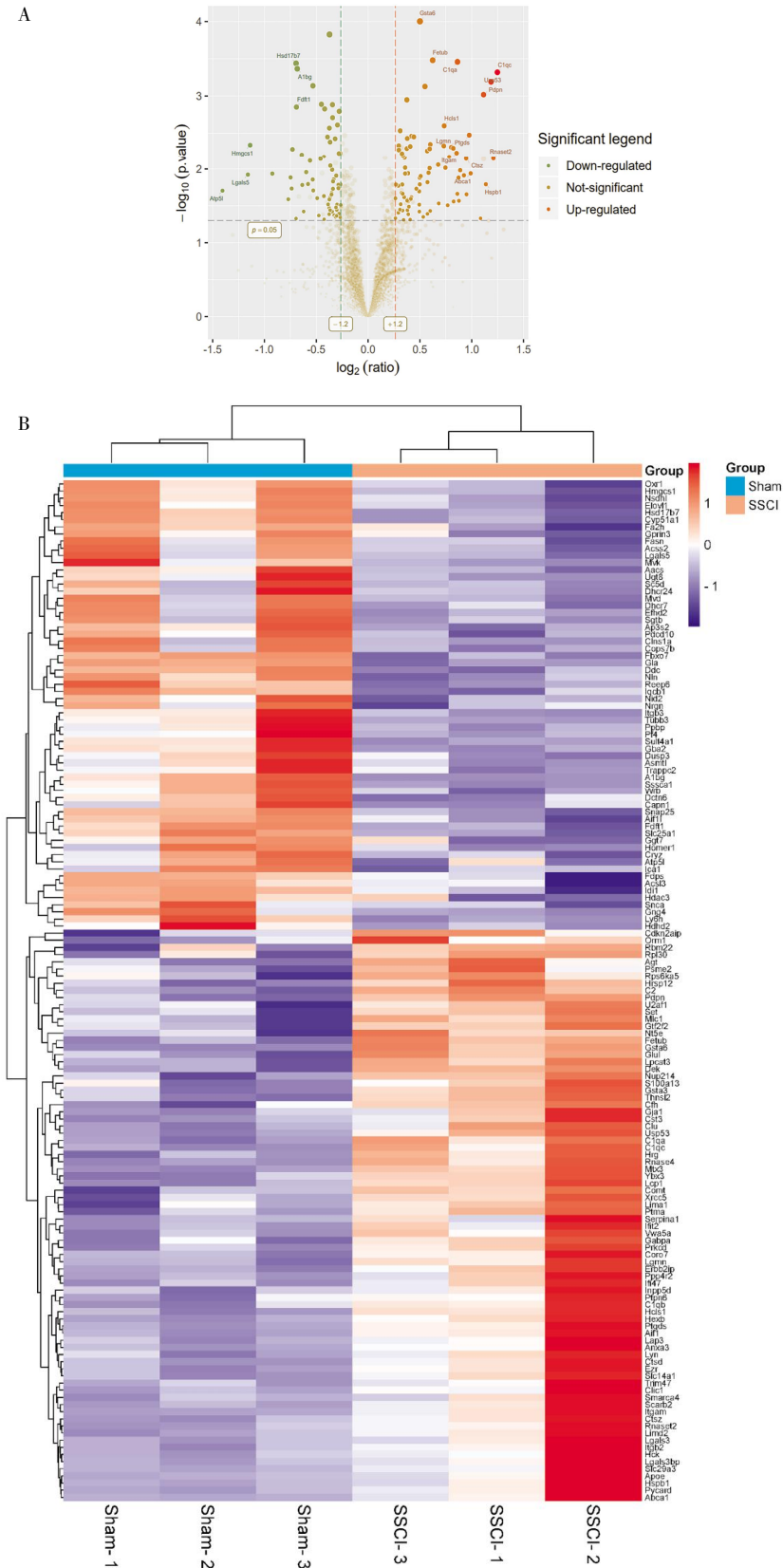


图3 151个差异蛋白表达谱的火山图(A)和聚类分析结果图(B)

注:图 A 中红色代表模型组与假手术组相比上调的 DEPs,绿色代表下调的 DEPs;图 B 中红色代表上调的 DEPs,蓝色代表下调的 DEPs。

## 2.5 DEPs 的生物信息分析

**2.5.1 DEPs 的 KEGG 分析** 使用 KOBAS 3.0 对 151 个 DEPs 行 KEGG 通路富集分析,设置  $P < 0.01$  共筛选出前 16 条 KEGG 通路:肌动蛋白细胞骨架的调节、趋化因子信号通路、NOD-样受体信号通路、细胞坏死、细胞凋亡、多巴胺能神经突触和谷氨酸能突触等。详见图 4、表 2。

**2.5.2 DEPs 的 PPI 网络构建和关键靶点的筛选** 采用 STRING 数据库联合 Cytoscape 软件构建 151 个 DEPs 的 PPI 图。图中每个节点代表一个 DEPs,去除

无相互作用的 DEPs, PPI 图中共有 108 个节点和 332 条边,详见图 5。使用 cytoHubba 插件根据 DEPs 的 Degree 值筛选出前 35 位的关键 DEPs, 详见图 6A、表 3。使用 ClueGO 对 35 个关键 DEPs 参与的生物过程进行分析,发现 35 个关键 DEPs 主要参与了突触修剪、树突细胞分化、5-羟色胺运输、巨噬细胞活化、神经胶质细胞的激活、小胶质细胞的激活、神经炎症反应和活性氧代谢过程的正调控等生物学过程,详见图 6B。

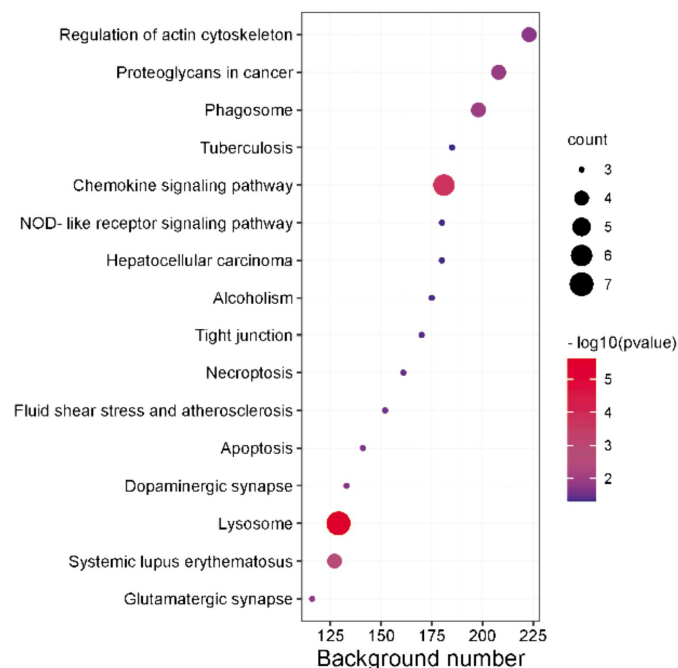


图 4 151 个 DEPs 的 KEGG 通路分析结果

表 2 151 个 DEPs 的 KEGG 通路分析结果

KEGG 通路	中文名称	基因数/个	基因名	$-\log_{10}(P)$
mo04810: Regulation of actin cytoskeleton	肌动蛋白细胞骨架的调节	4	Itgb3, Itgb2, Itgam, Ezr	1.75
mo05205: Proteoglycans in cancer	癌症中的蛋白聚糖	4	Hcls1, Itgb3, Ptpn6, Ezr	1.85
mo04145: Phagosome	吞噬体	4	Itgb3, Itgb2, Itgam, Tubb3	1.9
mo05152: Tuberculosis	结核病	3	Itgb2, Ctsd, Itgam	1.3
mo04062: Chemokine signaling pathway	趋化因子信号通路	6	Gng4, Prkcd, Ppbp, Pf4, Hck, Lyn	3.75
mo04621: NOD-like receptor signaling pathway	NOD-样受体信号通路	3	Pycard, Erbb2ip, Prkcd	1.34
mo05225: Hepatocellular carcinoma	肝细胞癌	3	Gsta6, Smarca4, Gsta3	1.34
mo05034: Alcoholism	酒精中毒	3	Ddc, Gng4, Hdac3	1.37
mo04530: Tight junction	紧密连接	3	Hcls1, Ybx3, Ezr	1.40
mo04217: Necroptosis	细胞坏死	3	Pycard, Glul, Capn1	1.45
mo05418: Fluid shear stress and atherosclerosis	流体剪切应力和动脉粥样硬化	3	Itgb3, Gsta6, Gsta3	1.52
mo04210: Apoptosis	细胞凋亡	3	Ctsz, Ctsd, Capn1	1.60
mo04728: Dopaminergic synapse	多巴胺能突触	3	Ddc, Gng4, Comt	1.66
mo04142: Lysosome	溶酶体	7	Lgmn, Scarb2, Hexb, Ctsd, Ap3s2, Ctsz, Gla	5.63
mo05322: Systemic lupus erythematosus	系统性红斑狼疮	4	C2, C1qc, C1qb, C1qa	2.58
mo04724: Glutamatergic synapse	谷氨酸能突触	3	Homer1, Gng4, Glul	1.81

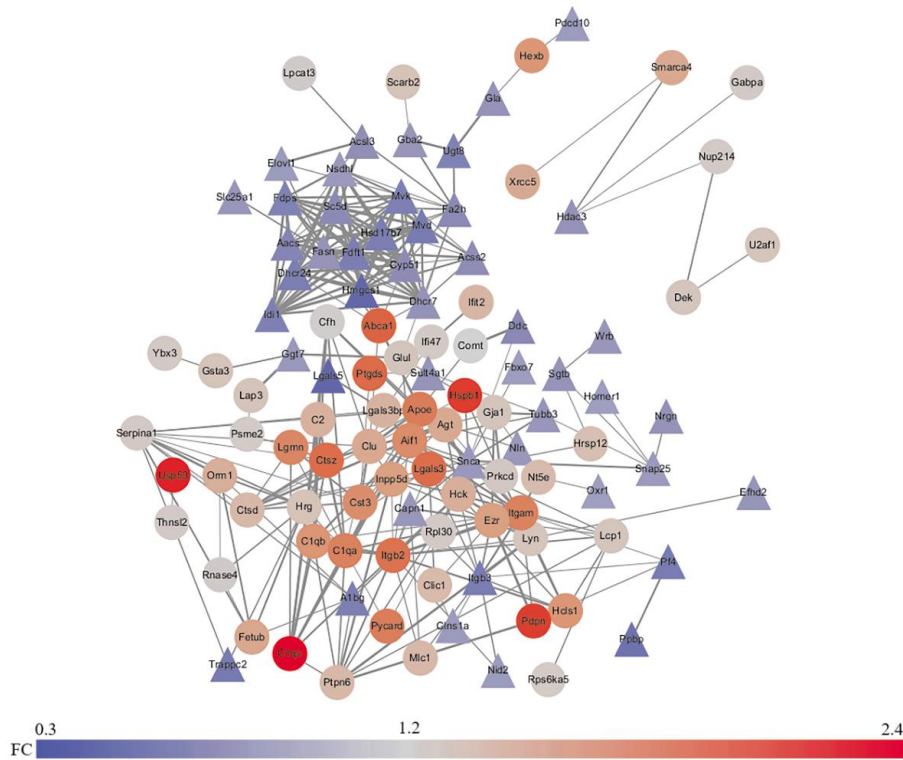


图5 DEPs的PPI图

注：“○”代表上调的DEPs，“△”代表下调的DEPs；线条代表DEPs之间的相互作用程度，线越粗代表DEPs间连接越紧密。

表3 35个关键DEPs的具体信息

蛋白质 ID	基因名	FC 值	P 值	Degree 值
P31721	C1qb	1.68	0.010	7
P05371	Clu	1.52	0.004	7
P31720	C1qa	1.82	0.000	8
P02650	ApoE	1.84	0.027	11
Q07014	Lyn	1.31	0.032	7
Q2LAM0	Fa2h	0.71	0.025	6
G3V9U0	Acss2	0.74	0.023	10
P01015	Agt	1.51	0.005	5
P81718	Ptpn6	1.41	0.038	6
AOA0G2JY31	Serpina1	1.27	0.049	3
P50545	Hck	1.49	0.041	8
Q9JMI1	Aacs	0.68	0.008	13
G3V8L7	Itgam	1.81	0.006	11
Q9EQS5	Sc5d	0.72	0.043	14
Q5BQE6	Dhcr24	0.62	0.047	14
P31977	Ezr	1.60	0.009	4
Q5PPL3	Nsdhl	0.81	0.012	15
Q9Z2Z8	Dhcr7	0.77	0.026	16
P24268	Ctsd	1.41	0.016	5
Q62904	Hsd17b7	0.62	0.000	13
Q64654	Cyp51	0.73	0.001	16
P55009	Aif1	1.74	0.005	9
B2RYB8	Itgb2	1.90	0.012	10
P05369	Fdps	0.65	0.038	14
Q02769	Fdft1	0.62	0.001	16
Q8R2H2	Itgb3	0.60	0.005	5
P17256	Mvk	0.64	0.006	14
P37377	Snea	0.80	0.045	7
AOA0H2UHN2	Idi1	0.64	0.017	14
P12785	Fasn	0.77	0.025	14
Q642E	Mvd	0.60	0.013	14
P08699	Lgals3	1.93	0.022	7
P17425	Hmgcs1	0.45	0.005	15
P31722	C1qc	2.37	0.000	6
F1LNL3	Abca1	1.99	0.011	8

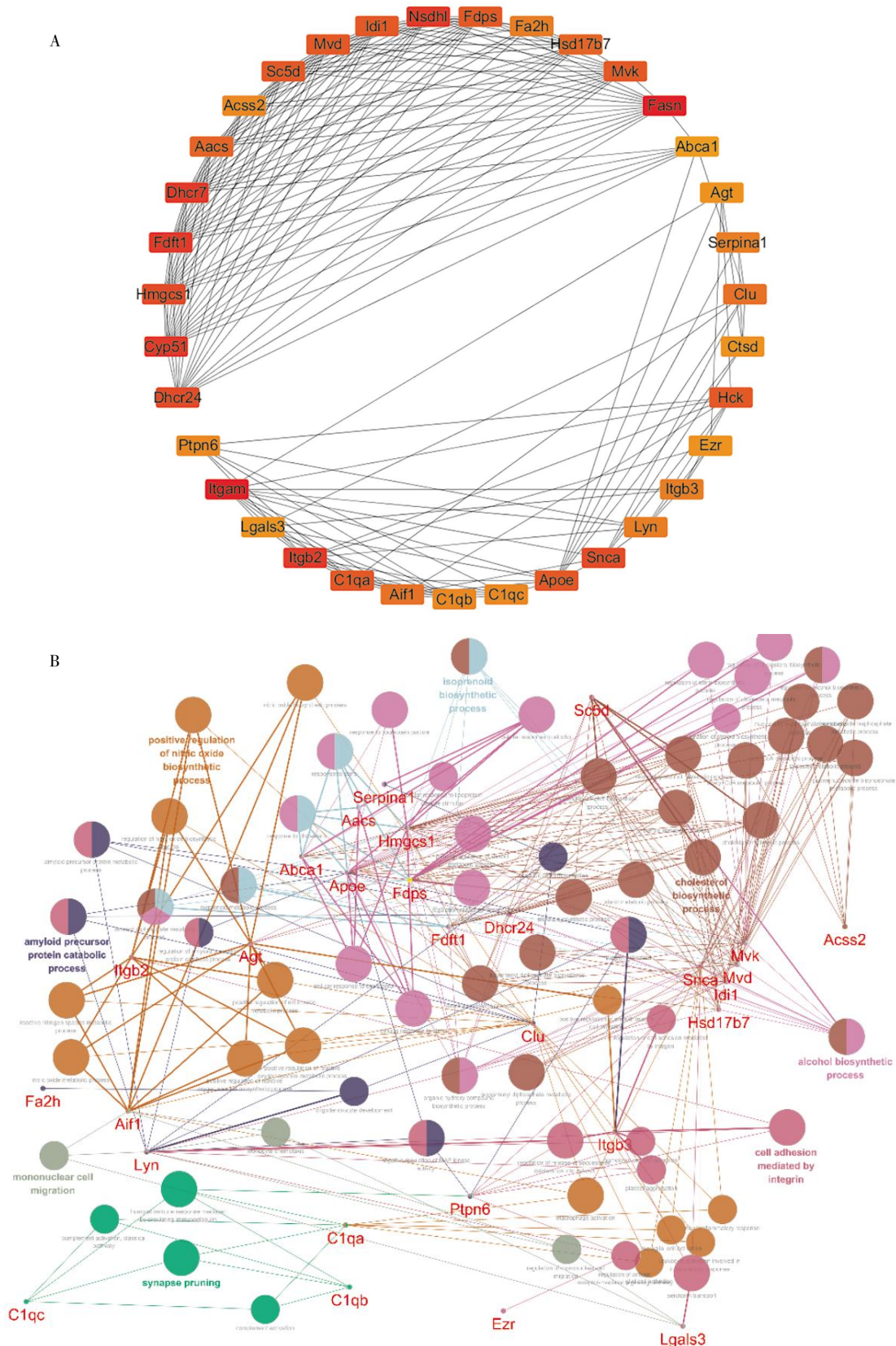


图6 35个关键DEPs的PPI图(A)和参与的生物学过程(B)  
 注:图A中颜色越深代表DEPs的Degree值越大,即DEPs的连通度越大。

### 3 讨论

BND是T10及以上脊髓损伤后临床干预的难点问题<sup>[17]</sup>,其临床最大的危害在于排尿时,由于交感

神经过度兴奋,膀胱括约肌持续收缩,膀胱内压持续升高,最终造成尿液反流和肾功能损伤<sup>[18]</sup>。

由于T10~L2脊髓节段在排尿过程中有重要作用,临床上通常将其作为治疗BND的目标靶位。



因此,本研究团队制备了 T10 脊髓节段横断性损伤后的 BND 大鼠模型,选择 T10~L2 脊髓节段作为本研究的观察对象。

本实验结果显示,模型组大鼠脊髓休克期过后 BBB 评分为 0 分;尿流动力学结果发现,较假手术组相比,模型组大鼠 MCC 和 LPP 均增大( $P<0.01$ );HE 染色结果显示,模型组大鼠 T10~L2 脊髓组织有神经元崩解现象、坏死后空洞增多、神经胶质细胞增生,模型组大鼠膀胱颈组织大量炎细胞浸润、弹性纤维减少,肌层可见肌纤维增粗、平滑肌壁增厚。以上结果提示,通过横断 T10 脊髓节段能够形成 BND 大鼠模型。

利用 TMT 定量标记技术筛选出模型组/假手术组的 151 个 DEPs,通过 KEGG 分析挖掘出 151 个 DEPs 之间潜在的相互作用关系,结果发现富集到的 KEGG 通路主要参与了炎症反应(趋化因子信号通路和 NOD-样受体信号通路)、凋亡(细胞坏死和细胞凋亡)和突触传递(多巴胺能突触和谷氨酸能突触)。利用 Cytoscape 及其插件对 151 个 DEPs 进行可视化分析,筛选出了 Igals3、ApoE、Dhcr24、Snca 等 35 个关键 DEPs,利用 ClueGO 对 35 个 DEPs 参与的生物过程进行注释来展示单个 DEPs 的功能,结果发现 35 个 DEPs 主要参与了突触修剪、5-羟色胺运输、巨噬细胞活化、神经炎症反应、神经胶质细胞的激活和小胶质细胞的激活等生物过程。

脊髓损伤后周围炎细胞的浸润、星形胶质细胞和小胶质细胞的激活是引起脊髓继发性损伤的主要原因之一<sup>[19]</sup>。其中,被激活的小胶质细胞和星形胶质细胞释放多种氧化应激调节因子、趋化因子和炎症介质从而介导炎症反应<sup>[20]</sup>。有研究表明,在中枢神经系统中胶质细胞介导的慢性炎症会使神经组织损伤进一步加重,从而引起神经元损伤和脱髓鞘等病理改变<sup>[21]</sup>。目前,针对炎症反应治疗继发性脊髓损伤,主要通过靶向 CD11d/CD18 或  $\alpha 4\beta 1$  整合素的抗体来减少小胶质细胞/巨噬细胞的活化,最终减少脊髓组织的炎性损伤<sup>[20]</sup>。本研究中对 151 个 DEPs 进行 KEGG 分析,发现趋化因子信号通路和 NOD-样受体信号通路等炎症相关途径显著富集。此外,35 个关键 DEPs 的生物过程分析结果发现,C1qa、Clu、Snca 主要参与了巨噬细胞活化、神经炎症反应、神经胶质细胞激活和小胶质细胞激活等生物过程。因

此,本次生物信息分析富集到的 C1qa、Clu 和 Snca 可能是抑制脊髓炎性损伤的潜在治疗靶点。

此外,本次 KEGG 分析富集到了细胞坏死和细胞凋亡两条信号通路。151 个 DEPs 中 Pycard、Glul、Capn1 参与了细胞坏死通路,其中:Pycard 泛素化可以促进白细胞介素-1 $\beta$  活化,加重组织的炎症反应,最终导致细胞坏死和凋亡<sup>[22]</sup>;Glul 编码的谷氨酰胺合成酶活性的升高会增加活性氧(reactive oxygen species, ROS)的产生,最终导致脂质过氧化和细胞坏死<sup>[23]</sup>;Capn1 通过激活半胱天冬酶-3 触发神经元细胞坏死和凋亡<sup>[24]</sup>。此外,151 个 DEPs 中 Ctsz 和 Ctsd 参与了细胞凋亡途径,Ctsz 和 Ctsd 编码的溶酶体半胱氨酸蛋白酶家族可通过降解 BCL-2 蛋白从而启动细胞凋亡过程<sup>[25]</sup>。细胞坏死和凋亡是脊髓继发性损伤的重要原因<sup>[26]</sup>,因此,从抑制细胞坏死和凋亡的角度出发寻找潜在靶点是减轻脊髓继发性损伤的治疗思路之一。

在 T10~L2 脊髓组织的 KEGG 分析结果中,多巴胺能突触和谷氨酸能突触两条信号通路显著富集。多巴胺(dopamine, DA)和谷氨酸是中枢神经系统中常见的神经递质,二者在控制膀胱的排尿过程中发挥着重要作用<sup>[27-28]</sup>。研究发现,在脊髓中存在能产生内源性 DA 的多巴胺能神经元,在 T10 脊髓完全横断后,脊髓中的多巴胺能神经元合成 DA 的能力增强,脊髓中依然能够检测到内源性 DA<sup>[29]</sup>。已有研究发现,通过鞘内注射 DA 信号药物可以改善脊髓损伤后逼尿肌-外括约肌协同失调型膀胱的排尿功能<sup>[30]</sup>,而脊髓交感神经中枢中的 DA 可以调节膀胱颈的功能<sup>[31]</sup>。本研究发现,参与多巴胺能突触通路中的 Comt 在模型组脊髓中显著升高,Ddc 显著降低。研究表明,Comt 具有降解 DA 的功能<sup>[32]</sup>,Ddc 能加速 DA 的合成<sup>[33]</sup>。因此,多巴胺能突触以及参与该条信号通路的 Ddc 和 Comt 可能是治疗脊髓损伤后 BND 的潜在治疗靶点。

谷氨酸是影响膀胱排尿的主要兴奋性神经递质,其通过与突触后膜上的谷氨酸受体结合促进排尿反射<sup>[34]</sup>。已有研究表明,腰骶脊髓节段副交感神经区的谷氨酸可激活膀胱逼尿肌从而促进膀胱排尿,目前,谷氨酸受体拮抗剂类药物已运用于膀胱逼尿肌过度活动的治疗中<sup>[35]</sup>。有研究发现,胸段脊髓交感神经区仍然有谷氨酸能突触<sup>[36]</sup>,在谷氨酸能突触

中,Gng4可抑制突触前膜释放谷氨酸,从而降低突触间隙的谷氨酸浓度<sup>[37]</sup>,而Homer1有助于突触后膜上的代谢型谷氨酸受体与钙离子示释放偶联,从而发挥谷氨酸能突触作用<sup>[38]</sup>。本次实验的KEGG分析结果发现,谷氨酸能突触显著富集,此外151个DEPs中,Homer1、Gng4参与了该信号通路,相比于假手术组,模型组脊髓组织中Homer1和Gng4的表达显著下降。这说明在T10脊髓损伤后,由于Gng4表达下降,T10~L2脊髓组织中谷氨酸的释放增加,但由于Homer1的表达明显下降,导致谷氨酸能突触不能发挥正常的生物学作用,这可能是T10脊髓损伤后出现下尿路功能障碍的原因之一。目前,对于交感神经中的谷氨酸能突触是否能对膀胱颈的活动产生作用尚未有报道,因此从谷氨酸能突触的角度展开进一步研究对治疗T10脊髓损伤后BND是有意义的。

综上所述,C1qa、Clu、Snca、Pycard、Glul、Capn1、Ctsz和Ctsd可能是减轻T10脊髓损伤后T10~L2脊髓组织的炎症反应、保护神经细胞、降低脊髓继发性损伤风险的潜在治疗靶点;脊髓组织中DA和谷氨酸的含量及相关受体的活性也可能是治疗T10脊髓损伤后BND的新思路。本研究通过TMT定量蛋白质组学技术筛选出了T10脊髓节段损伤后T10~L2脊髓组织的DEPs,然而并未对筛选出的潜在治疗靶点进行验证。接下来,将会对筛选出来的DEPs展开验证工作,进一步探讨这些潜在靶点对T10~L2脊髓组织及脊髓损伤后BND起到的治疗作用。

## 参考文献

- [1] HAMID R, AVERBECK M A, CHIANG H, et al. Epidemiology and pathophysiology of neurogenic bladder after spinal cord injury[J]. *World Journal of Urology*, 2018, 36(10): 1517-1527.
- [2] KE Q S, KUO H C. Transurethral incision of the bladder neck to treat bladder neck dysfunction and voiding dysfunction in patients with high-level spinal cord injuries[J]. *Neurourology and Urodynamics*, 2010, 29(5): 748-752.
- [3] STOFFEL J T. Detrusor sphincter dyssynergia: A review of physiology, diagnosis, and treatment strategies[J]. *Translational Andrology and Urology*, 2016, 5(1): 127-135.
- [4] MADERSBACHER H. The various types of neurogenic bladder dysfunction: An update of current therapeutic concepts[J]. *Paraplegia*, 1990, 28(4): 217-229.
- [5] WYNDAELE J J, BIRCH B, BORAU A, et al. Surgical management of the neurogenic bladder after spinal cord injury[J]. *World Journal of Urology*, 2018, 36(10): 1569-1576.
- [6] WISHAHI M. Lower urinary tract dysfunction in pediatrics progress to kidney disease in adolescents: Toward precision medicine in treatment[J]. *World Journal of Nephrology*, 2021, 10(4): 37-46.
- [7] WANG Z, KAVDIA K, DEY K K, et al. High-throughput and deep-proteome profiling by 16-plex tandem mass tag labeling coupled with two-dimensional chromatography and mass spectrometry[J]. *Journal of Visualized Experiments*, 2020(162): 1-23.
- [8] CHEN C, HOU J, TANNER J J, et al. Bioinformatics methods for mass spectrometry-based proteomics data analysis[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(8): 2873.
- [9] SHAKER H, MOURAD M S, ELBIALY M H, et al. Urinary bladder hyperreflexia: A rat animal model[J]. *Neurourology and Urodynamics*, 2003, 22(7): 693-698.
- [10] HANSEN R B, BIERING-SØRENSEN F, KRISTENSEN J K. Bladder emptying over a period of 10-45 years after a traumatic spinal cord injury[J]. *Spinal Cord*, 2004, 42(11): 631-637.
- [11] 陈向荣,游思维,金大地. BBB评分评估脊髓损伤大鼠后肢运动功能的探讨[J]. *中国脊柱脊髓杂志*, 2004, 14(9): 547-549.
- [12] 许明,张泓,刘继生,等. 完全性骶上脊髓损伤后神经源性膀胱大鼠模型的建立及尿流动力学分析[J]. *中国康复理论与实践*, 2016, 22(8): 869-875.
- [13] BU D C, LUO H T, HUO P P, et al. KOBAS-i: Intelligent prioritization and exploratory visualization of biological functions for gene enrichment analysis[J]. *Nucleic Acids Research*, 2021, 49(W1): W317-W325.
- [14] FRANZ M, LOPES C T, HUCK G, et al. Cytoscape.js: a graph theory library for visualisation and analysis[J]. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 2016, 32(2): 309-311.
- [15] CHIN C H, CHEN S H, WU H H, et al. cytoHubba: identifying hub objects and sub-networks from complex interactome[J]. *BMC Systems Biology*, 2014, 8(Suppl 4): S11.
- [16] BINDEA G, MLECNIK B, HACKL H, et al. ClueGO: a Cytoscape plug-in to decipher functionally grouped gene ontology and pathway annotation networks[J]. *Bioinformatics*, 2009, 25(8): 1091-1093.
- [17] PERKASH I. Autonomic dysreflexia and detrusor-sphincter dyssynergia in spinal cord injury patients[J]. *The Journal of Spinal Cord Medicine*, 1997, 20(3): 365-370.
- [18] KIM D K. Current pharmacological and surgical treatment of underactive bladder[J]. *Investigative and Clinical Urology*, 2017, 58(Suppl 2): S90-S98.
- [19] 李志勇,李道龙,陈永翱,等. 炎症指标在脊髓损伤后神经功能恢复和神经病理性疼痛中的预测作用研究[J]. *颈腰痛杂志*, 2021, 42

- (5):660-663.
- [20] ORR M B, GENSEL J C. Spinal cord injury scarring and inflammation: Therapies targeting glial and inflammatory responses [J]. *Neurotherapeutics*, 2018, 15(3): 541-553.
- [21] WITCHER K G, BRAY C E, CHUNCHAI T, et al. Traumatic brain injury causes chronic cortical inflammation and neuronal dysfunction mediated by microglia[J]. *The Journal of Neuroscience*, 2021, 41(7): 1597-1616.
- [22] ZHANG L Y, KO C J, LI Y C, et al. Peli1 facilitates NLRP3 inflammasome activation by mediating ASC ubiquitination[J]. *Cell Reports*, 2021, 37(4): 109904.
- [23] NIKSERESHT S, KHODAGHOLI F, DARGAHI L, et al. Necroptosis resumes apoptosis in Hippocampus but not in frontal cortex[J]. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2017, 118(12): 4628-4638.
- [24] SHANG L, HUANG J F, DING W, et al. Calpain: a molecule to induce AIF-mediated necroptosis in RGC-5 following elevated hydrostatic pressure[J]. *BMC Neuroscience*, 2014, 15: 63.
- [25] REPNIK U, TURK B. Lysosomal-mitochondrial cross-talk during cell death[J]. *Mitochondrion*, 2010, 10(6): 662-669.
- [26] 许春财,许卫红.脊髓损伤后神经细胞继发坏死机制研究进展[J]. *中国当代医药*,2011,18(16):18-19,25.
- [27] 吴志刚,沈丽霞.帕金森病患者下尿路功能障碍治疗研究进展[J]. *神经药理学报*,2014,4(4):36-41.
- [28] 孙双权,陈忠,叶章群.谷氨酸及其受体在排尿反射通路中的作用[J]. *医学研究生学报*,2007,20(12):1305-1308,1313.
- [29] ZHAO S Y, DEFINIS J H, HOU S P. Alterations of dopamine-related transcripts in A11 diencephalospinal pathways after spinal cord injury[J]. *Neural Plasticity*, 2021, 2021: 8838932.
- [30] QIAO Y, BRODNIK Z D, ZHAO S Y, et al. Spinal dopaminergic mechanisms regulating the micturition reflex in male rats with complete spinal cord injury[J]. *Journal of Neurotrauma*, 2021, 38(6): 803-817.
- [31] GIULIANO F. Neurophysiology of erection and ejaculation[J]. *The Journal of Sexual Medicine*, 2011, 8: 310-315.
- [32] FINBERG J P M. Inhibitors of MAO-B and COMT: Their effects on brain dopamine levels and uses in Parkinson's disease[J]. *Journal of Neural Transmission*, 2019, 126(4): 433-448.
- [33] GRATZ M J, STAVROU S, KUHN C, et al. Dopamine synthesis and dopamine receptor expression are disturbed in recurrent miscarriages[J]. *Endocrine Connections*, 2018, 7(5): 727-738.
- [34] DE GROAT W C, ARAKI I, VIZZARD M A, et al. Developmental and injury induced plasticity in the micturition reflex pathway[J]. *Behavioural Brain Research*, 1998, 92(2): 127-140.
- [35] GUARNERI L, POGGESI E, ANGELICO P, et al. Effect of selective antagonists of group I metabotropic glutamate receptors on the micturition reflex in rats[J]. *BJU International*, 2008, 102(7): 890-898.
- [36] LLEWELLYN-SMITH I J, ARNOLDA L F, PILOWSKY P M, et al. GABA- and glutamate-immunoreactive synapses on sympathetic preganglionic neurons projecting to the superior cervical ganglion[J]. *Journal of the Autonomic Nervous System*, 1998, 71(2/3): 96-110.
- [37] WANG C C, KUO J R, WANG S J. Fingolimod inhibits glutamate release through activation of SIP1 receptors and the G protein  $\beta\gamma$  subunit-dependent pathway in rat cerebrocortical nerve terminals[J]. *Neuropharmacology*, 2021, 185: 108451.
- [38] TAPPE A, KUNER R. Regulation of motor performance and striatal function by synaptic scaffolding proteins of the Homer1 family[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*,2006,103(3): 774-779.

(本文编辑 匡静之)