

本文引用: 瞿启睿, 孙晓莹, 邓石峰, 许明, 祁芳, 易细芹, 唐丽亚, 卓越, 艾坤. 电针对 T10 脊髓损伤后 T10-L2 脊髓组织蛋白质组学的生物信息学分析[J]. 湖南中医药大学学报, 2025, 45(9): 1670-1680.

电针对 T10 脊髓损伤后 T10-L2 脊髓组织 蛋白质组学的生物信息学分析

瞿启睿, 孙晓莹, 邓石峰, 许明, 祁芳, 易细芹, 唐丽亚, 卓越*, 艾坤*
湖南中医药大学针灸推拿与康复学院, 湖南长沙 410208

[摘要] **目的** 运用串联质量标签(TMT)定量蛋白质组学生物信息学分析技术,探讨电针治疗 T10 脊髓损伤后神经源性膀胱的可能机制。**方法** 将 60 只雌性成年 SD 大鼠随机分为假手术组(12 只)、造模组(48 只)。造模组大鼠采用 Hassan Shaker 脊髓横断法制备 T10 节段髓上脊髓损伤模型,脊髓休克期过后共存活且符合成模标准共 22 只,二次随机分为模型组和电针组,每组 11 只。假手术组随机抽取 11 只纳入实验。电针组在造模后第 19 天于次髂、中极、三阴交给予电针干预,20 min/次,1 次/d,连续干预 10 d。干预结束后,大鼠行尿流动力学和 HE 染色检测,取 T10-L2 脊髓组织行 TMT 定量蛋白质组学检测和 Western blot 检测。**结果** 与假手术组相比,模型组大鼠漏尿点压力(LPP)和膀胱最大容量(MCC)明显增高($P<0.01$);与模型组相比,电针组大鼠 LPP 和 MCC 明显降低($P<0.01$)。膀胱组织 HE 染色显示,模型组膀胱颈组织大量炎症细胞浸润,弹性纤维减少,肌层平滑肌纤维排列略紊乱;电针组膀胱颈组织炎症细胞浸润减少,平滑肌纤维排列趋于整齐。TMT 定量蛋白质组学显示,T10-L2 脊髓组织中,模型组与假手术组相比,筛选出 146 个差异表达蛋白(DEPs),电针组与模型组相比,筛选出 37 个 DEPs,经电针治疗后共有 5 个 DEPs 被反向调节。经生物信息学分析,提示电针对损伤局部脊髓组织的影响可能涉及调节炎症反应、氧化应激、细胞凋亡、神经保护及轴突再生。脊髓组织 HE 染色显示,模型组 T10-L2 脊髓组织有神经元崩解现象,坏死后空洞增多,炎症细胞增生;电针组神经元崩解现象减少,水肿减轻,炎症细胞相对减少。与假手术组相比,模型组大鼠 T10-L2 脊髓组织富组氨酸糖蛋白(Hrg)、胎儿素 B(Fetub)表达明显升高($P<0.01$),而 G 蛋白亚基 $\gamma 4$ (Gng4)表达明显降低($P<0.01$);与模型组相比,电针组大鼠 T10-L2 脊髓组织 Hrg、Fetub 表达明显降低($P<0.01$),而 Gng4 表达明显升高($P<0.01$)。**结论** 电针次髂、中极、三阴交可有效减轻 T10 脊髓损伤后的继发性损伤,保护神经组织,抑制炎症反应、氧化应激与细胞凋亡,激活神经保护及轴突再生相关通路,降低膀胱颈阻力并提高排尿效率。

[关键词] 脊髓损伤;蛋白质组学;生物信息学;胎儿素 B;富组氨酸糖蛋白;G 蛋白亚基 $\gamma 4$

[中图分类号]R245

[文献标志码]A

[文章编号]doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2025.09.011

Bioinformatic analysis of proteomics in T10-L2 spinal cord tissue following electroacupuncture treatment for T10 spinal cord injury

QU Qirui, SUN Xiaoying, DENG Shifeng, XU Ming, QI Fang, YI Xiqin, TANG Liya,
ZHUO Yue*, AI Kun*

School of Acupuncture-moxibustion, Tuina and Rehabilitation, Hunan University of Chinese Medicine,
Changsha, Hunan 410208, China

[收稿日期]2025-04-03

[基金项目]国家自然科学基金项目(81874510);湖南中医药大学研究生创新项目(2023CX74);2023 年湖南省教育厅科学研究优秀青年项目(23B0350)。

[通信作者]* 艾坤,男,教授,博士研究生导师,E-mail:aikun650@qq.com;卓越,男,博士,讲师,E-mail:nedved823@qq.com。

[Abstract] Objective To investigate the potential mechanism of electroacupuncture (EA) in treating neurogenic bladder (NB) after T10 spinal cord injury (SCI) using tandem mass tag (TMT)-based quantitative proteomics and bioinformatic analysis. **Methods** Sixty female adult SD rats were randomly divided into sham-operated group ($n=12$) and modeling group ($n=48$). A suprasacral SCI model at the T10 segment was established in the modeling group using the Hassan Shaker spinal cord transection method. After the spinal shock period, 22 surviving rats that met the modeling criteria were further randomized into model group ($n=11$) and EA group ($n=11$). Eleven rats from the sham-operated group were randomly selected for inclusion. The EA group was treated with EA at the acupoints such as Ciliao (BL32), Zhongji (CV3), and Sanyinjiao (SP6) starting on day 19 post-modeling. The intervention was performed once daily for 20 minutes per session, lasting for 10 consecutive days. After intervention, urodynamic testing and HE staining were performed. T10-L2 spinal cord tissue was collected for TMT-based quantitative proteomics and Western blot analysis. **Results** Compared with the sham-operated group, the model group exhibited significantly increased leak point pressure (LPP) and maximum cystometric capacity (MCC) ($P<0.01$). Compared with the model group, the EA group showed significantly reduced LPP and MCC ($P<0.01$). HE staining of bladder neck tissue revealed marked inflammatory cell infiltration, reduced elastic fibers, and slightly disordered arrangement of smooth muscle fibers in the model group, while the EA group showed decreased inflammatory cell infiltration and more orderly smooth muscle fiber arrangement. TMT-based quantitative proteomics of T10-L2 spinal cord tissue identified 146 differentially expressed proteins (DEPs) between the model and sham-operated groups, and 37 DEPs between the EA and model groups, among which five DEPs were reversely regulated after EA intervention. Bioinformatic analysis indicated that EA may modulate inflammatory response, oxidative stress, apoptosis, neuroprotection, and axonal regeneration in the injured local spinal cord. HE staining of T10-L2 spinal cord tissue showed neuronal disintegration, increased post-necrotic cavities, and inflammatory cell proliferation in the model group, while the EA group exhibited reduced neuronal disintegration, alleviated edema, and fewer inflammatory cells. Compared with the sham-operated group, the model group showed significantly upregulated expression of histidine-rich glycoprotein (Hrg) and fetuin-B (Fetub) ($P<0.01$), and downregulated expression of G protein subunit gamma 4 (Gng4) in the T10-L2 spinal cord tissue ($P<0.01$). Compared with the model group, the EA group showed significantly downregulated expression of Hrg and Fetub in the T10-L2 spinal cord tissue ($P<0.01$), and significantly upregulated expression of Gng4 ($P<0.01$). **Conclusion** EA at Ciliao (BL32), Zhongji (CV3), and Sanyinjiao (SP6) acupoints can effectively alleviate secondary injury after T10 SCI, protect neural tissue, suppress inflammatory response, oxidative stress, and apoptosis, and activate neuroprotection and axonal regeneration pathways, thereby reducing bladder neck resistance and improving voiding efficiency.

[Keywords] spinal cord injury; proteomics; bioinformatics; fetuin-B; histidine-rich glycoprotein; G protein subunit gamma 4

神经源性膀胱(neurogenic bladder, NB)是骶上脊髓损伤(suprasacral spinal cord injury, SSCI)后的严重合并症^[1]。SSCI后,脑桥等高位排尿中枢与脊髓排尿中枢的联络中断,脊髓交感、副交感协同异常,出现膀胱和尿道功能障碍,其中T10及以上脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)后,位于脊髓的交感排尿中枢由于失去了高位中枢的抑制,交感神经过度活跃,导致排尿时膀胱颈过度收缩,膀胱出口阻力增加,造成膀胱内尿量堆积及膀胱内高压,进一步引发膀胱输尿管反流、肾功能损害以及尿毒症等一系列泌尿功能问题^[2-4]。

脊髓继发性损伤是造成脊髓功能丧失的最大威胁,使病灶周围原本完整的组织发生自身破坏性改变,其病理变化包括脊髓出血、水肿、神经元细胞坏死及轴突脱髓鞘,继以梗死及囊肿形成、脊髓组织软

化或形成胶质瘢痕,导致脊髓永久性功能丧失^[5-6]。T10及以上脊髓节段损伤后,其继发性损伤引起神经元坏死和轴突脱髓鞘是上下中枢联络中断的重要原因,因此,减轻SCI后的继发性损伤,保护神经组织,诱导轴突再生重塑神经功能,抑制T10-L2脊髓节段交感神经过度兴奋,促进膀胱颈舒张,降低尿道出口阻力,提高排尿效率,是治疗T10及以上脊髓节段损伤后NB的重要思路之一^[7]。

本课题组前期研究表明,电针次髎、中极、三阴交能明显提高NB模型大鼠的膀胱最大容量(maximum cystometric capacity, MCC)和顺应性,降低膀胱漏尿点压(leak point pressure, LPP),从而改善SCI后NB大鼠膀胱排尿功能^[8-9]。然而,既往研究大多关注外周水平上的病理机制^[10-11],虽在一定程度上解释了电针治疗SCI后NB的作用机制,但对该

疾病 SCI 局部的神经修复机制缺乏系统、全面的认识,仍需进一步探究其潜在机制。

蛋白质是生物体内生命活动的主要承担者。串联质量标签(tandem mass tag, TMT)定量蛋白质组学技术能够更全面地检测出组织中表达的蛋白质,继而揭示生命过程或疾病发展中出现的差异表达蛋白(differentially expressed proteins, DEPs)^[12],其联合生物信息学分析可帮助从整体上、多个角度研究疾病的病理机制^[13]。由于 TMT 技术的独特优势,它被中医研究广泛应用于探索复杂的调控机制^[14-16]。因此,TMT 技术有助于在蛋白质水平上为电针治疗 SSCI 后 NB 提供一定的理论支撑。

本研究采用 TMT 定量蛋白质组学技术检测 T10-L2 脊髓组织中表达的蛋白质,筛选出 DEPs,并对其进行生物信息学分析,再通过 Western blot 对部分差异表达蛋白进行验证,以期为电针治疗 SSCI 后 NB 提供蛋白质组学依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物来源与分组

由湖南中医药大学实验动物中心提供健康成年 SD 大鼠 60 只,雌性,体质量 230~250 g,质量合格证编号:1107271911006889,伦理审批号:LL2019092303。大鼠饲养于湖南中医药大学 SPF 级动物房,饲养温度为 24~26 ℃,相对湿度 50%~70%,换气次数 15~20 次/h,压强梯度 20~50 Pa,每晚定时紫外线照射消毒实验室。适应性饲养 7 d 后,按照随机数字表法分为假手术组(12 只)和造模组(48 只)。先将造模组 48 只大鼠进行 T10 节段 SCI 模型制备,再将符合成模标准的 22 只大鼠二次随机分为模型组(11 只)和电针组(11 只),假手术组 12 只大鼠随机抽取 11 只纳入后续实验。

1.2 主要试剂与仪器

戊巴比妥钠(批号:P3761,美国 Merck KGaA 公司);青霉素钠(批号:H23021600,华北制药集团有限责任公司);BCA 蛋白测定试剂盒(批号:QB214754,上海数谱生物科技有限公司);HE 染液(批号:AFZD005,湖南艾方生物科技有限公司);TMT10plex™ 同量异序质量标签试剂盒(批号:90113CH,美国 Thermo Scientific 公司);G 蛋白亚基 $\gamma 4$ (G protein subunit gamma 4, Gng4)抗体、富组氨酸糖蛋白(histidine rich glycoprotein, Hrg)抗体、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase antibody, GAPDH)抗体(批号:13780-1-AP、26252-1-

AP、60004-1-Ig,美国 Proteintech 公司);胎儿素 B (fetuin B, Fetub)抗体(批号:ab191569,英国 abcam 公司)。MP-150 多通道生理记录仪(型号:MP150-WSW,美国 Biopac 公司);微量注射泵(型号:WZ-50C6,浙江史密斯医学仪器有限公司);华佗牌电针治疗仪(型号:SDZ-V,苏州医疗用品厂)。

1.3 模型制备

结合本团队前期研究,对 Hassan Shaker 脊髓横断法^[17]进行改良,制作 T10 节段 SSCI 模型^[18]。造模组大鼠(48 只)常规饲养 7 d 后,术前 24 h 禁食不禁水,腹腔注射 3%戊巴比妥钠进行麻醉。定位 T8 椎骨(脊髓 T10 节段)后切开皮肤并钝性分离竖脊肌,使棘突和椎板充分暴露,显微咬骨器去除 T8 椎板,充分暴露脊髓,用眼科剪完全横断脊髓后,清创止血并逐层缝合。假手术组仅暴露脊髓不横断。术后监测大鼠生命体征,单笼饲养,实施抗感染处理、手法辅助排尿和定期更换垫料。

1.4 动物模型评估

(1)后肢运动功能评估:大鼠在行走时后肢处于拖动状态,Basso-Beattie-Bresnahan(BBB)运动评分为 0 分^[19],则认为 SSCI 模型制作成功。(2)膀胱排尿功能评估:T10 节段 SCI 大鼠脊髓休克期过后表现为膀胱胀大,下腹部及笼内垫料轻度潮湿,膀胱触诊呈“橄榄形”胀大,尿流动力学结果显示 LPP、MCC 增高,则提示 NB 模型造模成功。同时满足后肢运动功能评估和膀胱排尿功能评估条件的模型大鼠,则视为 SSCI 后 NB 模型造模成功。48 只造模大鼠存活 29 只,其中 7 只不符合成模标准予以剔除,符合成模标准的大鼠共有 22 只。

1.5 干预方法

电针组 11 只大鼠于脊髓休克期后(即造模后第 19 天)给予电针治疗^[20]。选穴次髎、中极、三阴交,参照《实验针灸学》^[21]附录三中大鼠标准穴位图谱进行定位取穴。先用鼠板仰卧位固定大鼠,行电针中极与双侧三阴交 20 min,再俯卧位固定大鼠,行电针双侧次髎 20 min。中极和三阴交刺入 5 mm,次髎刺入 15 mm,电针频率 10 Hz/50 Hz,强度以大鼠穴位皮肤轻颤并耐受为度。1 次/d,连续干预 10 d。模型组和假手术组均以相同方式束缚,但不进行电针治疗。

1.6 取材及样本处理

干预结束后,对各组大鼠行尿流动力学检测,而后断头处死大鼠,取膀胱颈和 T10-L2 脊髓组织备检,每组随机选取 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;每组再随机选取

3只膀胱颈组织和T10-L2脊髓组织置于4%多聚甲醛固定,用于HE检测;每组剩余5只大鼠的膀胱颈组织和T10-L2脊髓组织置于-80℃保存,用于Western blot测定。

1.7 尿流动力学检测

将大鼠腹腔注射3%戊巴比妥钠,排尽尿液,会阴部剃毛,聚维酮碘消毒,通过三通管将多通道生理记录仪、微量注射泵与F3导尿管连接待用;F3导尿管通过尿道插入膀胱并固定;静置30 min后以0.6 mL/min速度灌注生理盐水(25~35℃)。电脑记录LPP和MCC。

1.8 HE染色

随机取3只大鼠固定好的膀胱颈和T10-L2脊髓组织样本,用乙醇梯度脱水,石蜡包埋,连续切片,苏木素和伊红染色,光学显微镜下观察膀胱颈和T10-L2脊髓组织的组织形态学改变。

1.9 TMT蛋白质组学分析

1.9.1 蛋白质样品制备 断头处死后每组再随机取3只大鼠,提取T10-L2脊髓组织用于蛋白质组学分析。样品中各加入1 000 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、半径10 cm、4℃离心15 min,转移上清液至新的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。

1.9.2 TMT定量标记 每个样品取100 μg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 μg不同的TMT溶液至对应样品中,混匀并离心(2 000 r/min,半径10 cm,25℃,10 s),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SDC后取上清液至新EP管中,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℃冻存,用于LC-MS/MS分析。

1.9.3 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(1.6.1.0)进行搜索和TMT定量分析,同时进行iBAQ非标定量;蛋白质数据库为uniprot_rattus_20190711_iso。多肽和蛋白水平假阳性率均控制在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 ≥ 2 的蛋白定义为DEPs,并从中筛选出反转DEPs。

1.10 DEPs的生物信息学分析

采用R软件clusterProfiler包对所有反向转运蛋白进行基因本体(gene ontology, GO)和京都基因与基因组数据库(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)通路富集分析。GO是一个标准化的基因功能分类体系,从参与的生物过程(biological process, BP)、细胞组分(cellular component, CC)和分子功能(molecular function, MF)3个方面描述生物体中基因和基因产物的属性。KEGG是常用于通路研究的数据库之一,将反向转运蛋白进行KEGG通路注释,分析并确定参与的最主要的代谢和信号转导途径。

1.11 Western blot检测

取50 mg T10-L2脊髓组织,加入500 μL RIPA裂解液,混合均匀,匀浆机匀浆4 min,置于冰上裂解30 min,而后使用离心机离心(4℃,12 000 r/min,半径10 cm)20 min,取上清液于EP管中,BCA法测定蛋白浓度后,取适量蛋白原液,加入4×蛋白上样缓冲液,金属浴15 min变性,制备蛋白质上样液。制备SDS-PAGE胶,经过上样、电泳、电转后转移到PVDF膜上。而后将PVDF膜浸泡在含5%脱脂奶粉的封闭液中,室温孵育1 h, TBST清洗3次,每次10 min,分别加入一抗Hrg(1:10 000)、Fetub(1:1 000)、Gng4(1:2 000)和GAPDH(1:15 000),4℃过夜。TBST洗3次,每次10 min后分别加入对应的二抗,室温孵育1 h后TBST洗3次,每次10 min,最后在PVDF膜上滴加显影液于暗室中曝光显影,使用Image Lab软件对各组蛋白相对含量进行定量分析。

1.12 统计学分析

数据均使用SPSS 26.0软件进行分析。计量资料均用“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,满足正态性和方差齐性,组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 t 检验;不满足正态性和方差齐性,则用Wilcoxon检验。均以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况

假手术组大鼠一般情况良好。模型组和电针组大鼠在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“橄榄形”膀胱,下腹部和笼内垫料轻微潮湿,手法排尿时可感觉到尿道口有阻力。电针治疗后,电针组大鼠较模型组膀胱胀大程度减轻,手法辅助排尿时阻力减少,尿液易于排出。

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($P<0.01$);与模型组相比,电针组的 LPP 和 MCC 均明显减少($P<0.01$)。详见图 1。

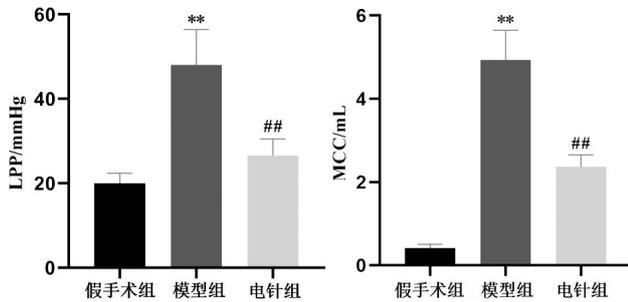


图 1 各组大鼠的 LPP 及 MCC 比较($\bar{x}\pm s$, $n=11$)

Fig.1 Comparison of LPP and MCC among different groups of rats ($\bar{x}\pm s$, $n=11$)

注:与假手术组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,## $P<0.01$ 。

2.3 膀胱颈组织 HE 染色结果

假手术组大鼠膀胱颈组织层次清晰,整齐紧密排列,无炎症细胞浸润;模型组大鼠膀胱颈组织中可见黏膜下层组织水肿,弹性纤维减少,大量炎症细胞浸润,肌层平滑肌纤维排列略紊乱;与模型组相比,电针组大鼠膀胱颈组织黏膜下层炎症细胞数量相对减少,肌层平滑肌纤维排列稍整齐。详见图 2。

2.4 T10-L2 脊髓组织的 TMT 定量蛋白质组学分析

运用 TMT 定量蛋白质组学技术,共检测到 47 947 个多肽,检测到的蛋白数量为 6 684 个,其中有 4 177 个蛋白被定量。根据 $FC>1.2$ 或 $<1/1.2$ 、 $P<0.05$ 、unique peptide ≥ 2 分别筛选出 T10-L2 脊髓组织中模型组/假手术组与电针组/模型组间的 DEPs。在模型组/假手术组中,共检测出 146 个 DEPs(上调 80 个,下调 66 个);在电针组/模型组中,鉴定出 37 个 DEPs(上调 23 个,下调 14 个)。在模型组/假手术组和电针组/模型组中,鉴定出 6 个重叠的 DEPs。在 6 个 DEPs 中,5 个蛋白经电针治疗后被反向调

节,即为反转 DEPs。详见图 3。

2.5 DEPs 的生物信息分析

2.5.1 DEPs 的 GO 分析 采用 R 软件 clusterProfiler 包对所有反转蛋白进行 GO 功能注释获取信息,按照 $P<0.05$,在 BP、CC 和 MF 上分别筛选出前 130、19、14 条生物功能。按照 $P.adjust$ 、Enrichment 值排序,本实验展示了各属性富集程度最高的前 10 条 GO 条目。反转蛋白中,BP 主要是细胞生长的负调控(negative regulation of cell growth)、血红素输出(heme export)、RNA 聚合酶 II 启动子对铁的反应调节转录(regulation of transcription from RNA polymerase II promoter in response to iron)、内肽酶活性负调节(negative regulation of endopeptidase activity)、生长负调节(negative regulation of growth)、肽酶活性负调节(negative regulation of peptidase activity)、板状基底组件负调节(negative regulation of lamellipodium assembly)、血管重构的正向调节(positive regulation of blood vessel remodeling)、内皮细胞趋化性负调节(negative regulation of endothelial cell chemotaxis)、血管内皮生长因子信号通路的负调节(negative regulation of vascular endothelial growth factor signaling pathway);CC 主要是吞噬体膜(phagolysosome membrane)、吞噬体(phagolysosome)、内壁溶酶体(endolysosome)、次级溶酶体(secondary lysosome)、吞噬囊泡膜(phagocytic vesicle membrane)、血微粒(blood microparticle)、异三聚体 G 蛋白复合物(heterotrimeric G-protein complex)、GTPase 复合体(GTPase complex)、内吞囊泡膜(endocytic vesicle membrane)、吞噬囊泡(phagocytic vesicle);MF 主要为半胱氨酸型内肽酶抑制剂活性(cysteine-type endopeptidase inhibitor activity)、内肽酶抑制剂活性(endopeptidase inhibitor activity)、内肽酶调节活性(endopeptidase regulator activity)、肽酶抑制剂活性(peptidase inhibitor activity)、肽酶调节活性(peptidase

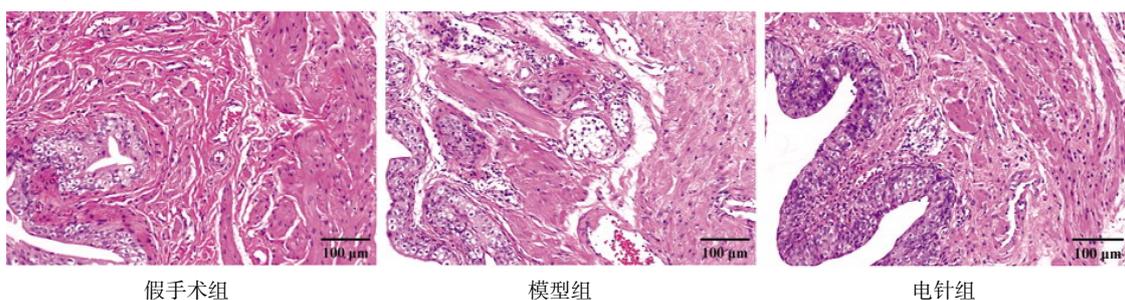


图 2 各组大鼠膀胱颈组织病理形态学比较(HE, $\times 200$)

Fig.2 Comparison of histopathological morphology of bladder neck tissue among different groups of rats (HE, $\times 200$)

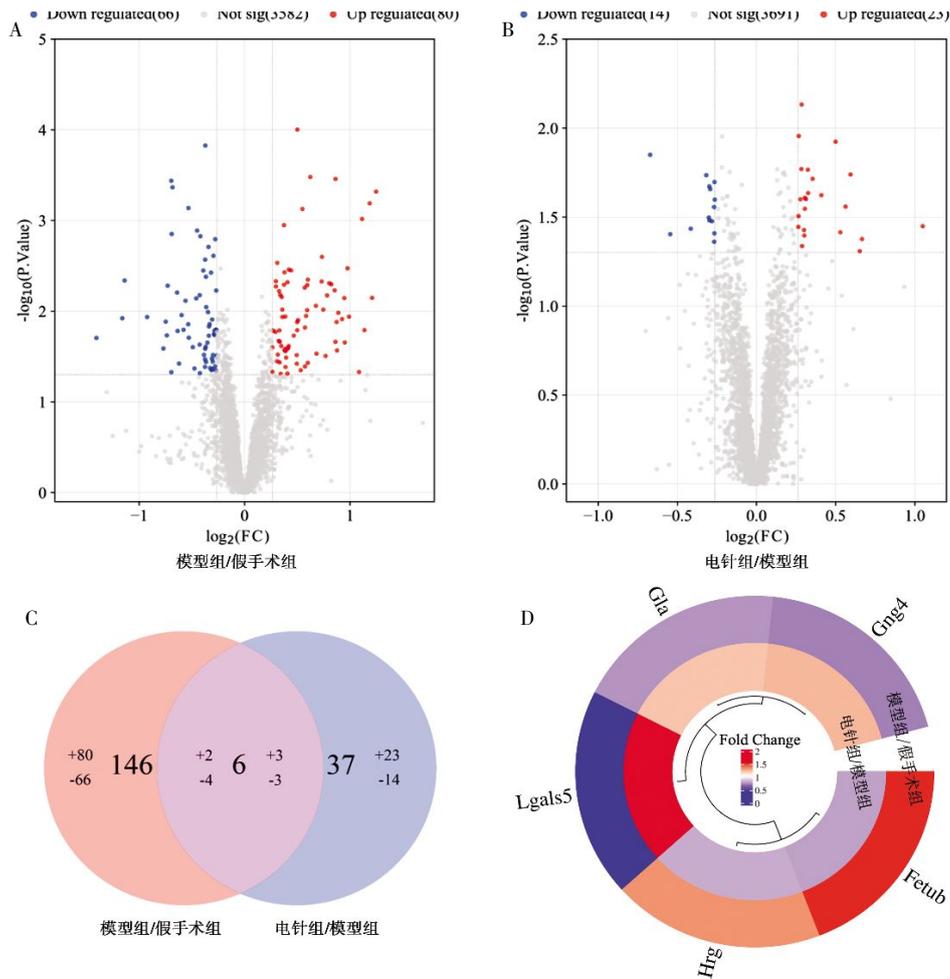


图 3 各组大鼠 T10-L2 脊髓组织 TMT 定量蛋白质组学分析结果

Fig.3 TMT-based quantitative proteomics analysis results of T10-L2 spinal cord tissue among different groups of rats
注:A.模型组/假手术组的火山图,其中包含 146 个 DEPs;B.电针组/模型组的火山图,其中包含 37 个 DEPs;C.DEPs 及 6 个重叠 DEPs 的 venny 图,“+”代表上调的 DEPs,“-”代表下调的 DEPs;D. 5 个反转 DEPs 的聚类图。

regulator activity)、金属内肽酶抑制剂活性(metalloendopeptidase inhibitor activity)、酶抑制剂活动(enzyme inhibitor activity)、免疫球蛋白结合(immunoglobulin binding)、硫酸肝素蛋白聚糖结合(heparan sulfate proteoglycan binding)、蛋白聚糖结合(proteoglycan binding)。详见图 4。

2.5.2 DEPs 的 KEGG 分析 采用 R 软件 clusterProfiler 包对所有反转蛋白进行 KEGG 通路富集分析,设置 $P < 0.05$ 共筛选出前 17 条 KEGG 通路: γ -氨基丁酸能突触(GABAergic synapse)、吗啡成瘾(morphine addiction)、昼夜节律调节(circadian entrainment)、谷氨酸能突触(glutamatergic synapse)、胆碱能突触(cholinergic synapse)、5-羟色胺能突触(serotonergic synapse)、松弛素信号通路(relaxin signaling pathway)、多巴胺能突触(dopaminergic synapse)、Apelin 信号通路(Apelin signaling pathway)、逆行内源性大麻素信号(retrograde endocannabi-

noid signaling)、趋化因子信号通路(chemokine signaling pathway)、酒精中毒(alcoholism)、卡波西肉瘤相关疱疹病毒感染(Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infection)、Ras 信号通路(Ras signaling pathway)、人类免疫缺陷病毒 1 感染(human immunodeficiency virus 1 infection)、人巨细胞病毒感染(human cytomegalovirus infection)、PI3K-Akt 信号通路(PI3K-Akt signaling pathway)。详见图 5。

2.6 T10-L2 脊髓组织的 HE 染色结果

HE 染色结果显示,假手术组大鼠脊髓组织灰质呈蝴蝶状,神经元胞核及核仁完整清楚,胞浆染色均匀,白质结构完整、轮廓清晰;模型组大鼠脊髓组织灰质与白质界限模糊,灰质部位神经元胞核及胞浆染色变浅,细胞核固缩或消失,数量减少,大量炎症细胞增生,坏死空洞增多,白质部位结构紊乱,大量空泡形成;与模型组相比,电针组大鼠脊髓组织灰质与白质边界略清晰,灰质神经元胞核及胞浆染色

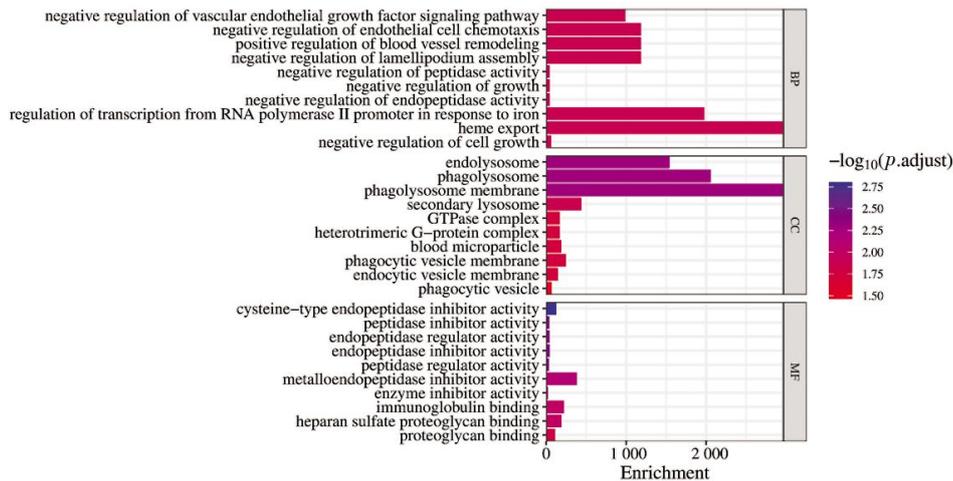


图 4 5 个反转蛋白的 GO 功能注释结果

Fig.4 GO functional annotation results of the five reversed proteins

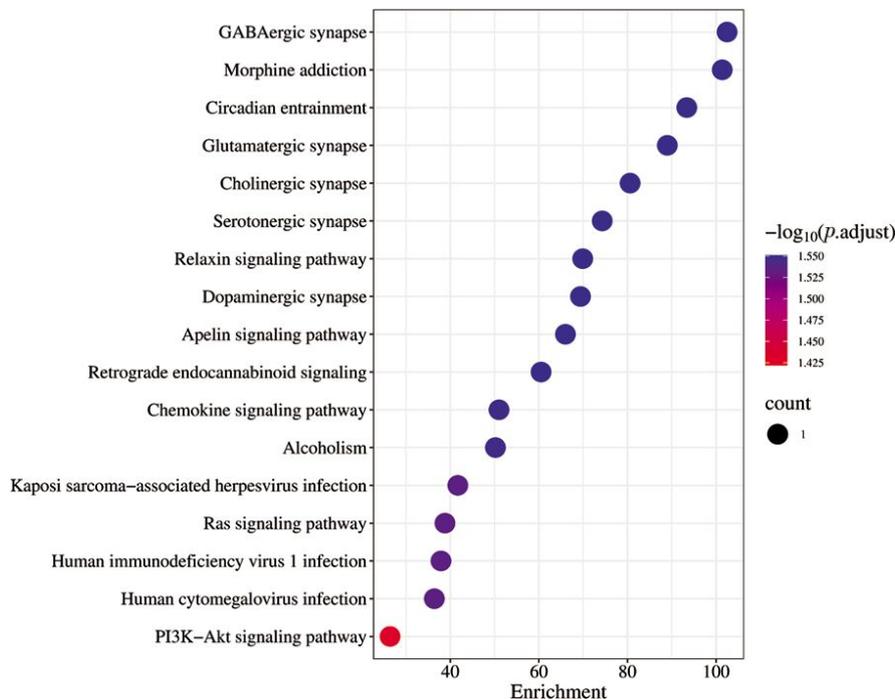


图 5 5 个反转蛋白的 KEGG 通路富集分析结果

Fig.5 KEGG pathway enrichment analysis results of the five reversed proteins

变深,边缘清晰,胞核及核仁轻度肿胀,萎缩减轻,数量相对增加,炎症细胞增生相对减少,坏死空洞减少,白质结构稍清晰,空泡相对减少。详见图 6。

2.7 T10-L2 脊髓组织中 DEPs 的 Western blot 结果

从 T10-L2 脊髓组织蛋白质组学结果中挑选出 3 个与脊髓神经重塑和继发性损伤相关的 DEPs 进行 Western blot 验证。与假手术组比较,模型组 T10-L2 脊髓组织内 Hrg 和 Fetub 表达明显升高 ($P < 0.01$), Gng4 表达明显降低 ($P < 0.01$)。与模型组比较,电针组 T10-L2 脊髓组织内 Hrg 和 Fetub 表达明显降低 ($P < 0.01$), Gng4 表达明显升高 ($P < 0.01$)。详见图 7。

3 讨论

脊髓继发性损伤是造成脊髓功能丧失的一大威胁,可导致上下中枢联络中断,不能有效控制脊髓排尿中枢而引起膀胱功能障碍^[22]。T10 节段 SCI 引起的尿潴留属中医学“癃闭”范畴。中医学认为,SCI 患者因外伤后,督脉受损,膀胱和下焦之气受到阻滞,导致气滞血瘀,肾气受损,膀胱气化功能失调。治疗时,应以疏通调理膀胱和下焦之气为大法^[23]。SCI 开始时常为不完全性损伤,但由于伴随原发损伤而来的继发性损伤,从而导致脊髓微环境失衡,常伴随炎

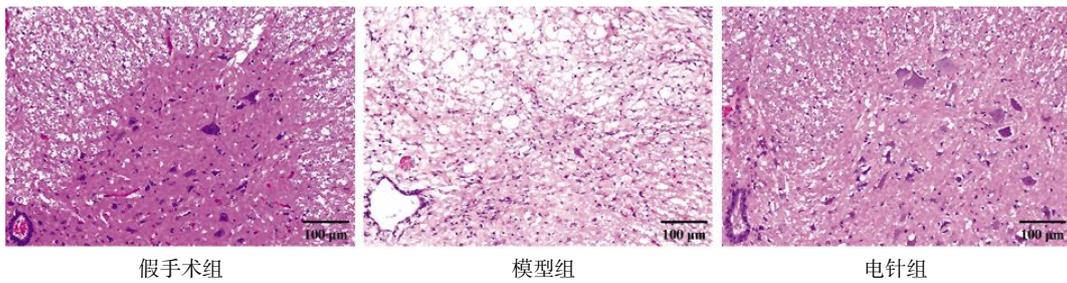


图6 各组大鼠 T10-L2 脊髓组织病理形态学比较(HE,×200)

Fig.6 Comparison of histopathological morphology of T10-L2 spinal cord tissue among different groups of rats (HE, ×200)

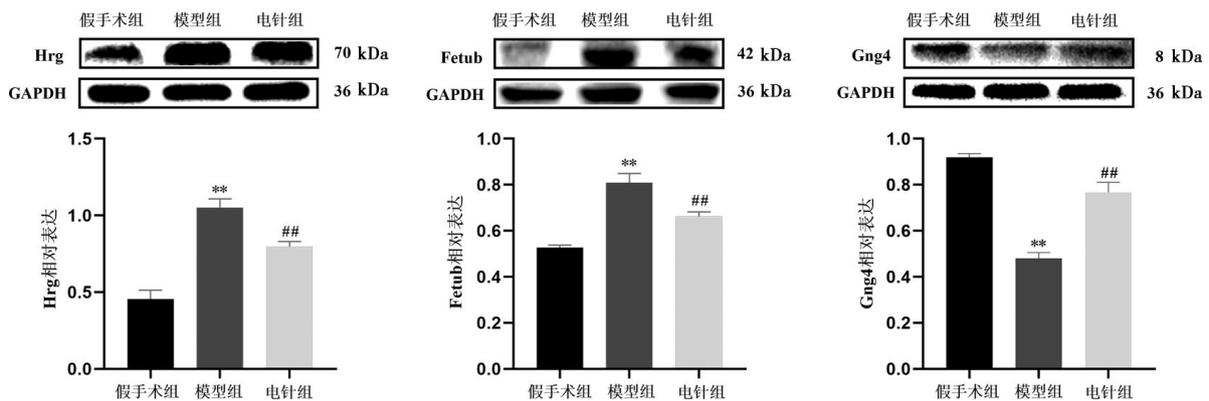


图7 各组大鼠 T10-L2 脊髓组织中 Hrg、Fetub 和 Gng4 蛋白表达比较($\bar{x}\pm s$, $n=5$)

Fig.7 Comparison of the protein expression of Hrg, Fetub, and Gng4 in T10-L2 spinal cord tissue among different groups of rats ($\bar{x}\pm s$, $n=5$)

注:与假手术组相比,** $P<0.01$;与模型组相比,## $P<0.01$ 。

症、氧化应激、自噬、坏死和凋亡等过程^[24-26]。目前,治疗 SCI 的重点是保护脊髓损伤后的神经元和改善损伤脊髓的微环境^[27]。T10-L2 脊髓节段是连接高位排尿中枢(脑桥、下丘脑)与骶髓排尿中枢(S2-S4)的关键神经通路,研究表明,位于 L1-L2 脊髓节段的交感神经中枢通过胸腰段传出纤维支配膀胱颈和尿道内括约肌^[22]。T10 脊髓横断后,继发性损伤会沿脊髓头尾端扩散,而 T10-L2 节段紧邻损伤灶,因缺血、炎症级联反应引发继发性损伤^[28-29]。本课题组前期一项蛋白质组学研究也证实,T10 节段 SCI 后 L1-L2 节段的蛋白质表达变化与膀胱功能障碍密切相关^[7]。既往研究表明,电针干预可通过抑制脊髓组织细胞凋亡,保护受损神经元,改善膀胱功能^[30-32]。因此,本研究通过分析 T10-L2 脊髓节段蛋白质组学的改变来探讨电针治疗 T10 节段 SCI 后 NB 的潜在分子机制。

本研究结果显示,在尿流动力学方面,模型组较假手术组大鼠的 LPP、MCC 显著增大,膀胱颈过度紧张,导致膀胱内压急剧升高,同时伴膀胱容量增大;电针组较模型组大鼠的 LPP、MCC 明显减小,这

表明电针中极、次髂、三阴交可有效缓解膀胱颈的过度紧张,减轻排尿时产生的尿道口压力,从而改善膀胱排尿功能。膀胱颈的 HE 染色结果显示,模型组较假手术组膀胱颈组织大量炎症细胞浸润,弹性纤维减少,平滑肌纤维排列略紊乱;电针组较模型组膀胱颈组织炎症细胞浸润减少,平滑肌纤维排列趋于整齐,与既往研究结果一致^[10]。以上提示电针可有效改善 SSCI 后膀胱炎症等病理学改变,进而影响大鼠的膀胱排尿功能。

为进一步探讨电针治疗 T10 节段 SCI 后 NB 的损伤局部潜在靶点及神经修复机制,本研究提取了 T10-L2 脊髓组织,利用 TMT 定量蛋白质组学技术筛选出 T10-L2 脊髓组织中的 DEPs,发现模型组/假手术组与电针组/模型组之间共存在 6 个重叠的 DEPs,其中 5 个经电针治疗后被反向调控。对反转 DEPs 开展生物信息学分析,KEGG 结果多为神经系统中常见的信号通路,与中枢神经系统(central nervous system, CNS)的兴奋/抑制平衡、突触可塑性以及神经元之间的信息传递相关。而富集到的 Ras 信号通路和 PI3K-Akt 信号通路都与细胞增殖、生存、

凋亡及修复能力密切相关^[33-35]。GO 富集分析结果显示,SSCI 后反转 DEPs 主要集中在血管生成与修复、炎症与吞噬活性调节、免疫结合、氧化应激以及铁稳态失调等多个方面。组织形态学方面,模型组较假手术组 T10-L2 脊髓组织有神经元崩解现象,坏死后空洞增多,炎症细胞增生;电针组较模型组神经元崩解现象减少,水肿减轻,炎症细胞相对减少,与既往研究结果一致^[36]。这些结果为进一步阐明电针在 SCI 后神经功能重建中的分子机制提供了初步的线索。随后本研究通过筛选 T10-L2 脊髓组织的 5 个反转 DEPs 发现,Hrg^[37]、Fetub^[38]、Gng4^[39]与脊髓继发性损伤显著相关,而 α -半乳糖苷酶^[40]、半乳糖凝集素-5^[41]与本研究并无直接相关性,进而对 Hrg、Fetub、Gng4 进行 Western blot 验证,结果发现电针可降低 T10-L2 脊髓组织中 Hrg、Fetub 的表达,提高 Gng4 的表达,其蛋白表达趋势与 TMT 定量蛋白质组学结果一致。

脊髓局部神经元继发性坏死可加重大脑皮质高级中枢与脊髓排尿中枢的信号传导中断,不能有效控制脊髓排尿中枢而引起膀胱排尿功能障碍^[42]。神经炎症反应是引起神经元继发性坏死的重要原因^[43]。有证据表明,调节损伤局部的炎症微环境,可促进 SCI 后脊髓再生,抑制瘢痕组织形成^[44]。在本研究 T10-L2 脊髓组织的反转 DEPs 中,Hrg 经电针治疗后较模型组显著降低。Hrg 是一种在肝脏中产生的血浆糖蛋白,其多结构域结构可与一系列蛋白质相互作用,包括细胞内、细胞外和参与凝血级联反应的蛋白质^[45-46]。因此,Hrg 可参与防御细菌感染、调节凝血和纤维蛋白溶解、血管生成和炎症等多种 BP。此外,BARTNECK 等^[47]研究发现,Hrg 可促进肝巨噬细胞向 M1 表型极化,进而促进慢性肝损伤和纤维化进展。Western blot 验证结果也显示,电针组中 Hrg 的表达较模型组显著降低,提示电针可能通过抑制 Hrg 表达,减少巨噬细胞 M1 极化,从而减轻炎症反应并促进脊髓再生,改善膀胱的神经支配,最终影响膀胱功能活动。

细胞坏死和凋亡是 SCI 后的重要病理过程,因此,抑制细胞凋亡是改善 SCI 后继发性损伤的重要策略。在本研究 T10-L2 脊髓组织的反转 DEPs 中,Fetub 较模型组显著降低。研究发现,Fetub 过表达可启动细胞凋亡过程^[48]。同时,出血是 SCI 急性期的常见后果,巨噬细胞对红细胞的吞噬作用导致红细

胞中血红素的大部分铁被提取并储存在铁蛋白中,破坏铁的动态平衡,将氧化还原活性铁释放到周围组织中,从而导致氧化应激和铁死亡^[49-50]。本实验结果中,血红素输出、RNA 聚合酶 II 启动子对铁的反应调节转录在脊髓中显著富集,提示脊髓中铁代谢紊乱导致氧化应激。近期研究显示,Fetub 与氧化应激相互促进形成正反馈回路,从而导致细胞凋亡^[40,51]。Western blot 结果也显示,电针组中 Fetub 的表达较模型组显著降低,提示电针可能是通过抑制 Fetub 蛋白的表达,减轻脊髓组织中的氧化应激,抑制细胞凋亡,改善 SCI 后继发损伤,保护受损神经元,最终达到改善受累膀胱功能的目的。

Gng4 是 G 蛋白的 γ 亚基之一,在细胞信号转导中发挥重要作用。Gng4 参与 G 蛋白偶联受体(G protein-coupled receptor, GPCR)介导的信号转导,与 G 蛋白 α 亚基共同调控细胞内的环磷酸腺苷水平、钙离子浓度等关键细胞信号通路,影响神经元的兴奋性和突触传递^[52-54]。Gng4 在 CNS 表达较为广泛,与神经传递和突触功能密切相关。尿液的储存和释放高度依赖于 CNS 通路,SSCI 后 CNS 通路被切断,导致膀胱功能障碍。损伤后的脊髓需要通过神经可塑性来重建失去的神经功能,Gng4 会影响突触可塑性,促进新突触的形成并增强现有连接,这对于 SCI 后的功能恢复至关重要。KEGG 分析结果发现,Gng4 富集在 PI3K-Akt 信号通路中,其可通过激活 PI3K-Akt 信号通路,有助于增强神经元抗凋亡能力和促进轴突再生^[55]。Western blot 结果显示,Gng4 经电针治疗后在脊髓组织的表达升高,提示电针可能是通过上调 Gng4 来调控 GPCR 信号通路,增强神经元抗凋亡能力和促进轴突再生,从而恢复 CNS 通路对膀胱的控制,最终达到改善膀胱功能的目的。

4 结论

本次实验利用 TMT 定量蛋白质组学技术分析 T10-L2 脊髓组织中的 DEPs 表达情况,并对 DEPs 进行生物信息分析,初步认为电针治疗 T10 节段 SCI 后 NB、改善膀胱功能的可能机制为通过调控 T10-L2 脊髓组织中的关键差异蛋白(Hrg、Fetub、Gng4),抑制炎症反应、氧化应激与细胞凋亡,激活神经保护及轴突再生相关通路,从而减轻脊髓继发性损伤,促进神经功能重塑,降低膀胱颈阻力,并提高排尿效率。

本研究从蛋白质组学层面阐明了电针的神经保

护与修复机制,使用 Western blot 对 Gng4、Hrg 以及 Fetub 进行了验证,但未能对上述相关通路关键靶点设置激动剂或抑制剂,接下来的实验将进一步完善方案,展开更深层次的研究。

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] RODIC B, CURT A, DIETZ V, et al. Bladder neck incompetence in patients with spinal cord injury: Significance of sympathetic skin response[J]. *The Journal of Urology*, 2000, 163(4): 1223–1227.
- [3] ADOT ZURBANO J M, SALINAS CASADO J, VALER ALGARBEL J, et al. Functional participation of the T10–L2 sympathetic component in inferior urinary tract dynamics[J]. *Archivos Espanoles de Urologia*, 2003, 56(4): 385–400.
- [4] HU H Z, GRANGER N, JEFFERY N D. Pathophysiology, clinical importance, and management of neurogenic lower urinary tract dysfunction caused by suprasacral spinal cord injury [J]. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 2016, 30(5): 1575–1588.
- [5] KANNO H, OZAWA H, SEKIGUCHI A, et al. The role of mTOR signaling pathway in spinal cord injury [J]. *Cell Cycle*, 2012, 11(17): 3175–3179.
- [6] WANG J, ZHANG F, XU H C, et al. TLR4 aggravates microglial pyroptosis by promoting DDX3X-mediated NLRP3 inflammasome activation via JAK2/STAT1 pathway after spinal cord injury[J]. *Clinical and Translational Medicine*, 2022, 12(6): e894.
- [7] 唐丽亚, 瞿启睿, 吴霞, 等. 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.
- [8] 艾坤, 刘琼, 许明, 等. 电针对骶上脊髓损伤后神经源性膀胱尿流动力学及逼尿肌垂体腺苷酸环化酶激活肽/环磷酸腺苷/蛋白激酶 A 信号通路的影响[J]. *针刺研究*, 2021, 46(9): 728–734, 741.
- [9] 吕山河, 胡碧浓, 黄梓铭, 等. 电针对骶上脊髓损伤大鼠膀胱尿流动力学及逼尿肌肌电图振幅的影响[J]. *湖南中医药大学学报*, 2020, 40(11): 1355–1360.
- [10] 卓越, 艾坤, 许明, 等. 电针对骶上脊髓损伤后大鼠神经源性膀胱及血清外泌体 miRNA 差异表达的影响[J]. *中国康复医学杂志*, 2023, 38(5): 577–588.
- [11] 许明, 张泓, 尹秀婷, 等. 电针对骶上脊髓损伤后神经源性膀胱大鼠膀胱组织中 Cyt-C 和 Caspase-3, 9 的影响[J]. *世界针灸杂志(英文版)*, 2017, 27(3): 49–56.
- [12] SUN H, POUDEL S, VANDERWALL D, et al. 29–Plex tandem mass tag mass spectrometry enabling accurate quantification by interference correction[J]. *Proteomics*, 2022, 22(19/20): 2100243.
- [13] 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.
- [14] PAN L L, TIAN Y, SUN H Y, et al. TMT-based proteomics analysis reveals the efficacy of Jiangzhuo formula in improving the lipid profiles of dyslipidemia rats[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2021, 264: 113390.
- [15] TANG W F, DONG M, TENG F Z, et al. TMT-based quantitative proteomics reveals suppression of SLC3A2 and ATP1A3 expression contributes to the inhibitory role of acupuncture on airway inflammation in an OVA-induced mouse asthma model[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2021, 134: 111001.
- [16] WANG G, LI M Y, YU S, et al. Tandem mass tag-based proteomics analysis of type 2 diabetes mellitus with non-alcoholic fatty liver disease in mice treated with acupuncture[J]. *Bioscience Reports*, 2022, 42(1): BSR20212248.
- [17] 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.
- [18] 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.
- [19] SCHEFF S W, SAUCIER D A, CAIN M E. A statistical method for analyzing rating scale data: The BBB locomotor score[J]. *Journal of Neurotrauma*, 2002, 19(10): 1251–1260.
- [20] 艾坤, 许明, 刘琼, 等. 电针对骶上脊髓损伤后逼尿肌亢进大鼠逼尿肌中环腺苷酸和蛋白激酶 A 含量及肌球蛋白轻链激酶磷酸化的影响[J]. *中国康复理论与实践*, 2021, 27(2): 137–144.
- [21] 李忠仁. *实验针灸学* [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2007: 327–329.
- [22] HOU S P, RABCHEVSKY A G. Autonomic consequences of spinal cord injury [J]. *Comprehensive Physiology*, 2014, 4(4): 1419–1453.
- [23] 王利春, 胡非非, 张洪丽, 等. 针灸治疗脊髓损伤后神经源性膀胱概况[J]. *河北中医*, 2013, 35(7): 1093–1095.
- [24] STERNER R C, STERNER R M. Immune response following traumatic spinal cord injury: Pathophysiology and therapies[J]. *Frontiers in Immunology*, 2023, 13: 1084101.
- [25] CHIO J C T, PUNJANI N, HEJRATI N, et al. Extracellular matrix and oxidative stress following traumatic spinal cord injury: Physiological and pathophysiological roles and opportunities for therapeutic intervention[J]. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2022, 37(1/2/3): 184–207.
- [26] ANJUM A, YAZID M D, FAUZI DAUD M, et al. Spinal cord injury: Pathophysiology, multimolecular interactions, and underlying recovery mechanisms[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(20): 7533.
- [27] 李明娇, 唐成林, 杨祝款, 等. 电针调控 PPAR γ -CD36 信号通路降低 Hba-a1、Hbb-bt 表达减轻脊髓损伤后细胞凋亡的研究[J]. *重庆医科大学学报*, 2025, 50(3): 311–321.
- [28] ZHANG H C, QIN X Y, YUAN H, et al. Cathepsin L aggra-

- vates neuroinflammation via promoting microglia M1 polarization and NLRP3 activation after spinal cord injury[J]. *The FASEB Journal*, 2025, 39(9): e70561.
- [29] WANG Y, JIA X Y, ZHANG Y Q, et al. Hydrogen sulfide modulates microglial polarization and remodels the injury microenvironment to promote functional recovery after spinal cord injury[J]. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, 2025, 31(5): e70431.
- [30] 许明, 刘笑萌, 艾坤, 等. 电针对骶上脊髓损伤后神经源性膀胱大鼠膀胱功能及髓内 NGF 和 NT-3 的影响[J]. *湖南中医药大学学报*, 2021, 41(2): 252-258.
- [31] 许明, 艾坤, 邓石峰, 等. 电针对骶上脊髓损伤后逼尿肌反射亢进型大鼠尿流动力学及脊髓 Raf/MEK/ERK 信号通路的影响[J]. *针刺研究*, 2023, 48(10): 977-985.
- [32] 许明, 艾坤, 卓越, 等. 电针对骶上脊髓损伤后神经源性膀胱大鼠尿流动力学及脊髓组织 ERK/CREB/Bcl-2 通路表达的影响[J]. *中国中医药信息杂志*, 2024, 31(4): 100-105.
- [33] ZAVVARIAN M M, MODI A D, SADAT S, et al. Translational relevance of secondary intracellular signaling cascades following traumatic spinal cord injury[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2024, 25(11): 5708.
- [34] CHEN Y H, HSU C, CHEN X P, et al. Editorial: Regulation of PI3K/Akt signaling pathway: A feasible approach for natural neuroprotective agents to treat various neuron injury-related diseases[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2023, 14: 1134989.
- [35] ZHONG J. RAS and downstream RAF-MEK and PI3K-AKT signaling in neuronal development, function and dysfunction[J]. *Biological Chemistry*, 2016, 397(3): 215-222.
- [36] 李晓宁, 田秀燕, 唐祎周. 夹脊电针对急性脊髓损伤大鼠炎症因子表达的影响[J]. *针灸临床杂志*, 2022, 38(3): 50-55.
- [37] JOHN M, MARIA E, DAS S, et al. Identification of novel serum proteins associated with myelination and cholesterol transport in neuromyelitis optica spectrum disorders by mass spectrometry[J]. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 2022, 37(3): 275-284.
- [38] LIN K, WANG X C, GU T, et al. Plasma fetuin-B levels are associated with nervous symptoms and conduction velocity in patients with painful DPN[J]. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity*, 2025, 18: 785-793.
- [39] KO S H, APPLE E C, LIU Z J, et al. Age-dependent autophagy induction after injury promotes axon regeneration by limiting NOTCH[J]. *Autophagy*, 2020, 16(11): 2052-2068.
- [40] THOMPSON S E, ROY A, GEBERHIWOT T, et al. Fabry disease: Insights into pathophysiology and novel therapeutic strategies[J]. *Biomedicine*, 2025, 13(3): 624.
- [41] GITT M A, WISER M F, LEFFLER H, et al. Sequence and mapping of galectin-5, a beta-galactoside-binding lectin, found in rat erythrocytes[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1995, 270(10): 5032-5038.
- [42] YANG Y D, YU X, WANG X M, et al. Tanshinone II A improves functional recovery in spinal cord injury-induced lower urinary tract dysfunction[J]. *Neural Regeneration Research*, 2017, 12(2): 267-275.
- [43] 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.
- [44] GAO X, HAN Z H, HUANG C, et al. An anti-inflammatory and neuroprotective biomimetic nanoplateform for repairing spinal cord injury[J]. *Bioactive Materials*, 2022, 18: 569-582.
- [45] BLANK M, SHOENFELD Y. Histidine-rich glycoprotein modulation of immune/autoimmune, vascular, and coagulation systems[J]. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, 2008, 34(3): 307-312.
- [46] ROCHE F, SIPILA K, HONJO S, et al. Histidine-rich glycoprotein blocks collagen-binding integrins and adhesion of endothelial cells through low-affinity interaction with $\alpha 2$ integrin[J]. *Matrix Biology*, 2015, 48: 89-99.
- [47] BARTNECK M, FECH V, EHLING J, et al. Histidine-rich glycoprotein promotes macrophage activation and inflammation in chronic liver disease[J]. *Hepatology*, 2016, 63(4): 1310-1324.
- [48] ZHAN K, LIU R, TONG H, et al. Fetuin B overexpression suppresses proliferation, migration, and invasion in prostate cancer by inhibiting the PI3K/AKT signaling pathway[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2020, 131: 110689.
- [49] RYAN F, BLEX C, NGO T D, et al. Ferroptosis inhibitor improves outcome after early and delayed treatment in mild spinal cord injury[J]. *Acta Neuropathologica*, 2024, 147(1): 106.
- [50] XIA M J, ZHANG Q Y, ZHANG Y N, et al. Growth differentiation factor 15 regulates oxidative stress-dependent ferroptosis post spinal cord injury by stabilizing the p62-Keap1-Nrf2 signaling pathway[J]. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 2022, 14: 905115.
- [51] CAMILLIERE M, VERDE M R, WOLIN M S, et al. Fetuin-B and oxidative stress disrupt placental trophoblasts during maternal undernourishment[J]. *Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 2025, 45(1): 2460545.
- [52] ROSENTHAL W, SCHULTZ G. Functional guanine nucleotide-binding proteins in receptor-mediated modulation of voltage-dependent ion channels[J]. *Klinische Wochenschrift*, 1988, 66(13): 557-564.
- [53] GONZALEZ-HERNANDEZ A J, MUNGUBA H, LEVITZ J. E. Emerging modes of regulation of neuromodulatory G protein-coupled receptors[J]. *Trends in Neurosciences*, 2024, 47(8): 635-650.
- [54] GERBER K J, SQUIRES K E, HEPLER J R. Roles for regulator of G protein signaling proteins in synaptic signaling and plasticity[J]. *Molecular Pharmacology*, 2016, 89(2): 273-286.
- [55] 李娟娟, 黄越, 王雅禾, 等. 基于全长转录组分析探讨熊果酸抗癫痫和神经保护的机制[J]. *中国药科大学学报*, 2024, 55(4): 512-521.