

线粒体自噬调控脊髓损伤的机制及潜在治疗靶点

吴欣¹, 卢枫^{2,3}, 王力峰^{2,3}, 张雨¹, 邱嘉欣¹, 韩乐¹, 谢海玉^{2,3}

(1. 赣南医科大学第一临床医学院; 2. 赣南医科大学第一附属医院麻醉手术中心;

3. 赣州市麻醉学重点实验室, 江西 赣州 341000)

摘要:目的: 研究线粒体自噬在脊髓损伤(Spinal cord injury, SCI)治疗中的作用机制与潜在靶点, 以明确其治疗潜力, 从而为改善SCI预后提供新策略。方法: 从GEO数据库中小鼠脊髓数据集GSE5296和GSE47681获取表达谱数据, 用于识别SCI与线粒体自噬相关基因间的差异表达基因(Differentially expressed genes, DEGs)。通过通路富集分析揭示DEGs的功能特征, 构建蛋白质-蛋白质相互作用网络, 并系统解析SCI微环境中的免疫细胞浸润特征。采用受试者工作特征(Receiver operating characteristic, ROC)曲线分析DEGs在SCI诊断中的效能。进一步通过逆转录定量聚合酶链反应(Quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)技术验证关键差异表达基因的转录水平, 并借助蛋白质印迹法(Western blot)检测相关蛋白的表达水平, 以综合评估其生物学意义。结果: 筛选出55个与SCI和线粒体自噬相关的DEGs, 其富集的信号通路炎症、凋亡和细胞存活密切相关。基于PPI网络筛选出6个关键基因(*Ulk1*、*Atg14*、*Map1lc3b*、*Gabarap*、*Gabarapl2*和*Fundc1*), qRT-PCR分析结果显示, *Atg14*、*Map1lc3b*和*Gabarapl2*表达下调, *Gabarap*表达上调。免疫浸润分析显示, 脊髓损伤后, 10种免疫细胞丰度显著改变, 其中中性粒细胞与M0巨噬细胞呈显著负相关($r=-0.56, P<0.05$), *Gabarap*与M0巨噬细胞呈显著正相关($r=0.58, P<0.05$), *Gabarapl2*与M0巨噬细胞呈显著负相关($r=-0.56, P<0.05$)。Western blot结果显示, SCI后NF- κ B和p-ERK表达增加。结论: 通过验证关键基因并识别免疫细胞的相互作用, 确定了线粒体自噬在SCI治疗中的潜在靶点, 为后续开发有效的SCI治疗方案指明了方向。

关键词: 线粒体自噬; 脊髓损伤; 生物标志物; 免疫细胞浸润; 分子验证; 受试者工作特征曲线

中图分类号: R338 文献标志码: A 文章编号: 2097-7174(2026)01-0016-10

DOI: 10.3969/j.issn.2097-7174.2026.01.003

Mechanisms and potential therapeutic targets of mitophagy regulation in spinal cord injury

WU Xin¹, LU Feng^{2,3}, WANG Lifeng^{2,3}, ZHANG Yu¹, QIU Jiabin¹, HAN Le¹, XIE Haiyu^{2,3}

(1. The First Clinical Medical School of Gannan Medical University; 2. Anesthesia Surgery Center of The First Affiliated Hospital, Gannan Medical University; 3. Ganzhou Key Laboratory of Anesthesiology, Ganzhou, Jiangxi 341000)

Abstract: Objective: To explore the mechanisms and potential targets of mitophagy in the treatment of spinal cord injury (SCI) to clarify its therapeutic potential, thereby providing novel strategies for improving the prognosis of SCI. **Methods:** Expression profiles were obtained from the Gene Expression Omnibus (GEO) mouse and spinal cord datasets GSE5296 and GSE47681 to identify differentially expressed genes (DEGs) between SCI and mitophagy-related genes. Analyzed DEGs for pathway enrichment, constructed protein-protein interaction networks, and analyzed immune cell infiltration patterns in SCI. Receiver operating characteristic (ROC) curve analysis was used to evaluate the diagnostic value of DEGs in SCI. Verified the expression levels of key DEGs with reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR). Analyzed protein levels with western blotting to comprehensively evaluate its biological significance. **Results:** We identified 55 DEGs associated with SCI and mitophagy, with their enriched signaling pathways closely related to inflammation, apoptosis, and cell survival. Six key genes were identified (*Ulk1*, *Atg14*, *Map1lc3b*, *Gabarap*, *Gabarapl2*,

基金项目: 江西省教育厅科学技术研究项目(编号: GJJ201505)

通信作者: 谢海玉, 女, 硕士, 主任医师, 副教授, 硕士生导师, 研究方向: 临床麻醉研究。E-mail: gyfyxhy@163.com

and *Fundc1*). The qRT-PCR analysis results showed that the expression of *Atg14*, *Map1lc3b*, and *Gabarapl2* was downregulated, while the expression of *Gabarap* was upregulated. Immune infiltration analysis revealed significant alterations in the abundance of 10 immune cell types after spinal cord injury. Among these, neutrophils showed a strong negative correlation with M0 macrophages ($r=-0.56, P<0.05$). Meanwhile, *Gabarap* was significantly positively correlated with M0 macrophages ($r=0.58, P<0.05$), while *Gabarapl2* was significantly negatively correlated with M0 macrophages ($r=-0.56, P<0.05$). Western blot results indicated increased expression of NF- κ B and p-ERK following SCI. **Conclusion:** By validating the hub genes and identifying immune cell interactions, the potential targets of mitochondrial autophagy in SCI treatment were identified, which pointed out the direction for the subsequent development of effective SCI treatment.

Key words: Mitochondrial autophagy; Spinal cord injury; Biomarkers; Immune cell infiltration; Molecular verification; Receiver operating characteristic curve

脊髓损伤(Spinal cord injury, SCI)属于中枢神经系统创伤性疾病,其不仅引发感觉、运动及自主神经功能异常,还常伴随高致死率和高致残率^[1]。SCI患者常出现长期的体感功能障碍、运动功能障碍、括约肌收缩和舒张功能受损、自主功能障碍以及神经病理性疼痛等^[2]。目前,SCI的主要临床干预措施包括早期手术减压、维持脊髓适当灌注、药物治疗、电刺激、康复训练和细胞治疗等,但SCI的预后仍不佳^[3]。

SCI的分子作用机制包含原发性损伤与继发性损伤2个关键病理进程。原发性损伤是由外部因素(如脊髓创伤、压迫或牵拉)直接引起的机械性损伤,这种创伤破坏了细胞完整性,导致离子失衡、细胞死亡和轴突断裂,同时,早期即可观察到炎症细胞浸润与细胞因子释放等免疫反应。继发性损伤则是在原发性损伤基础上启动的一系列病理生理过程,主要包括细胞凋亡、神经退行性变以及胶质细胞异常增殖等^[4]。在损伤区域,血管收缩与局部缺氧共同破坏细胞结构完整性,进而触发大量自由基和炎症因子的释放,这一过程不仅引起线粒体膜氧化损伤,还导致细胞内钙离子超载,最终引发线粒体功能障碍并促使细胞凋亡^[5]。

线粒体自噬通过溶酶体靶向降解受损线粒体,可调控氧化应激与炎症反应通路^[6-7]。现有治疗策略(如增强线粒体抗氧化能力或调节钙稳态)虽能部分减轻线粒体损伤并保护神经功能,却未能针对受损线粒体清除的关键机制进行干预^[8]。尽管线粒体自噬在神经退行性疾病和癌症等领域已有研究积累^[9-10],但其在脊髓损伤中的动态调控规律、作用机制和治疗潜力仍未明确。本研究运用生物信息学方法,旨在阐明线粒体自噬相关基因在脊髓损伤中的调控机制与功能角色,识别出潜在的治疗靶点,为后续开发针对线粒体自噬的脊髓损伤治疗策略提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 数据来源 本研究通过R包GEOquery从基因表达数据库(Gene expression omnibus, GEO)获取SCI数据集GSE5296和GSE47681,基于GeneCards和既往研究筛选130个人源线粒体自噬基因(Mitophagy-related genes, MRGs),经homologene跨物种转换,获得115个小鼠同源MRGs;采用sva和limma包对数据集进行批次效应校正,构建79例SCI与51例对照的标准化矩阵,再通过主成分分析(Principal component analysis, PCA)验证表达矩阵中批次效应的消除效果。

1.2 SCI相关线粒体自噬差异表达基因(Mitophagy-related differentially expressed genes, MRDEGs)的鉴定及通路富集分析 本研究将样本分为SCI组和对照组,基于Benjamini-Hochberg校正的 $P<0.05$ 筛选显著差异表达基因(Differentially expressed gene, DEGs),并通过logFC值的正负($\logFC>0$)区分基因表达方向。采用ggplot2工具生成火山图,并对DEGs与线粒体自噬相关基因进行了交集分析,成功筛选出一组SCI相关MRDEGs。随后通过热图展示对这些MRDEGs进行可视化呈现。同时还运用京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)和基因本体论(Gene ontology, GO)数据库结合R包clusterProfiler对目标基因进行了功能富集分析,统计学显著性设置为 $P<0.05$,假发现率(False discovery rate, FDR) <0.25 。涵盖生物过程(Biological process, BP)、细胞组分(Cellular component, CC)和分子功能(Molecular function, MF)3个部分。

1.3 基因集富集分析(Gene set enrichment analysis, GSEA) 采用GSEA按logFC排序的基因列表,通过clusterProfiler工具进行功能富集评估,

参数设定为种子数2 020、置换计算1 000次、基因集规模10~500,其分析依托分子标志物数据库完成。

1.4 蛋白质-蛋白质相互作用 (Protein-protein interaction, PPI)网络分析及关键基因筛选 基于PPI网络的拓扑特性,解析蛋白质分子间的相互作用关系可间接反映基因功能关联。本研究将最小相互作用分数大于0.900的MRDEGs作为构建PPI网络的标准。应用Cytoscape软件的CytoHubba插件中的5种算法:Maximal clique centrality (MCC)、Degree、Stress、Edge percolated component (EPC)、Closeness对MRDEGs进行评分排序,并通过5种算法结果的交集筛选枢纽基因,使用维恩图可视化交叉分析结果。

1.5 差异表达验证及受试者工作特征 (Receiver operating characteristic, ROC)曲线分析 关键基因的ROC曲线通过R包pROC构建,同时进行组间差异表达分析,并计算曲线下面积(Area under the curve, AUC)。AUC>0.9表示具有较高准确性。

1.6 免疫浸润分析 通过CIBERSORT对表达

矩阵中的免疫细胞类型进行解卷积分析。 $P<0.05$ 的细胞通过ggplot2进行可视化,并使用Spearman相关性评估基因与免疫细胞之间的关系。

1.7 实验动物 选取7~8周龄(体重30~35 g)的SPF级健康雌性昆明小鼠,分为假手术组与SCI组。所有动物实验方案均获得中南大学湘雅医学院伦理审查委员会的批准(批准号:014861,中国长沙),并严格遵循国际疼痛研究协会的操作指南。本研究采用脊髓半横断损伤(半切SCI)模型。假手术组小鼠接受了与SCI组相同的手术程序,但未诱导脊髓半横断。2组小鼠均在建模后第7 d被处死以进行后续实验。

1.8 RNA提取及逆转录聚合酶链反应 取小鼠脊髓组织半切块,采用TRIzol法提取总RNA。随后,使用FastQuant RT试剂盒将RNA反转录为cDNA。以cDNA为模板,使用SYBR Premix Ex Taq试剂盒在实时荧光定量PCR仪上进行扩增与检测,以*Gapdh*为内参基因计算目标基因的表达水平。引物序列参见表1。

表1 引物序列

| 引物 | 序列(正向5'→3') | 序列(反向5'→3') |
|------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| <i>Fundc1</i> | CGAGCAAATAAAGCAGCACCTGAA | CTTCTCAATTATATTGTGATTT |
| <i>Ulk1</i> | TTGTAATGCTGGAGACCTGGCTGA | GACGCCGCCGCGCCCGGCTCCAT |
| <i>Map1lc3b</i> | CTCAATGCTAACCAAGCCTTCTTC | TTATCTTGATGAGCTCGCTCATGT |
| <i>Gabarap</i> | ATGAAGAAGACTTCTTTCTATAC | GTGCTGAAGATGCCTTGTTTTTTC |
| <i>Atg14</i> | CTCAATGCTAACCAAGCCTTCTTC | TCCCTTCCCACTGGGAGACGCCAT |
| <i>Gabarapl2</i> | AGATTGTTGACATAGACAAGAGG | CCTCTTGTCTATGTCAACAATCT |
| <i>Gapdh</i> | CGACTTCAACAGCAACTCCCCTCTTCC | TGGGTGGTCCAGGGTTTCTTACTCCTT |

1.9 蛋白质免疫印迹法 (Western blot) 采用含蛋白酶/磷酸酶抑制剂的RIPA裂解液从脊髓半切组织中提取总蛋白,经冰上匀浆(30 s)、冰浴裂解(30 min)及4℃离心(12 000 rpm, 30 min)后,通过BCA法定量并取30 μg蛋白进行SDS-PAGE电泳(120 V, 90 min)。蛋白质转印至PVDF膜(100 V, 1 h),5%脱脂牛奶-PBS-T封闭后,依次与一抗(NF-κB、ERK、p-ERK、β-微管蛋白)4℃孵育过夜、二抗室温孵育2 h,Clarity Western ECL显影后经ChemiDoc成像系统采集,最终由ImageJ软件定量分析。

1.10 统计学处理 数据采用R软件(版本4.3.0)进行分析。2组独立样本的比较,符合正态分布时采用t检验,不符合正态分布时采用Mann-Whitney U检验;多组间比较采用Kruskal-Wallis检验。相

关性分析采用Spearman秩相关。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算相对基因表达水平。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

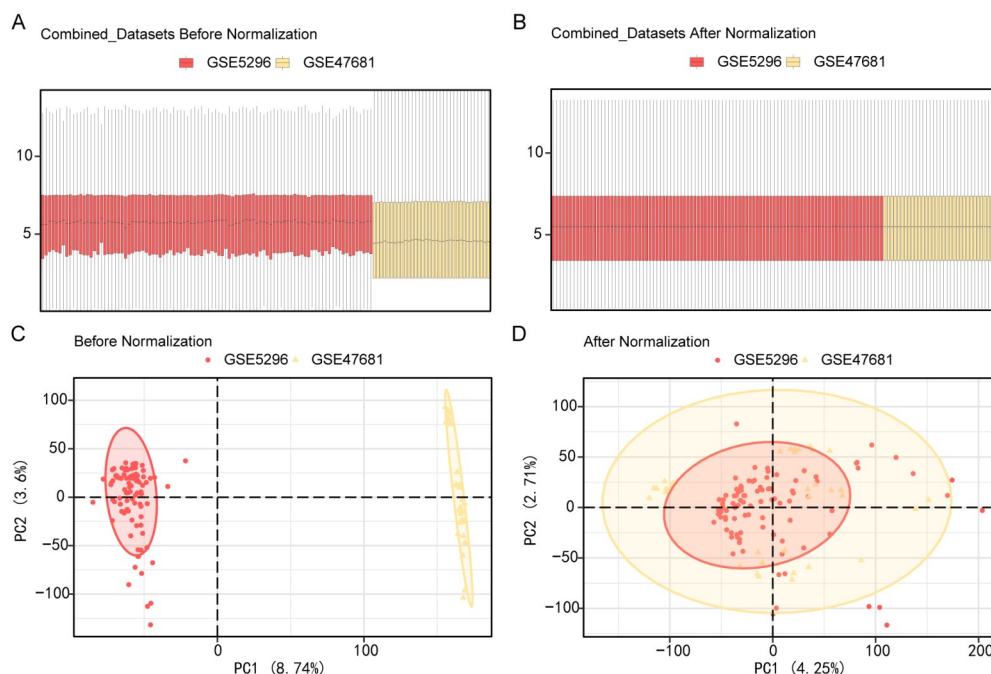
2 结果

2.1 数据预处理 利用R包sva对SCI数据集GSE5296和GSE47681的批次效应进行校正,获得合并后的GEO数据集。基于箱线图与PCA图的分析结果显示,经过批次效应校正处理后,SCI数据集中的批次效应已被有效消除(图1)。

2.2 SCI相关线粒体自噬差异表达基因 (MRDEGs) 将整合后的GEO数据集分为SCI组和对照组样本。差异分析筛选出 $P<0.05$ 的DEGs,并通过logFC值区分上下调基因($|\logFC|>0$),共获得8 489个DEGs。其中,上调基因3 334个,下调基因

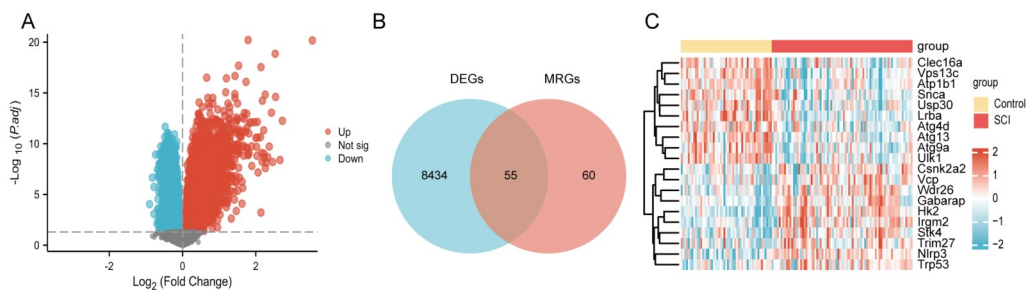
5 155 个。采用火山图可视化 DEGs 的分布特征 (图 2A), 通过上述 DEGs 与 MRGs 进行交集分析, 筛选出 SCI 相关的 MRDEGs, 并利用维恩图展示基因交集结果 (图 2B), 最终, 共筛选出 55 个 MRDEGs。

进一步分析在不同样本组中, 整合 GEO 数据集中排名前 10 的上调和下调 MRDEGs, 利用 R 包 pheatmap 生成热图进行可视化 (图 2C)。



A. 批次校正前整合 GEO 数据集分布的箱线图; B. 批次校正后整合 GEO 数据集分布的箱线图; C. 批次校正前数据集的二维 PCA 图; D. 批次校正后数据集的二维 PCA 图。红色表示 SCI 数据集 GSE5296, 黄色表示 SCI 数据集 GSE47681。

图 1 GEO 数据集 GSE5296 与 GSE47681 的批次效应校正



A. 展示 SCI 组和对照组样本中 DEGs 的分布情况的火山图。图中红色点表示上调基因, 蓝色点表示下调基因, 灰色点表示未显著差异的基因; B. 维恩图: 展示 DEGs 与 MRGs 的交集; C. 热图: 展示整合 GEO 数据集中排名前 10 的上调和下调 MRDEGs 的表达水平, 热图中的红色方块表示高表达水平, 蓝色方块表示低表达水平。

图 2 差异表达基因分析

2.3 蛋白质-蛋白质相互作用网络构建及关键基因筛选 利用 STRING 数据库构建了包含 55 个 MRDEGs 的 PPI 网络 (图 3), 结果显示其中 31 个 MRDEGs 之间存在相互关联。随后, 采用 Cytoscape 的 CytoHubba 插件中的 5 种算法 (MCC、degree、MNC、EPC 和 closeness) 对这 31 个 MRDEGs 的得分进行计算, 并基于这些算法的结果分别构建 PPI 网络。最终, 通过维恩图可视化所有 5 种算法共同

识别的基因, 以便进一步分析。这些交集基因包括 6 个关键基因: *Ulk1*、*Atg14*、*Map1lc3b*、*Gabarap*、*Gabarap2* 和 *Fundc1*, 它们是与线粒体自噬相关的关键基因。这些关键基因可能通过协同作用调控线粒体自噬的核心生物学过程。

2.4 基于 MRDEGs 的功能富集分析 对 55 个 MRDEGs 进行 GO 和 KEGG 富集分析 (图 4A)。GO 富集分析结果显示, 在生物过程层面, MRDEGs 显著

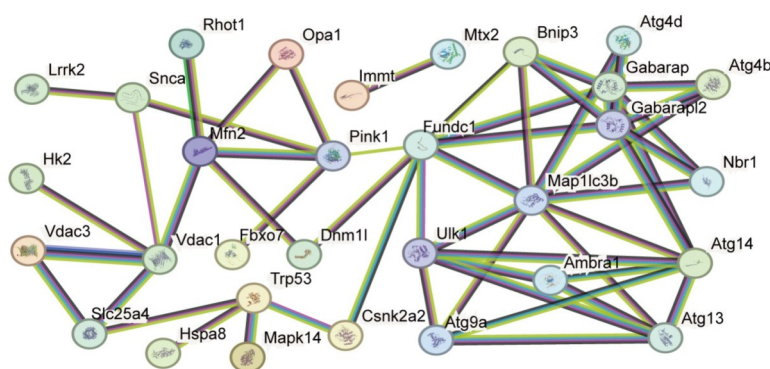
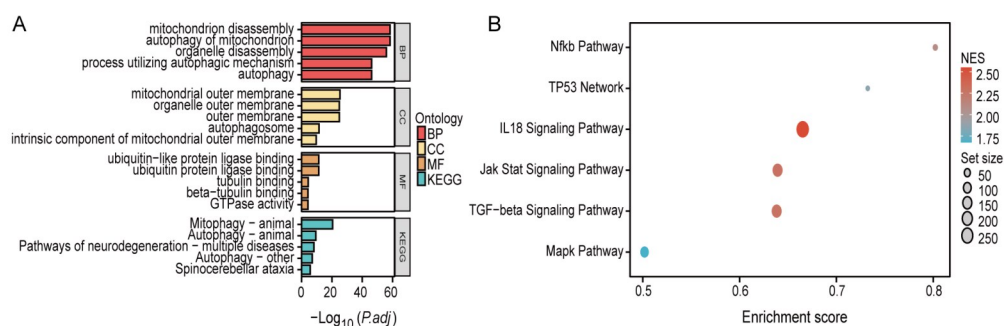


图3 差异表达基因的PPI网络

富集于线粒体动态调控相关通路,具体涉及线粒体自噬、细胞器解聚以及基于自噬机制的线粒体结构解体等过程。这些基因影响的主要细胞组分包括线粒体外膜、细胞器外膜、自噬体以及线粒体外膜的内层组分。此外,MRDEGs还涉及泛素蛋白连接酶结合活性、微管蛋白特异性结合以及 β -微管蛋白与三磷酸鸟苷酶活性协同作用分子功能。根据KEGG通路富集分析,这些基因富集于线粒体自噬

调控、神经退行性疾病通路以及脊髓小脑共济失调等关键通路。

MRDEGs显著富集于IL-18信号通路、JAK-STAT信号转导通路、TGF- β 通路、NF- κ B转录调控网络、TP53介导的细胞周期调控以及MAPK级联反应等关键通路(图4B)。这些特征表明炎症通路在SCI发病过程中扮演重要角色。



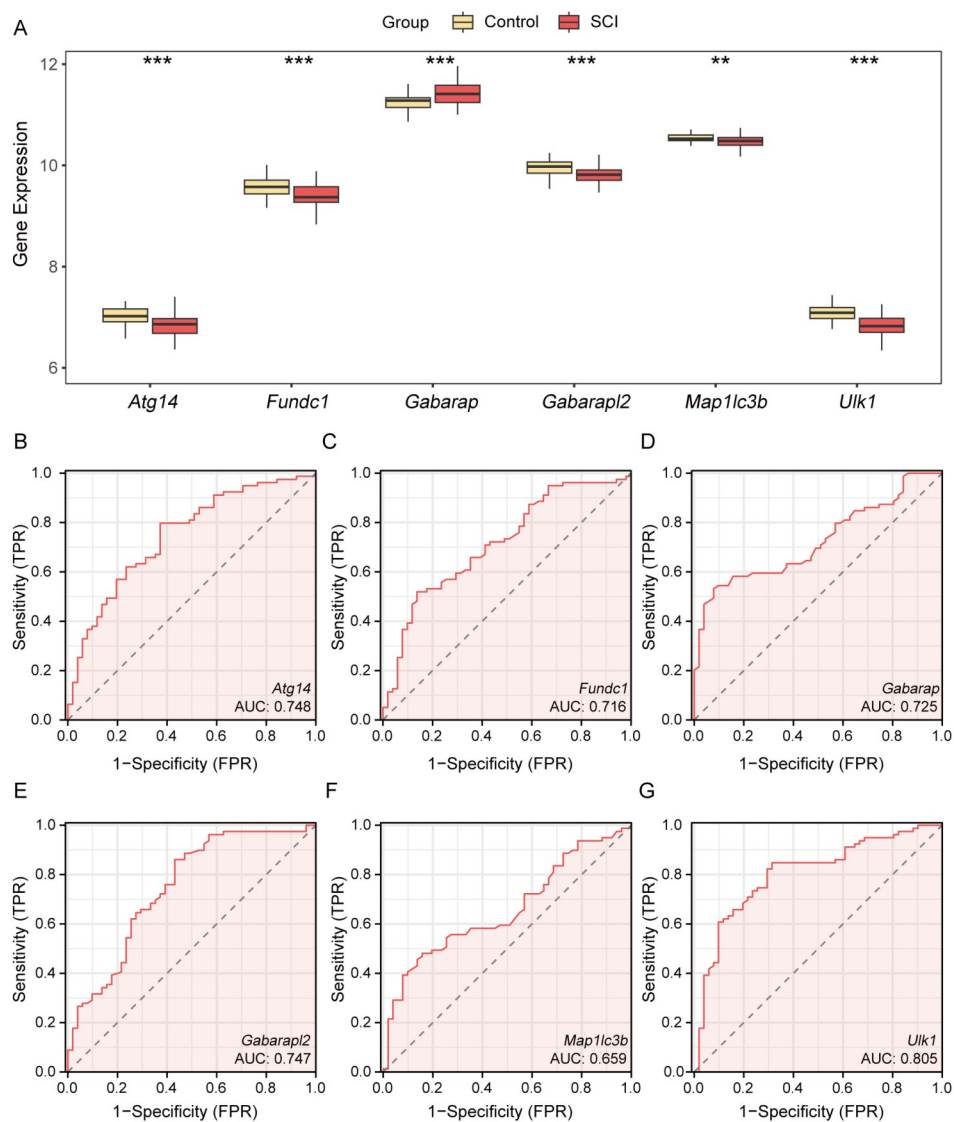
A. MRDEGs的GO/KEGG条形图;B. 整合数据集的GSEA结果的生物学功能气泡图。气泡的大小表示富集基因的数量,气泡的颜色表示标准化富集分数(NES)的大小。气泡越红表示NES值越高,气泡越蓝表示NES值越低。BP:生物过程,CC:细胞成分, MF:分子功能。

图4 MRDEGs的GO/KEGG富集分析及整合数据集的GSEA

2.5 ROC曲线评估诊断效能 *Atg14*、*Fundc1*、*Gabarapl2*、*Map1lc3b*、*Ulk1*表达下调,*Gabarap*表达上调(图5A)。基于ROC曲线(图5B、5C、5D、5E、5F、5G)结果显示,*Atg14*、*Fundc1*、*Gabarap*、*Gabarapl2*和*Ulk1*区分SCI样本与对照样本的AUC值为0.7~0.9,可能作为潜在的SCI血清生物标志物,*Map1lc3b*的区分SCI样本与对照样本的AUC值为0.659,提示其单独应用的局限性,可能需要联合其他指标提升诊断特异性。

2.6 SCI的免疫浸润分析 通过对包含25种不同

免疫细胞类型的整合GEO数据集,采用CIBERSORT算法进行免疫细胞浸润丰度分析。研究绘制了条形图(图6A)直观展示整合数据集中各类免疫细胞的比例分布。此外,比较整合GEO数据集中SCI样本与对照样本之间免疫细胞浸润丰度的表达差异(图6B)。分析结果显示,SCI样本与对照样本之间10种免疫细胞类型的表达水平差异有统计学意义($P<0.05$)。SCI样本与对照样本之间,活化树突状细胞、未成熟树突状细胞和滤泡辅助性T细胞的表达水平差异有统计学意义($P<0.05$);而M2巨噬



A. 6个关键基因(*Atg14*、*Fundc1*、*Gabarap*、*Gabarapl2*、*Map1lc3b*、*Ulk1*)的SCI与对照样本组间比较图,红色:SCI组,黄色:对照组;B~G. 基于*Atg14*、*Fundc1*、*Gabarap*、*Gabarapl2*、*Map1lc3b*、*Ulk1*的表达水平绘制ROC曲线。** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

图5 差异表达验证及ROC曲线分析

细胞和静息自然杀伤细胞在2组间的表达差异有统计学意义($P < 0.01$)。此外,M0巨噬细胞、中性粒细胞、浆细胞、CD4初始T细胞以及辅助性T细胞17(T helper cell 17, Th17)在SCI样本与对照组之间的表达差异也有统计学意义($P < 0.001$)。为探究免疫细胞浸润丰度间的相关性,本研究构建了相关性热图(图6C),结果显示,中性粒细胞与浆细胞呈强正相关($r = 0.39$),而中性粒细胞与M0巨噬细胞之间则存在最强的负相关性($r = -0.56$)。

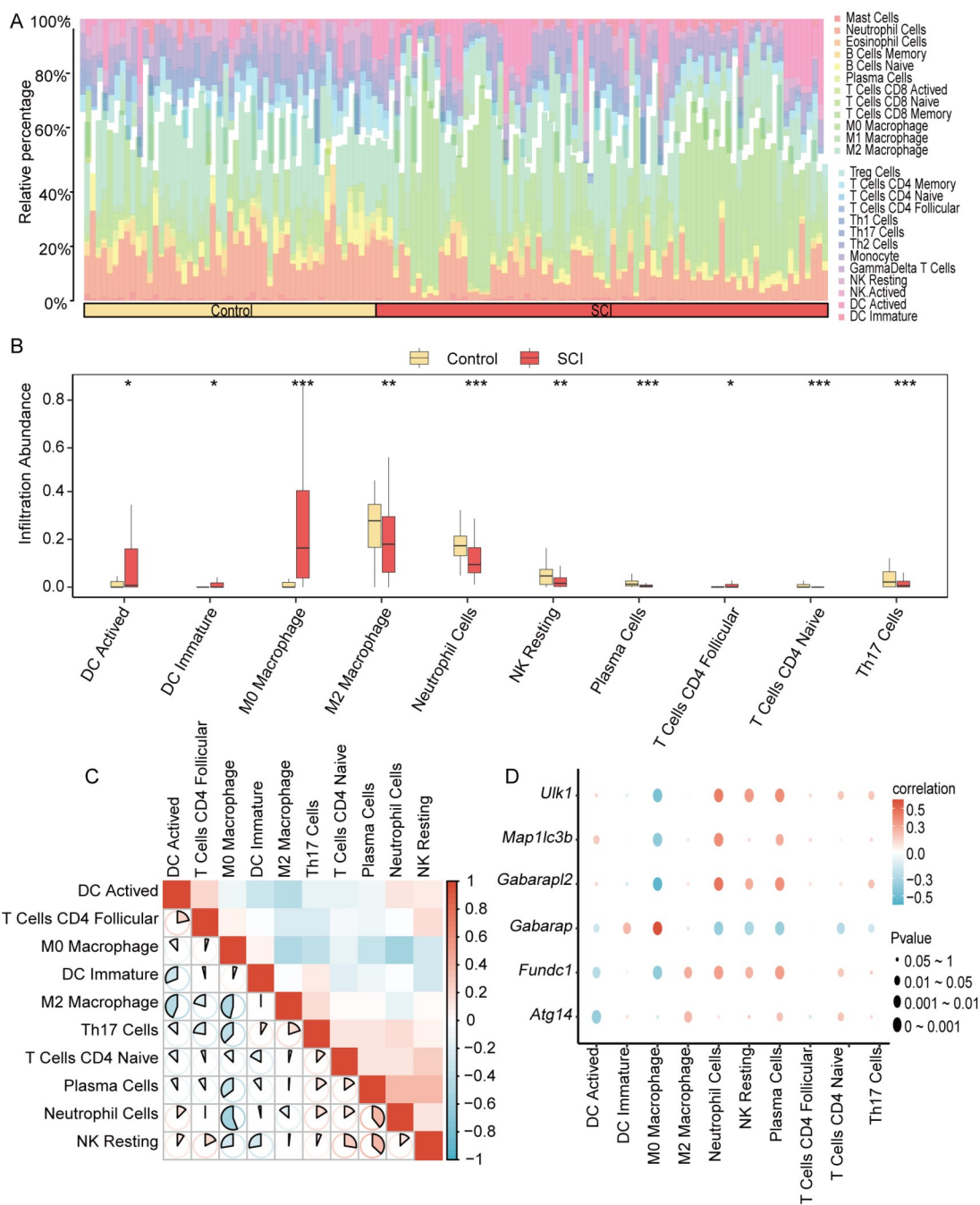
最后,通过相关性气泡图(图6D)展示整合GEO数据集中关键基因与免疫细胞浸润丰度之间的关系。分析发现,*Gabarap*与M0型巨噬细胞的丰度之

间存在最显著的正相关性($r = 0.58$, $P < 0.05$),而*Gabarapl2*与M0型巨噬细胞的丰度之间存在最显著的负相关性($r = -0.56$, $P < 0.05$)。

上述结果提示,这些MRDEGs可能在SCI中具有免疫调节作用,影响着SCI的免疫微环境。

2.7 使用小鼠SCI模型验证关键MRDEGs及相关信号通路

本研究利用小鼠脊髓组织验证了关键MRDEGs的表达水平。qRT-PCR分析显示,SCI组中*Atg14*、*Map1lc3b*和*Gabarapl2*的mRNA表达水平显著低于假手术组,而*Fundc1*、*Ulk1*和*Gabarap*表达显著上调(图7A~7F)。Western blot结果显示,SCI组中p-ERK和NF- κ B表达增加(图7H、7I)。



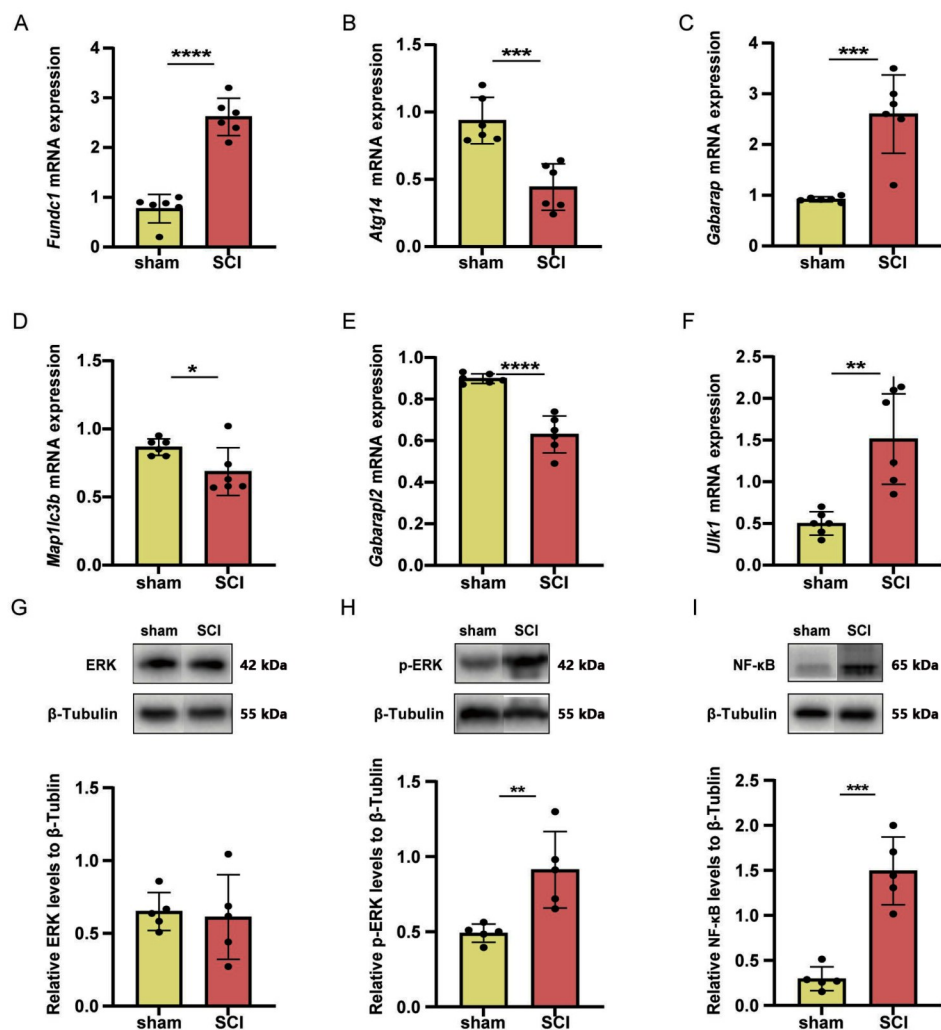
A. 整合 GEO 数据集中免疫细胞比例条形图; B. 2 组样本在不同免疫细胞的浸润丰度; C. 整合 GEO 数据集中免疫细胞浸润丰度的相关热图; D. 气泡图: 展示了 *Atg14*、*Fundc1*、*Gabarap*、*Gabarap2*、*Map1lc3b*、*Ulk1* 与免疫细胞浸润丰度的相关性。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。C、D 中的蓝色代表负相关, 红色代表正相关, 颜色深浅反映相关性强弱。

图6 免疫浸润分析

3 讨论

本研究旨在探讨 SCI 与线粒体自噬的关联, 以揭示 SCI 的分子机制。基于功能富集分析, 本研究筛选出的 55 个在 SCI 与线粒体自噬间具有共同关联的 DEGs, 主要富集于自噬相关的生物学过程, 表明线粒体自噬可能在 SCI 的病理过程中发挥重要作用。

本研究进一步分析发现, 这些 DEGs 还富集于 IL-18、JAK-STAT、TGF- β 、NF- κ B、TP53 和 MAPK 等信号通路。这些通路的失调与炎症、凋亡和细胞存活等过程密切相关, 表明它们可能在 SCI 中调节线粒体自噬^[11-12]。本研究 Western blot 结果也显示, SCI 后 NF- κ B 和 p-ERK 的表达增加。研究发现, 直接在脊髓中抑制 NF- κ B 信号通路可抑制小胶质细胞表达促炎细胞



A、B、C、D、E、F:qRT-PCR 检测小鼠脊髓组织中 *Fundc1*、*Atg14*、*Gabarap*、*Map1lc3b*、*Gabarapl2*、*Ulk1* 的 mRNA 表达水平;G、H、I: Western blot 检测小鼠脊髓组织中 ERK、p-ERK、NF-κB 的蛋白质含量,以 β-Tubulin 作为内参。* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$ 。

图7 使用小鼠SCI模型验证关键MRDEGs及相关信号通路

因子,从而减轻由炎症引起的继发性损伤^[13]。据报道,MAPK 信号通路的激活可促进 NF-κB 的激活,从而引发 SCI 中的后续炎症反应^[14]。这种激活也是 SCI 诱导炎症的关键机制。在 MAPK 信号通路中,ERK 的磷酸化可促进促炎细胞因子的释放,并触发一系列细胞死亡反应^[15]。另一项研究表明,抑制 P38 MAPK 的活性可抑制 NF-κB 的活性,提示 P38 MAPK 在炎症反应中正向调节 NF-κB 的活性^[16]。因此,NF-κB 和 MAPK 通路可能共同促进了 SCI 继发性损伤中的炎症增加。

本研究构建了 PPI 网络,筛选出 6 个在 SCI 后调节线粒体自噬的关键基因 (*Atg14*、*Map1lc3b*、*Gabarap*、*Gabarapl2*、*Fundc1* 和 *Ulk1*),并利用小鼠 SCI 模型验证了这 6 个基因的表达水平,体外实验

进一步确认了其中 4 个基因 (*Atg14*、*Map1lc3b*、*Gabarap* 和 *Gabarapl2*) 的表达与生物信息学分析结果一致。GABARAP 是一种自噬相关蛋白,在缺血条件下其表达发生改变,并可能在脊髓缺血期间调节自噬,其与 B 细胞淋巴瘤-2 的相互作用表明对延缓运动神经元死亡具有保护作用^[17]。ATG14 是自噬体形成和成熟的关键调控蛋白,其稳定性主要通过 K6、K11 和 K63 链介导的泛素化修饰调控^[18-19]。MAP1LC3B 是自噬过程中的关键蛋白,主要通过促进自噬体形成、成熟及与溶酶体融合,加速细胞内废物降解,MAP1LC3B 表达上调可降低肿瘤细胞的侵袭性^[20-21]。这些关键基因在 PPI 网络中与其他蛋白相互作用,突显了它们在 SCI 和线粒体自噬相关生物学过程中的重要性。本研究通过差异表达分析验证这些关键

基因,进一步支持了它们作为SCI治疗潜在靶点的可能性。

本研究基于免疫细胞浸润特征的分析结果表明,特定免疫亚群与SCI病理过程存在显著关联,活化态树突状细胞、未成熟树突状细胞、滤泡辅助T细胞、M2型巨噬细胞、静息态自然杀伤细胞、M0型巨噬细胞、中性粒细胞、浆细胞、CD4初始T细胞及Th17细胞等10个免疫亚群呈现显著浸润特征,提示这些细胞群体可能参与SCI的疾病进展。值得注意的是,相关性分析显示,中性粒细胞与浆细胞间呈现最强的正相关性,而中性粒细胞与M0型巨噬细胞间则检测到显著的负相关性。

骨髓源性巨噬细胞作为先天免疫系统核心效应细胞,在炎症发生、进展及消退等病理阶段发挥着重要作用^[22]。本研究结果显示M2型巨噬细胞与M0巨噬细胞均在SCI组发生显著变化。经典理论认为M0巨噬细胞可极化为促炎的M1表型或抑炎/修复的M2表型^[23]。因此,本研究观察到的M0巨噬细胞的显著变化,很可能意味着其正在向M1或M2表型进行大规模分化。有研究^[24]显示,M1型向M2型的转化在神经疾病中被证实具有神经保护作用并改善预后,这提示干预M0巨噬细胞的极化方向,可能是一个具有潜力的治疗策略。巨噬细胞的极化与适应性免疫的激活协同发生。本研究还发现,在M0/M2巨噬细胞发生显著变化的同时,滤泡辅助T细胞、CD4初始T细胞及Th17细胞也呈现显著浸润。T细胞的激活有赖于识别巨噬细胞等抗原呈递细胞表面的MHC II类分子^[25]。这些细胞群体的同步变化共同印证在SCI病理过程中存在一条从先天免疫到适应性免疫的激活通路。

炎症应答的初始特征表现为中性粒细胞急剧趋化聚集,继阶段则呈现单核细胞向巨噬细胞谱系定向分化的过程^[26]。鉴于中性粒细胞的高度促炎特性,越来越多的证据表明,组织驻留巨噬细胞可向M2表型转变,以抑制过度炎症并促进组织修复^[27]。本研究揭示了中性粒细胞与M0型巨噬细胞之间存在显著的负相关性^[28]。这些发现为SCI中的免疫反应提供了新的见解,并表明免疫调节可能是SCI治疗的一种可行方法。在免疫细胞与关键基因之间的关联中,关键基因*Gabarap*与M0型巨噬细胞表现出最强的正相关性。生物信息学分析和qRT-PCR结果表明,SCI后*Gabarap*表达水平升高。*Gabarap*是巨噬细胞的调节因子,能与WDFY3结合

以提高巨噬细胞的效能^[29]。尽管关于*Gabarap*与巨噬细胞相关性的精确研究尚缺乏,但有研究^[30]显示,在帕金森病患者中,*Gabarap*表达降低。帕金森病与免疫细胞之间的关联为神经系统疾病研究开辟了新方向。

本研究存在一定的局限性:(1)缺乏分析临床信息所需要的临床研究;(2)遗漏了与运动神经元标志物(如ChAT和VACHT)相关的实验数据及其定量分析,阻碍了对*Gabarap*与运动神经元之间相互作用的全面理解。尽管现有数据提供了一些初步证据,但缺乏这些特定标志物的详细信息使本研究的结论受到一定限制,未来研究需要进一步明确标志物的表达特征与临床意义。

综上所述,本研究筛选出的6个关键基因(*Ulk1*、*Atg14*、*Map1lc3b*、*Gabarap*、*Gabarapl2*和*Fundc1*)可作为SCI的生物标志物。这些关键基因的验证和免疫细胞相互作用的识别为治疗干预提供了潜在靶点,并为进一步开展实验和临床研究以开发针对SCI患者的有效治疗方法指明了方向。

所有作者均声明不存在利益冲突关系。

参考文献:

- [1] Liu W, Xu B, Xue W, et al. A functional scaffold to promote the migration and neuronal differentiation of neural stem/progenitor cells for spinal cord injury repair [J]. *Biomaterials*, 2020,243:119941.
- [2] Griffin J M, Bradke F. Therapeutic repair for spinal cord injury: combinatory approaches to address a multifaceted problem [J]. *EMBO Mol Med*, 2020,12(3):e11505.
- [3] Huang H, Young W, Skaper S, et al. Clinical neurorestorative therapeutic guidelines for spinal cord injury (IANR/CANR version 2019) [J]. *J Orthop Translat*, 2019,20:14-24.
- [4] Sterner R C, Sterner R M. Immune response following traumatic spinal cord injury: pathophysiology and therapies [J]. *Front Immunol*, 2023,13:1084101.
- [5] Slater P G, Domínguez-Romero M E, Villarreal M, et al. Mitochondrial function in spinal cord injury and regeneration [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2022,79(5):239.
- [6] Ren J, Zhu B, Gu G, et al. Schwann cell-derived exosomes containing MFG-E8 modify macrophage/microglial polarization for attenuating inflammation via the SOCS3/STAT3 pathway after spinal cord injury [J]. *Cell Death Dis*, 2023,14(1):70.
- [7] Xu B, Zhou Z, Fang J, et al. Exosomes derived from

- schwann cells alleviate mitochondrial dysfunction and necroptosis after spinal cord injury via AMPK signaling pathway-mediated mitophagy[J]. *Free Radic Biol Med*, 2023,208:319-333.
- [8] Andrabi S S, Yang J, Gao Y, et al. Nanoparticles with antioxidant enzymes protect injured spinal cord from neuronal cell apoptosis by attenuating mitochondrial dysfunction[J]. *J Control Release*, 2020,317:300-311.
- [9] Wang L, Cho Y L, Tang Y, et al. PTEN-L is a novel protein phosphatase for ubiquitin dephosphorylation to inhibit PINK1-Parkin-mediated mitophagy [J]. *Cell Res*, 2018,28(8):787-802.
- [10] Wang Y, Liu H H, Cao Y T, et al. The role of mitochondrial dynamics and mitophagy in carcinogenesis, metastasis and therapy[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8:413.
- [11] Conway J R, Kofman E, Mo S S, et al. Genomics of response to immune checkpoint therapies for cancer: implications for precision medicine [J]. *Genome Med*, 2018,10(1):93.
- [12] Haqshenas G, Wu J, Simpson K J, et al. Signalome-wide assessment of host cell response to hepatitis C virus[J]. *Nat Commun*, 2017,8:15158.
- [13] Jiang Z, Zeng Z, He H, et al. Lycium barbarum glycopeptide alleviates neuroinflammation in spinal cord injury via modulating docosahexaenoic acid to inhibiting MAPKs/NF- κ B and pyroptosis pathways [J]. *J Transl Med*, 2023,21(1):770.
- [14] Liu Z, Yao X, Jiang W, et al. Advanced oxidation protein products induce microglia-mediated neuroinflammation via MAPKs-NF- κ B signaling pathway and pyroptosis after secondary spinal cord injury [J]. *J Neuroinflammation*, 2020,17(1):90.
- [15] Xu L, Botchway B O A, Zhang S, et al. Inhibition of NF- κ B signaling pathway by resveratrol improves spinal cord injury[J]. *Front Neurosci*, 2018,12:690.
- [16] Shih J H, Tsai Y F, Li I H, et al. Hp-sI ganglioside suppresses proinflammatory responses by inhibiting MyD88-dependent NF- κ B and JNK/p38 MAPK pathways in lipopolysaccharide-stimulated microglial cells [J]. *Mar Drugs*, 2020,18(10):496.
- [17] Fujita S, Sakurai M, Baba H, et al. Autophagy-mediated stress response in motor neurons after hypothermic spinal cord ischemia in rabbits[J]. *J Vasc Surg*, 2015,62(5):1312-1319.
- [18] Li S, Gao L, Zhang W, et al. miR-152-5p suppresses osteogenic differentiation of mandible mesenchymal stem cells by regulating ATG14-mediated autophagy [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2022, 13(1): 359.
- [19] Shi X, Zhang X. Control of ATG14 solubility and autophagy by MARCHF7/MARCH7-mediated ubiquitination[J]. *Autophagy*, 2024,20(3):699-700.
- [20] Yu H, Liu Q, Jin M, et al. Comprehensive analysis of mitophagy-related genes in NSCLC diagnosis and immune scenery: based on bulk and single-cell RNA sequencing data[J]. *Front Immunol*, 2023,14:1276074.
- [21] Liu P F, Shu C W, Yang H C, et al. Combined evaluation of MAP1LC3B and SQSTM1 for biological and clinical significance in ductal carcinoma of breast cancer [J]. *Biomedicines*, 2021,9(11):1514.
- [22] Wang L, Yang K, Xie X, et al. Macrophages as multifaceted orchestrators of tissue repair: bridging inflammation, regeneration, and therapeutic innovation[J]. *J Inflamm Res*, 2025,18:8945-8959.
- [23] Chen S, Saeed A F U H, Liu Q, et al. Macrophages in immunoregulation and therapeutics [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2023, 8(1): 207.
- [24] Shi M, Mi L, Li F, et al. Fluvoxamine confers neuroprotection via inhibiting infiltration of peripheral leukocytes and M1 Polarization of microglia/macrophages in a mouse model of traumatic brain injury[J]. *J Neurotrauma*, 2022, 39(17-18): 1240-1261.
- [25] Oishi Y, Manabe I. Macrophages in inflammation, repair and regeneration [J]. *Int Immunol*, 2018, 30(11):511-528.
- [26] Prame Kumar K, Nicholls A J, Wong C H Y. Partners in crime: neutrophils and monocytes/macrophages in inflammation and disease [J]. *Cell Tissue Res*, 2018, 371(3):551-565.
- [27] Oishi Y, Manabe I. Macrophages in inflammation, repair and regeneration[J]. *Int Immunol*, 2018,30(11): 511-528.
- [28] Shi J, Wu X, Wang Z, et al. A genome-wide CRISPR screen identifies WDFY3 as a regulator of macrophage efferocytosis[J]. *Nat Commun*, 2022,13(1):7929.
- [29] Abdelmoaty M M, Machhi J, Yeapuri P, et al. Monocyte biomarkers define sargramostim treatment outcomes for Parkinson's disease[J]. *Clin Transl Med*, 2022, 12(7):e958.
- [30] Machhi J, Kevadiya B D, Muhammad I K, et al. Harnessing regulatory T cell neuroprotective activities for treatment of neurodegenerative disorders [J]. *Mol Neurodegener*, 2020,15(1):32.

(收稿:2025-02-26)(修回:2025-10-31)

(责任编辑:睦荣燕)