

·基础研究·

慢性静力性损伤模型家兔颈后肌群转录组学的生物信息分析*

杨楠^{1,2} 魏晓歌^{1,2} 袁兰英¹ 穆静¹ 孙文静^{1,2} 宋斐^{1,2} 王燕¹ 李开颖¹ 马惠昇^{1,2,3}

摘要

目的:利用转录组测序分析技术研究慢性静力性损伤模型家兔颈后肌的差异表达基因(DEGs)和关键信号通路。

方法:通过长期反复屈曲家兔颈部复制兔颈后肌慢性静力负荷损伤模型。利用转录组测序技术筛选DEGs并进行GO功能富集和KEGG通路富集分析。构建PPI网络,筛选出前10位的DEGs。

结果:与空白组相比,共有310个DEGs,其中上调193个,下调117个;GO分析显示,模型组差异基因主要涉及炎症和免疫反应调节等相关功能;KEGG分析显示吞噬体与Fcγ-R介导的吞噬作用、NF-κB等信号通路表现活跃。PPI网络确定了10个hub基因,其中TLR4、CTSS、ITGB2、TYROBP、CD74、LAPTM5等表达上调,仅PPARG表达下调。

结论:颈肌慢性静力性损伤的病理变化涉及众多基本的生物学过程,炎症反应及免疫微环境的紊乱在其中发挥着重要作用;与炎症反应密切相关的差异基因以及NF-κB信号通路、吞噬体、Fcγ-R介导的吞噬作用等通路分子的转录激活可能是其主要的分子机制。

关键词 慢性静力性损伤;颈肌损伤;转录组测序;差异表达基因

中图分类号:R493 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2024)-04-0480-08

Bioinformatics analysis of posterior cervical muscle groups in rabbits with chronic static injury/YANG Nan, WEI Xiaoge, YUAN Lanying, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2024, 39(4): 480—487

Abstract

Objective: Transcriptome sequencing analysis was used to study the differentially expressed genes (DEGs) and key signaling pathways of the posterior cervical muscles of rabbits in a model of chronic static injury.

Method: The chronic static load injury model of posterior cervical muscle in rabbits was replicated by long-term repeated flexion of the neck of rabbits. DEGs were screened by transcriptome sequencing and analyzed for GO function enrichment and KEGG pathway enrichment. Build a PPI network and filter out the top 10 DEGs.

Result: Compared with the blank group, there were 310 DEGs, of which 193 were upward and 117 were downward in the model group. GO analysis showed that the different genes in the model group were mainly involved in related functions such as inflammation and immune response regulation. KEGG analysis showed that phagosomes were active in Fcγ-R-mediated phagocytosis and NF-κB. The PPI network identified 10 hub genes, among which TLR4, CTSS, ITGB2, TYROBP, CD74, LAPTM5 and other expressions were up-regulated, and only PPARG expression was down-regulated.

Conclusion: The pathological changes of chronic static injury of cervical muscles involve plenty of basic biological processes, and the inflammatory response and the disorder of immune microenvironment play an impor-

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2024.04.004

*基金项目:国家自然科学基金项目(81860892)

1 宁夏医科大学中医学院,宁夏回族自治区银川市,750000; 2 宁夏少数民族医药现代化教育部重点实验室; 3 通讯作者
第一作者简介:杨楠,女,硕士研究生; 收稿日期:2022-11-10

tant role in it. Transcriptional activation of differential genes closely related to inflammatory responses and pathway molecules such as NF- κ B signaling pathway, phagosomes, and Fc γ -R-mediated phagocytosis may be its main molecular mechanisms.

Author's address College of Traditional Chinese Medicine Ningxia Medical University, Yinchuan, 750000

Key word chronic static injury;cervical muscle injuries;transcriptome sequencing; differentially expressed genes

骨骼肌以蛋白质和能量代谢为基础在持续稳定的力量产生和运动平衡中扮演重要角色,颈部骨骼肌在维持颈椎稳定和保持灵活运动方面起着至关重要的作用。随着科技进步带来人类躯体行为方式的转变,低头伏案使得颈椎反复长久处于前倾屈曲体位,久而久之颈椎生理弧度会消失并逐渐增加颈椎压力^[1]。颈部椎体力学结构的改变会牵拉颈后肌群使肌肉间筋膜组织持续静力性收缩,进一步破坏颈椎内在原有的应力平衡,造成血管牵拉变形或神经受压,肌肉缺血缺氧,降低力量耐力、运动控制和本体感觉方面的功能,形成颈部骨骼肌的慢性静力性损伤^[2-3]。长期静力性损伤可造成局部的无菌性炎症^[4],引起慢性顽固性疼痛,并伴随程度不一的局部功能障碍,严重影响人们的心理健康和日常生活工作。目前,因慢性静力性负荷导致的颈部肌群损伤相关机制研究相对有限。

转录组测序技术已广泛应用于医学领域,是挖掘特定条件下的差异表达基因(differentially expressed genes, DEGs),系统揭示疾病相关分子机制的有效方法。从转录组生物信息分析的角度对骨骼肌慢性静力性损伤展开的研究相对较少。本次实验通过使用颈后肌群静力性损伤模型固定架模拟人长期处于低头颈前屈的状态,复制颈后肌群慢性静力性损伤的家兔模型,采用Nanopore测序技术检测颈后肌损伤肌组织的DEGs,进而进行生物信息学分析,通过挖掘兔颈后肌慢性静力性损伤相关的靶基因和信号通路,来探索骨骼肌动静态平衡失调导致颈后肌群损伤的相关分子机制,为临床预防和改善颈部骨骼肌慢性静力性损伤提供一定的实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

本次实验动物由陕西君行生物科技有限公司提供[许可证号:SCXK(陕)2017—00]。将11只普通健康日本大耳兔兔[6月龄,体重(2.0 $\pm$ 0.5)kg]随机

分成对照组(Control组)和模型组(Model组),一兔一笼饲养,按照实验室兔饲养规范条例进行标准水、料喂养。保持室温为15—20 $^{\circ}$ C,湿度为50%—60%。

1.2 模型建立

采用本课题组前期自主发明的兔颈后肌群静力性损伤模型固定架(国家专利号:CN210330815U)建立兔颈部静力性损伤模型。造模时,兔头部被迫向下,处于前屈位45 $^{\circ}$,其他部位可自由活动为度。造模频次为1次/天,5h/次,连续60天。造模实验结束后,采集2组家兔颈后肌肉样品及血清,用于转录组测序分析。

1.3 HE染色

按照垂直于肌纤维走向的方式,迅速取出兔颈后骨骼肌,按照实验要求切取大小约为0.5cm $\times$ 0.5cm $\times$ 0.5cm的颈后肌组织块,置于4%多聚甲醛固定液中固定24h,进行HE染色并通过光学显微镜进行组织病理学观察。

1.4 兔总RNA提取

采用Trizol法从空白对照组和模型组共11个兔颈后肌肉组织样本中提取总RNA,用Nano Photometer分光光度计(IMPLEN, Westlake Village, USA)测试RNA纯度。使用cDNA-PCR测序试剂盒(SQKPCS109)从1 μ g总RNA构建cDNA文库(由北京百迈客生物科技有限公司完成)。

1.5 转录组(RNA-Seq)测序分析

基于Nanopore测序技术进行转录组测序分析,对质检合格的文库进行测序,回收测序数据。通过MinKNOW2.2软件包中的Guppy软件进行base calling后得到转换为fastq格式数据,进一步过滤短片段和低质量的reads后,得到总的Clean Data,然后将得到的Reads比对到参考基因组上,使用FPKM标准化对2组样本进行基因表达量分析。

1.6 差异表达基因的分析及筛选

对2组转录组数据进行整体分析。主成分分析和基因聚类分析的结果显示不同组别样本较好的分

离开来,对差异表达的基因进行富集分析,通过BLAST 比对GO 与KEGG 数据库,获得注释信息,结合差异倍数(fold change,FC) ≥ 2 和 $P<0.01$ 及基因在通路中的功能等条件筛选出2组家兔颈后肌肉组织的差异表达基因。DEGs 的基因本体(gene ontology,GO)富集分析是由基于Wallenius 非中心超几何分布的Goseq R包实现的。用KOBAS 软件来测试KEGG 通路中差异表达基因的统计富集。

1.7 PPI网络

在String 数据库(<http://string-db.org/>)中输入DEGs,以最小交互评分 >0.4 (中置信度)为阈值,找出DEGs 编码蛋白质之间的相互作用。下载PPI 的TSV 格式文件后,将其导入Cytoscape 软件构建PPI

网络。使用Cytoscape 软件的cyto Hubba 插件按照Degree 算法筛选出节点连通度最大的前10 个关键基因。

1.8 实时荧光定量PCR

以兔颈后肌肉组织总RNA 为模板,利用实时荧光定量PCR 检测筛选出的慢性肌肉损伤的相关基因。随机选择4 个差异表达基因,检测其mRNA 转录水平的变化情况,来进一步验证RNA-Seq 测序获得的差异表达基因的准确性。根据GenBank 发布的兔基因序列(登录号见表1),利用NCBI 软件设计特异性引物。以兔GAPDH(GAPDH,登录号:NM_001082253)为内参基因。引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。引物序列见表1。

表1 实时荧光定量 PCR 引物序列

基因名称	Gen Bank Accession	Gene ID	序列	产物长度(bp)
CXCR4	XM_002712124	100346189	F:CTCCTGGAAATCATCAAGCAAG R:GCATACAAGATGGGATTGAGACA	113
TLR4	NM_001082732	100009497	F:CTGTATTCAAGGGCTGAGTGGT R:TTCGAGGTCATCTATGTATGCTAA	157
CTSS	XM_002715580	100101598	F:CCACTTCGGTGAACAAGGATA R:CTAGATTCTGGGTAAGAGGGA	91
GAPDH	NM_001082253	100009074	F:CACTTCGGCATTGTGGAGG R:GGAGGCAGGGATGATGTTCT	132

PCR 反应体系20 μ l:上、下游引物(10 μ mol/L)各0.6 μ l, cDNA 100ng, 2 $\times$ SuperReal PreMix Plus 10 μ l, RNase-Free ddH₂O 至20 μ l。PCR 扩增程序:95 $^{\circ}$ C 预变性 15min; 95 $^{\circ}$ C 变性 10s, 53—58 $^{\circ}$ C 退火 30s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30s, 共40 个循环。

1.9 酶联免疫吸附测定(ELISA)

在兔子采血后通过离心分离血清,然后根据制造商的说明,使用从酶联生物技术(中国上海)购买的ELISA 试剂盒测定TNF- α , 白细胞介素-1 β (IL-1 β)和白细胞介素-6(IL-6)。

1.10 统计学分析

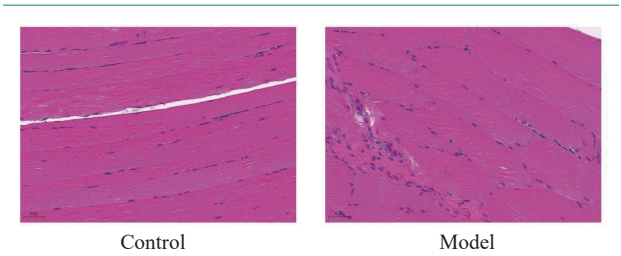
数据采用SPSS 26.0 软件比较不同处理的均值与标准误,并进行单因素方差分析。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算基因的相对表达量,利用 t 检验进行显著性分析,以 $P<0.05$ 表示差异显著, $P<0.01$ 表示差异极显著。

2 结果

2.1 模型建立

经过60 天造模后与空白组比较,模型组家兔触碰颈部时反应强烈,易躲闪,颈部肌肉较僵硬,可触及条索状物。为了直观了解家兔颈部静力性损伤肌纤维组织形态学变化,我们对家兔颈后肌进行HE 染色光学显微镜观察(图1)。

图1 两组兔颈部肌群HE 染色结果 ($\times 20$)

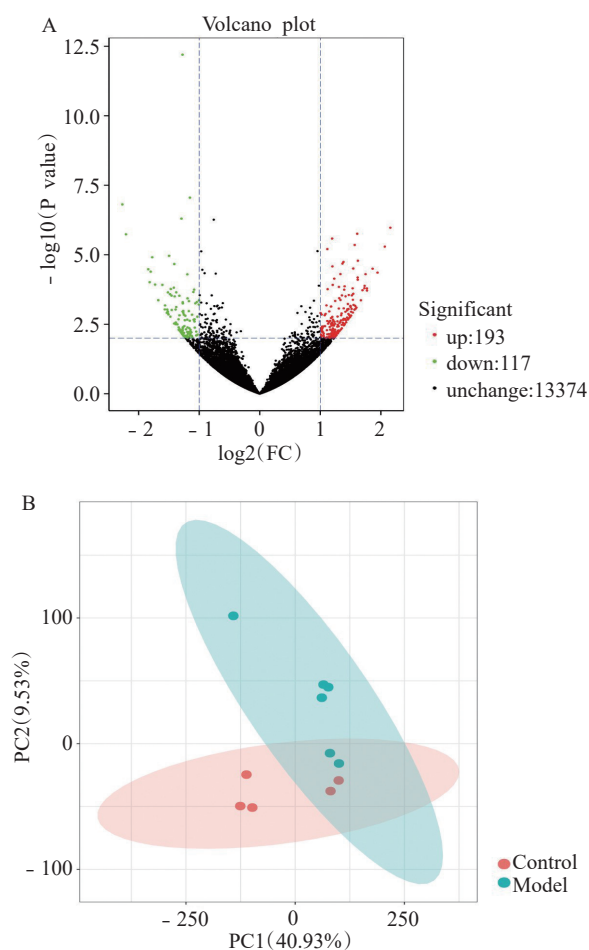


HE 染色光镜下发现空白组肌纤维排列整齐致密,细胞核呈卵圆形,形态规则,排列整齐,无组织水肿及炎性浸润。模型组肌纤维排列紊乱,扭曲变形,局部有断裂,肌间隙宽窄不一,可见大量炎性物质渗出。由此表明,兔颈后肌群慢性静力性损伤模型建立成功。

2.2 表达差异分析结果

转录组测序共鉴定到 13684 个基因,使用 DESeq2 R 包(1.6.3)对各组进行差异表达分析。DESeq2 提供了统计例程,用于使用基于负二项分布的模型确定数字基因表达数据中的差异表达。使用 Benjamini 和 Hochberg 控制错误发现率的方法调整所得 P 值。DESeq2 发现的 $FC \geq 2$ 和 $P < 0.01$ 的基因被指定为差异表达。结果显示,共得到 310 个差异基因,其中 193 个上调基因,117 个下调基因(图 2A)。根据基因表达量对各样品进行主成分分析(PCA),距离越近说明样本间相似性越高。PCA 分析结果显示,模型组家兔与对照组家兔样品分离相对较明显(图 2B),表明两组样本在基因表达的构成上存在一定差异。

图2 差异表达基因分析图

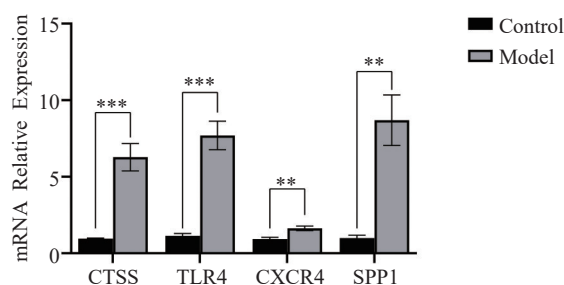


A 两组差异基因火山图;B 两组样品 PCA 分析图

2.3 差异表达基因的 RT-PCR 验证结果

为验证 RNA-Seq 测序结果的可靠性,我们随机选择了 4 个差异表达基因(SPP1、CXCR4、TLR4、CTSS)进行实时荧光定量 PCR 检测,结果发现, SPP1、CXCR4、TLR4、CTSS 基因在模型家兔肌肉组织中的相对表达量高于 C 组家兔($P < 0.01$)(图 3),即实时荧光定量 PCR 检测结果与 RNA-Seq 测序结果趋势一致。

图3 差异表达基因 RT-PCR 验证分析



2.4 差异表达基因的 GO 功能富集分析

对 DEGs 进行 GO 功能富集分析,结果显示共涉及 1443 个 GO 条目,分为 3 个大类:细胞组分(Cellular Component, 1016 个)、分子功能(Molecular Function, 197 个)和生物学过程(Biological Process, 231 个)。选取每个大类中富集最显著的($P < 0.05$)前 10 个功能类别进行分析,结果显示,DEGs 主要富集在 MHC II 类蛋白复合物(MHC class II protein complex, GO: 0042613)、免疫反应(immune response, GO: 0006955)、炎症反应的调节(regulation of inflammatory response, GO: 0050727)、中性粒细胞趋化性(neutrophil chemotaxis, GO: 0030593)、细胞因子分泌的调节(regulation of cytokine secretion, GO: 0050707)等功能(图 4)。

2.5 差异表达基因的 KEGG 通路富集分析

KEGG 通路富集分析结果显示,DEGs 共涉及 185 个通路。选取富集最显著的($P < 0.05$)前 20 条 KEGG 通路,其中,DEGs 主要富集在吞噬体(phagosome, ko04145)、细胞粘附分子(cell adhesion molecules, ko04514)、抗原处理和呈递(antigen processing and presentation, ko04612)、自然杀伤细胞介导的细胞毒性(natural killer cell mediated cytotoxici-

ty,ko04650)、Fc γ -R介导的吞噬作用(Fc gamma R-mediated phagocytosis, ko04666)、NF- κ B 信号通路(NF-kappa B signaling pathway,ko04064)(图5);包

含差异基因较多的通路与免疫反应和炎症密切相关,包括吞噬体、细胞粘附分子、自然杀伤细胞介导的细胞毒性、Fc γ -R介导的吞噬作用、NF- κ B 信号通路。

图4 差异表达基因的GO功能富集分析

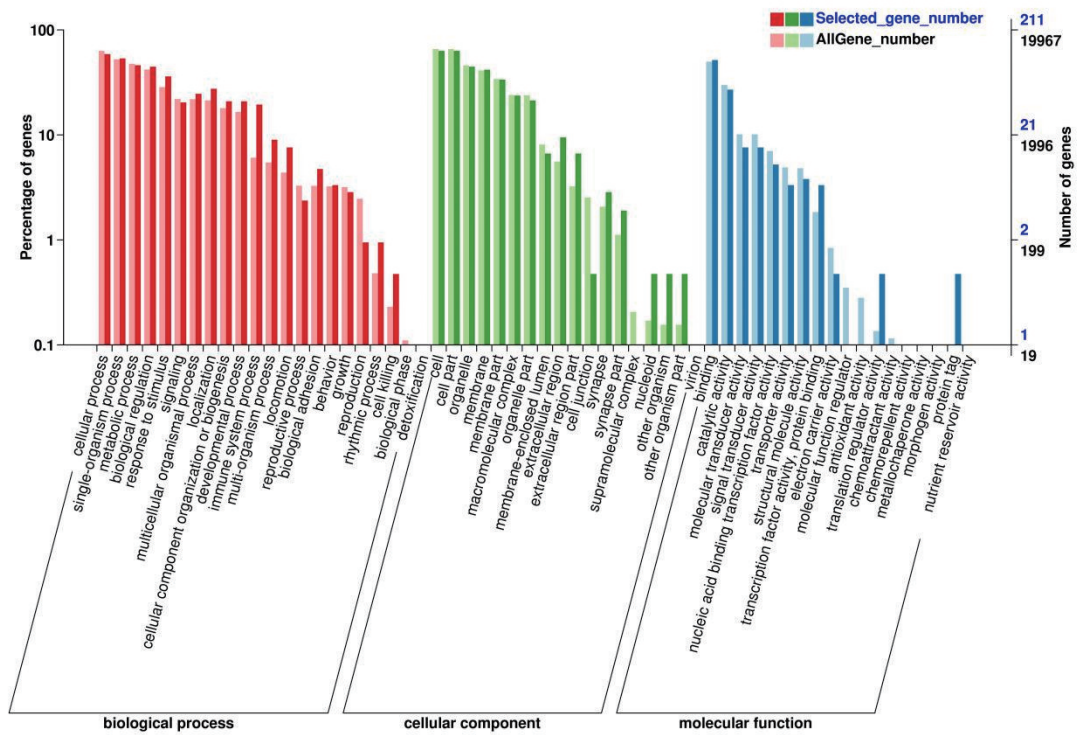
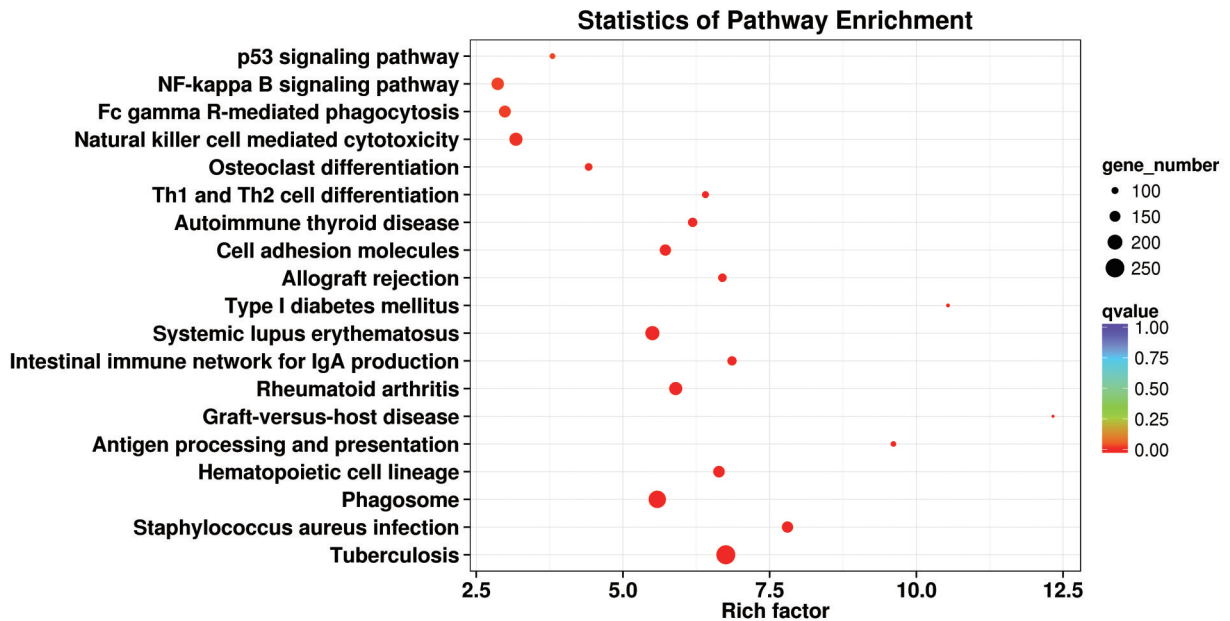


图5 差异表达基因的KEGG通路富集分析



2.6 PPI网络

基于String数据库和Cytoscape软件,获得包含97个节点和198条边的PPI网络,连通度越大的基因节点越大(图6A)。使用cyto Hubba插件和DEGs的degree值筛选出节点连通度最大的前10个关键基因:TLR4、ITGB2、AIF1、LAPTM5、TYROBP、CTSS、CD74、LYN、CXCR4和PPARG,这些基因除PPARG在模型家兔肌肉组织中表达下调,其它在模型家兔肌肉组织中表达均上调。(图6B)。

2.7 两组血清炎症因子变化情况

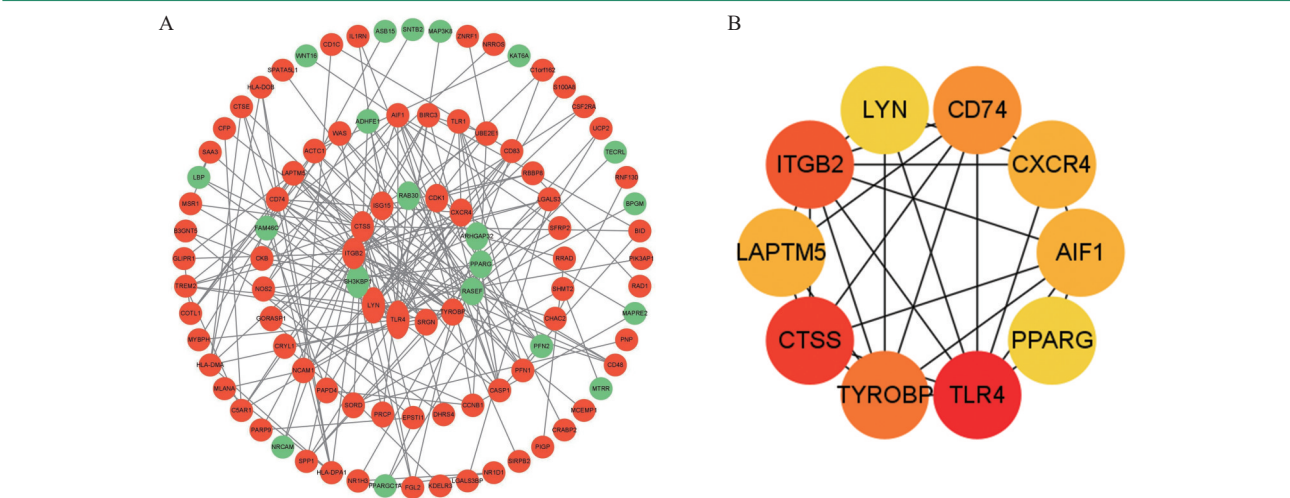
当骨骼肌损伤后,血液中的单核细胞和巨噬细胞迁移到富含促炎细胞因子的肌肉环境,并分泌多

种促炎细胞因子(如TNF-α和IL-6等),并清除坏死肌纤维,吞噬损伤区域的细胞碎片等,促进机体炎症反应^[5],命名为M1型巨噬细胞。我们研究发现,与空白对照组比较,模型组IL-1β、IL-6、TNF-α水平显著升高($P<0.01$),说明损伤发生后,炎症作用开始(图7)。

3 讨论

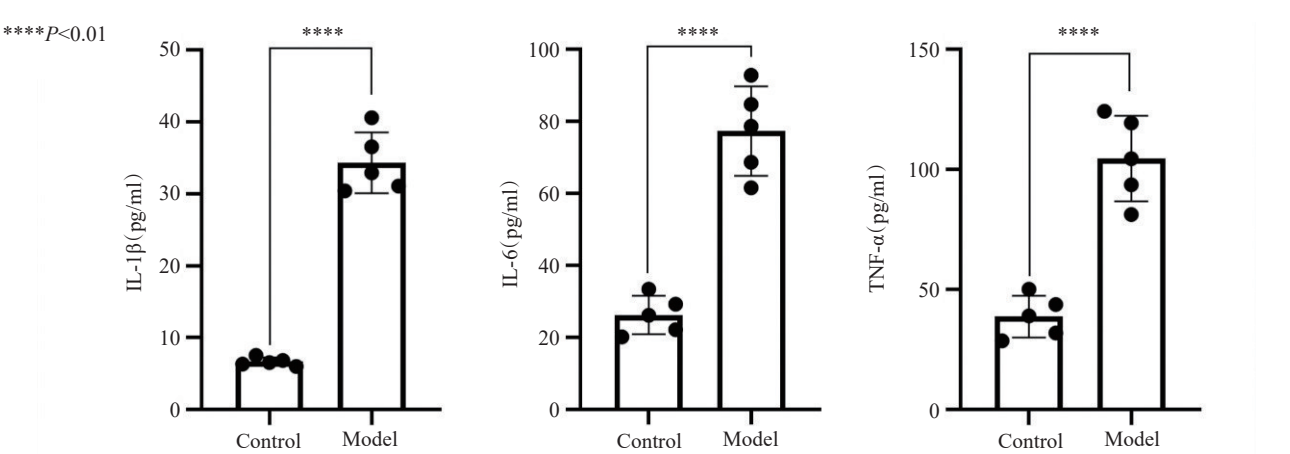
骨骼肌静力性损伤是软组织的一种慢性劳损,多因肢体较长时间静态性的维持用力以保持同种姿势而逐渐引发^[6],这种劳损常因肌纤维损伤、炎症细胞浸润、微环境紊乱而迁延不愈,伴随出现的疼痛及

图6 差异表达基因的PPI网络分析



红色节点表示上调;绿色节点表示下调。基因节点越大表明连通度越大。A Cytoscape软件对PPI网络进行可视化。B 关键基因的PPI网络。基因节点越红表明连通度越大。

图7 ELISA法检测血清IL-1β、IL-6、TNF-α的表达



*** $P<0.01$

肌肉功能障碍对人们的工作生活、身心健康都有程度不同的影响^[7]。本课题组通过长期的临床观察和前期研究认为静力性劳损是颈后肌群慢性损伤的主要病因,长期的颈肌静力性损伤可诱发或加重颈椎病^[8]。但此类损伤的作用尚未引起足够的重视,系统生物学的分子机制研究和探讨也很有限,因此利用转录组技术展示并进入挖掘调控颈后骨骼肌慢性静力性损伤的潜在基因及相关分子通路具有重要的理论指导意义。

此次,我们通过对空白组和模型组之间差异基因的比较分析,证实软组织慢性静力性损伤的病理变化是多因素的,涉及众多基本的生物学过程。GO 功能富集分析结果显示在MHC II类蛋白复合物、免疫反应、炎症反应的调节、中性粒细胞趋化、细胞因子分泌的调节等条目有显著富集。KEGG通路富集分析揭示了一些特定的通路,包括吞噬体、细胞黏附分子、自然杀伤细胞介导的细胞毒性、Fcγ-R介导的吞噬作用、NF-κB信号通路等,这些与炎症反应密切相关的通路参与了骨骼肌慢性静力性损伤的病理过程。NF-κB信号通路是典型的促炎信号通路^[9-10],激活NF-κB可触发TNF-α、IL-6和IL-1β的表达,并进一步激活NF-κB信号转导通路^[11],引起组织持续性损伤和炎症反应信号放大^[12],导致骨骼肌萎缩。Fcγ-R介导的吞噬作用不仅能影响肌卫星成纤维细胞的增殖分化,还能促进巨噬细胞和单核细胞的吞噬能力。吞噬作用是免疫和体内稳态的必不可少的机制,通常伴随着炎症通路的激活^[13]。慢性炎症时,各种致炎因子不仅可以直接造成组织的损伤,还可通过激活单核—巨噬细胞等炎症细胞参与机体的防御反应。其中,M1型巨噬细胞能够分泌多种促炎因子,从而加剧炎症反应。在本次实验中,我们通过HE染色观察家兔颈后肌组织和ELISA法检测家兔血中炎症因子水平的结果支持这一论据,我们发现模型组家兔肌纤维可见大量炎性物质渗出,以及模型组家兔血清中TNF-α、IL-6和IL-1β水平,均明显高于空白对照组。分析认为,慢性静力性骨骼肌损伤可因肌纤维损伤引起细胞应激,导致家兔体内炎症因子水平升高,形成局部的无菌性炎症。

另外,我们筛选出10个显著差异表达基因:TLR4、CTSS、ITGB2、TYROBP、CD74、LAPTM5、

CXCR4、AIF1、LYN、PPARG,其中TLR4是连通度最大的关键基因。TLR4在炎症因子基因启动和转录调控过程中占有重要的地位^[14]。它能诱导信号级联激酶和转录因子的激活,引起促炎症因子、趋化因子和活性氧的产生,从而介导炎症反应^[15];骨骼肌损伤后分泌的CTSS可激活趋化因子,使巨噬细胞、中性粒细胞等迁移至损伤部位,促进TNF-α、IL-1β等促炎细胞因子分泌,炎症细胞又进一步分泌CTSS,加重局部炎症反应^[16-17];ITGB2广泛表达于多种免疫细胞亚群,在免疫应答中起重要作用。有研究表明^[18],该基因缺陷可导致白细胞黏附障碍;TYROBP主要在巨噬细胞、单核细胞中表达,可能通过影响小胶质细胞活性,调节身体的炎症反应,从而参与疾病的发生和发展^[19-20];CD74是促炎细胞因子MIF的细胞受体,可在炎症及多种恶性肿瘤组织中表达^[21],并且它可以启动各种级联反应,导致NF-κB激活^[22];LAPTM5主要表达于淋巴系和髓系来源的细胞,在免疫细胞和造血细胞中优先表达^[23]。此外,LAPTM5已被证实是巨噬细胞促炎途径的阳性调节因子^[24];Mandal等^[25]发现,CXCR4可以通过激活有丝分裂原激活的蛋白激酶细胞外信号调节激酶来调节B细胞的发育和成熟,然后参与影响身体的免疫功能并调节炎症反应;AIF-1参与炎症反应和免疫激活^[26],通过介导氧化应激和核因子κB(NF-κB)传导通路调节组织炎症^[27],在巨噬细胞的存活和促炎活性中起着重要作用^[28]。综上,不论是基于HE染色评估的肌肉损伤和炎症浸润水平,还是通过ELISA法检测的血清中TNF-α、IL-6和IL-1β水平,均显示炎症反应始终参与其中,测序结果也支持炎症免疫微环境的持续紊乱对骨骼肌慢性静力性损伤发挥着重要作用。

通过本次研究证实了颈后肌慢性静力性损伤与炎症免疫相关基因的转录异常、信号通路的交互调节失衡和因此导致的局部免疫微环境紊乱密切相关。这些高度相关的差异基因以及信号通路可能是防治颈肌慢性静力性损伤,促进骨骼肌损伤修复的潜在干预靶点。本研究从模型的角度探讨了长期、反复的颈椎屈曲导致颈后肌肉慢性静力性损伤的病理变化和分子机制,但能否通过干预这些途径起到促进骨骼肌损伤修复和恢复肌肉功能的作用,还有待进一步验证。

参考文献

- [1] Barrett JM, McKinnon C, Callaghan JP. Cervical spine joint loading with neck flexion[J]. *Ergonomics*, 2020, 63(1):101—108.
- [2] Hoe VC, Urquhart DM, Kelsall HL, et al. Ergonomic interventions for preventing work-related musculoskeletal disorders of the upper limb and neck among office workers[J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2018, 10(10):CD008570.
- [3] Ferrari R, Russell AS. Regional musculoskeletal conditions: neck pain[J]. *Best Pract Res Clin Rheumatol*, 2003, 17(1):57—70.
- [4] Yang WJ, Hu P. Skeletal muscle regeneration is modulated by inflammation[J]. *J Orthop Translat*, 2018, 13:25—32.
- [5] Duchesne E, Dufresne SS, Dumont NA. Impact of inflammation and anti-inflammatory modalities on skeletal muscle healing: from fundamental research to the clinic[J]. *Phys Ther*, 2017, 97(8):807—817.
- [6] 袁兰英, 马惠昇, 穆静, 等. 理筋手法干预对颈后肌慢性损伤家兔 β -EP、ENK、5-HT动态变化的影响[J]. *中国民族民间医药*, 2022, 31(6):29—34.
- [7] Du H, Shih CH, Wosczyzna MN, et al. Macrophage-released ADAMTS1 promotes muscle stem cell activation[J]. *Nat Commun*, 2017, 8(1):669.
- [8] 刘志华, 马惠昇, 穆静, 等. 回医理筋手法不同时间干预兔颈肌慢性损伤的组织学研究[J]. *宁夏医科大学学报*, 2013, 35(10):1069—1071+1064.
- [9] Barnabei L, Laplantine E, Mbongo W, et al. NF- κ B: At the borders of autoimmunity and inflammation[J]. *Front Immunol*, 2021, 12:716469.
- [10] Lawrence T. The nuclear factor NF- κ B pathway in inflammation[J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2009, 1(6):a001651.
- [11] Kheradmand M, Niimura H, Kuwabara K, et al. Association of inflammatory gene polymorphisms and conventional risk factors with arterial stiffness by age[J]. *J Epidemiol*, 2013, 23(6):457—465.
- [12] Hyldahl RD, Xin L, Hubal MJ, et al. Activation of nuclear factor- κ B following muscle eccentric contractions in humans is localized primarily to skeletal muscle-residing pericytes[J]. *FASEB J*, 2011, 25(9):2956—2966.
- [13] Pinheiro CDS, Monteiro APT, Dutra FF, et al. Short-term regulation of Fc γ R-Mediated Phagocytosis by TLRs in Macrophages: Participation of 5-Lipoxygenase Products[J]. *Mediators Inflamm*, 2017, 2017:2086840.
- [14] Li Y, Zhao Y, Xu X, et al. Overexpression of Toll-like receptor 4 contributes to the internalization and elimination of *Escherichia coli* in sheep by enhancing caveolae-dependent endocytosis[J]. *J Anim Sci Biotechnol*, 2021, 12(1):63.
- [15] Coutinho-Wolino KS, Almeida PP, Mafra D, et al. Bioactive compounds modulating Toll-like 4 receptor (TLR4)-mediated inflammation: pathways involved and future perspectives[J]. *Nutr Res*, 2022, 107:96—116.
- [16] Wang H, Jiang H, Cheng XW. Cathepsin S are involved in human carotid atherosclerotic disease progression, mainly by mediating phagosomes: bioinformatics and in vivo and vitro experiments[J]. *Peer J*, 2022, 10:e12846.
- [17] Tu NH, Inoue K, Chen E, et al. Cathepsin S evokes PAR2-dependent pain in oral squamous cell carcinoma patients and preclinical mouse models[J]. *Cancers (Basel)*, 2021, 13(18):4697.
- [18] van de Vijver E, Maddalena A, Sanal Ö, et al. Hematologically important mutations: leukocyte adhesion deficiency (first update)[J]. *Blood Cells Mol Dis*, 2012, 48(1):53—61.
- [19] Zhang YF, Meng LB, Hao ML, et al. CXCR4 and TYROBP mediate the development of atrial fibrillation via inflammation[J]. *J Cell Mol Med*, 2022, 26(12):3557—3567.
- [20] Tomasello E, Vivier E. KARAP/DAP12/TYROBP: three names and a multiplicity of biological functions[J]. *Eur J Immunol*, 2005, 35(6):1670—1677.
- [21] Imaoka M, Tanese K, Masugi Y, Hayashi M, Sakamoto M. Macrophage migration inhibitory factor-CD74 interaction regulates the expression of programmed cell death ligand 1 in melanoma cells[J]. *Cancer Sci*, 2019, 110(7):2273—2283.
- [22] Starlets D, Gore Y, Binsky I, et al. Cell-surface CD74 initiates a signaling cascade leading to cell proliferation and survival[J]. *Blood*, 2006, 107(12):4807—4816.
- [23] Pak Y, Glowacka WK, Bruce MC, et al. Transport of LAPTM5 to lysosomes requires association with the ubiquitin ligase Nedd4, but not LAPTM5 ubiquitination[J]. *J Cell Biol*, 2006, 175(4):631—645.
- [24] Glowacka WK, Alberts P, Ouchida R, et al. LAPTM5 protein is a positive regulator of proinflammatory signaling pathways in macrophages[J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(33):27691—27702.
- [25] Mandal M, Okoreeh MK, Kennedy DE, et al. CXCR4 signaling directs Igk recombination and the molecular mechanisms of late B lymphopoiesis[J]. *Nat Immunol*, 2019, 20(10):1393—1403.
- [26] Liu G, Ma H, Jiang L, et al. Allograft inflammatory factor-1 and its immune regulation[J]. *Autoimmunity*, 2007, 40(2):95—102.
- [27] Zhou Y, Li X, Yuan X, et al. Role of allograft inflammatory factor-1 in the regulation of inflammation and oxidative stress in primary peritoneal mesothelial cells[J]. *Cell Biol Int*, 2019, 43(5):495—505.
- [28] Yang ZF, Ho DW, Lau CK, et al. Allograft inflammatory factor-1 (AIF-1) is crucial for the survival and pro-inflammatory activity of macrophages[J]. *Int Immunol*, 2005, 17(11):1391—1397.