

缺血性脑卒中关键基因的筛选及治疗药物的预测

王玥^{1,2}, 周玥^{1,2}, 赵丽³

1. 首都医科大学附属北京安定医院, 国家精神心理疾病临床医学研究中心, 精神疾病诊断与治疗北京市重点实验室, 北京 100088
2. 首都医科大学人脑保护高精尖创新中心, 北京 100069
3. 首都医科大学基础医学院神经生物学系, 北京 100069

摘要 运用生物信息学方法初步筛选缺血性脑卒中(ischemic stroke, IS)相关的差异表达基因(differentially expressed genes, DEGs)和关键基因(hub genes), 进而预测潜在的IS治疗药物。对正常组和双侧颈内动脉闭塞(bilateral internal carotid artery occlusion, BICAO)组的大鼠皮层进行转录组测序(RNA-sequencing, RNA-Seq), 对筛选得到的DEGs进行GO和KEGG富集分析, 并构建DEGs的蛋白互作网络, 获得关键基因, 根据关键基因预测IS相关药物。本研究共得到197个显著DEGs, 这些基因主要参与代谢、神经活性配体-受体相互作用、补体和凝血级联反应、类固醇激素生物合成等途径。DEGs间有着紧密的相互关系, 相互关系最为密切的基因中, *ORM1*、*SERPINA1*、*GC*都参加炎症、氧化应激和凋亡过程, 是IS发病过程的关键基因。因此, 炎症、氧化应激和凋亡在IS的发生发展中起重要作用, 针对IS的关键基因如*ORM1*、*SERPINA1*、*GC*进行药物治疗有潜在的临床意义。

关键词 缺血性脑卒中; 转录组测序; 生物信息学; 差异表达基因; 药物预测

脑卒中作为全球第二大死亡原因, 是一种严重危及生命的疾病, 有较高的致残率和致死率。其中, 缺血性脑卒中(ischemic stroke, IS)约占70%, 是其主要类型。随着社会老龄化的加快和不健康生活方式的普遍存在, 心血管危险因素逐渐增加, IS

的风险不断加大^[1]。IS是一种多因素、多通路介导的疾病, 它所诱导的神经元坏死和缺血损伤涉及了多种病理过程。大脑动脉闭塞会导致脑供氧不足, 继而葡萄糖、能量供应不足, 出现脑实质坏死。兴奋性毒性、氧化应激和炎症等多种机制都被认为是

收稿日期: 2022-08-13; 修回日期: 2023-03-20

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(82071539); 北京市自然科学基金面上项目(7222064)

作者简介: 王玥, 副主任医师、副教授, 研究方向为脑血管病和认知障碍的发病机制和早期诊断, 电子信箱: wyjoe2000@163.com

引用格式: 王玥, 周玥, 赵丽. 缺血性脑卒中关键基因的筛选及治疗药物的预测[J]. 科技导报, 2023, 41(9): 89-97; doi: 10.3981/j.issn.1000-7857.2023.09.011

脑缺血损伤的原因。在脑缺血损伤发生后,缺血性神经元损伤使谷氨酸大量释放,导致NMDA受体过度激活,大量钙离子流入细胞,致使细胞钙超载以及兴奋性毒性死亡^[2]。大脑的缺血-再灌注会使受损的神经元产生活性氧(reactive oxygen species, ROS),同时耗尽谷胱甘肽。谷胱甘肽是防止ROS介导的DNA损伤的基本抗氧化剂之一,耗尽后脂质、蛋白质和DNA被迅速破坏^[3]。免疫和炎症参与整个缺血性脑损伤过程,严重受损的细胞和残留物会引起缺血再灌注损伤后的炎症^[4]。氧化应激和炎症过程的触发导致血管通透性降低,血脑屏障破裂,使激活的血液免疫细胞,如中性粒细胞和单核细胞到达脑实质,并在缺血组织中积聚。同时,脑内的小胶质细胞也会活跃并更多地产生趋化因子^[5]。总的来说,IS的发病机制和通路的研究已经得到了一定的进展,但是具体的发病机制还没有完全明确,需要进一步的研究。

目前,IS治疗的重点是通过静脉溶栓和血管内血栓切除术实现血管再通,这2种方法都可以减少残疾,但均受严格的时间窗限制,导致治疗多有延迟,从而影响预后^[6]。因此,IS的神经保护治疗显得尤为重要。但目前神经系统损伤机制和涉及的整体信号通路并不清楚,严重限制了治疗实施的有效性。生物信息学可以通过研究、开发或应用计算工具和方法来获取、存储、可视化和解释医学或生物数据,从而对于生物信息学数据进行有效分析,从分子水平揭示疾病的潜在机制^[7]。近年来,随着生物信息学和高通量测序技术的发展,IS发病机制的研究得到了一定的进展。例如,有研究利用生物信息学的方法证明 *ZNF566*、*PDZK1IP1*、*ZFH3* 和 *PITX2* 基因与房颤相关卒中的生物标志物显著相关^[8]。因此,从基因表达层面入手,探索IS的分子生物学机制,并对它进行生物学功能分析,将为了了解IS的发病机制和治疗提供重要的参考方向。

本研究基于正常大鼠和双侧颈内动脉闭塞(bilateral internal carotid artery occlusion, BICAO)大鼠的高通量转录组测序(RNA-sequencing, RNA-Seq)数据,通过生物信息学方法,比较手术前和手术后大鼠大脑皮层的基因表达变化,初步筛选

出在缺血性脑卒中发病过程中起重要调控作用的基因,并对关键基因的通路和生物功能进行预测,希望找到潜在的治疗靶点和治疗药物,为IS的研究和治疗药物的探索提供新的思路和线索。

1 材料和方法

1.1 实验动物

本实验选用8~12周F344(Fischer 344)野生大鼠,体重180~220 g,由北京唯尚立德生物科技有限公司提供。实验程序遵守美国国立卫生研究院的《实验动物的保护和使用指南》的要求,并得到了首都医科大学实验动物伦理委员会的批准(许可证编号:AEEI-2019-093)。所有大鼠均在首都医科大学动物实验中心饲养,室温维持在20℃~22℃,相对湿度约为40%~50%,昼夜光照节律为光照12 h、黑暗12 h。将F344野生大鼠随机分为2组:正常组($n=6$)和BICAO手术组($n=6$),BICAO手术用来诱导大鼠全脑缺血。手术在戊巴比妥钠(50 mg/kg)麻醉下进行,沿大鼠颈部正中中线行长约2.5 cm纵行切口,钝性分离肌肉筋膜,轻柔剥离颈动脉鞘和伴行神经,充分显露双侧颈内动脉,使用5-0手术缝线永久结扎双侧颈内动脉后,复位分离的肌肉,对齐切口,使用4-0手术缝线缝合切口。正常组接受相同的操作过程至暴露双侧颈内动脉,不进行结扎,同样缝合切口。手术结束后将大鼠放回37℃的恒温箱内恢复至麻醉苏醒,而后将大鼠以3只一笼的密度放于清洁垫料饲养笼中。将润湿的饲料和清水放入笼内,以方便大鼠进食。术后24 h取各组大鼠大脑皮层组织进行后续分析。

1.2 RNA-Seq

对正常组和BICAO手术组大鼠大脑皮层组织进行高通量转录组测序分析。使用TRIzol法提取各组样本总RNA,并在苏州安升达生物科技有限公司完成RNA测序分析。用Agilent2100生物分析仪、NanoDrop和1%琼脂糖凝胶对每个样品的总RNA进行定量和鉴定。样品检测合格后,用Poly(A)mRNA磁分离模块或rRNA去除试剂盒分离得到Poly(A)mRNA,再加入First Strand Synthesis Re-

action Buffer 将 mRNA 裂解成片段。随后,用随机引物(random primers)以 mRNA 为模板进行反转录合成 cDNA,并进行末端修复、加接头。通过 beads 对双链 cDNA 进行片段大小选择,最后进行 PCR 扩增以构建 cDNA 文库。

对建好的文库先进行文库质检,质检合格的文库使用 Illumina HiSeq 高通量测序仪器,获得原始数据(raw data)。使用 Cutadapt(v1.9.1)对原始数据进行预处理,对低质量数据进行过滤,去除污染及接头序列,从而获得高质量清洁数据(clean data)。从 ENSEMBL 网站(<http://ensemblgenomes.org>)下载近缘物种的参考基因组序列后,使用 Hisat2(v2.0.1)将清洁数据与参考基因组进行比对。使用 HTSeq(v0.6.1)对于清洁数据估计基因和异构体的表达水平,获得基因表达量。

1.3 差异表达基因(differentially expressed genes, DEGs)的筛选

使用 R 程序 DESeq2 包进行差异表达分析。以校正后的 $P < 0.05$ 和 $|\log_2FC| > 1.0$ 作为标准筛选显著差异表达的基因,并使用 GraphPad Prism(v9.3.1)绘制火山图。

1.4 GO 和 KEGG 的富集分析

GO 富集分析从生物过程、细胞组成和分子功能 3 方面对基因产物进行标准化描述,来全面描述生物体中基因和基因产物的属性;KEGG 富集分析 DEGs 所参与的通路和生物学过程,从而可以表示参与其中的基因列表以及信号通路。将 DEGs 使用 R 程序 GO Seq 包以显著程度 $P < 0.05$ 筛选 GO 富集通路,并使用 topGO 软件做图。应用超几何检验,找出与整个基因组背景相比,在 DEGs 中显著性富集($P < 0.05$)的传导通路。

1.5 蛋白互作网络分析

将获得的显著性差异基因导入 STRING 数据库(<https://cn.string-db.org>),选择种属为“Rattus norvegicus”,筛选条件为“minimum required interaction score > 0.04”,将得到的蛋白质相互作用(protein protein interaction, PPI)关系导入 Cytoscape(v3.6.0)软件构建可视化网络,利用 cytoHubba 插件对整个网络进行基于 DMNC 算法的关键基因(hub

genes)计算,最后筛选核心子网络和连接度最高的蛋白质作为关键基因。

1.6 关键基因的潜在通路和生物过程分析

在 Genecards(<https://www.genecards.org>)网站分别搜索参与炎症、氧化应激、凋亡过程的基因,并寻找同时参与以上 3 个过程的关键基因。

1.7 相关药物预测

在 DGIdb(<https://dgidb.org>)数据库中,预测靶向关键基因的治疗药物,预测结果在 Cytoscape(v3.6.0)中可视化。

2 结果和分析

2.1 DEGs

研究共得到 770 条 DEGs,使用 DEGs 作火山图(图 1),红色代表上调基因,蓝色代表下调基因。将 DEGs 按照校正后的 $P < 0.05$, $|\log_2FC| \geq 1$ 进行筛选后共得到 197 个结果,包括 105 个上调基因和 92 个下调基因(表 1)。

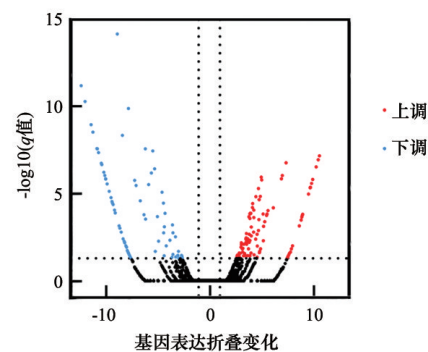


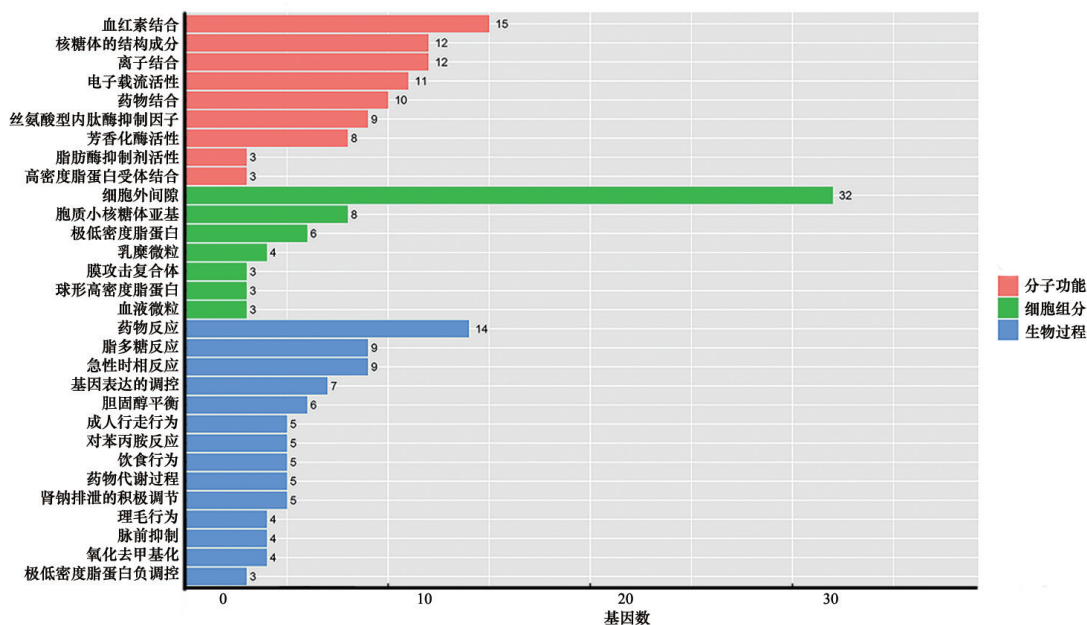
图 1 DEGs 火山图

2.2 DEGs 的 GO 富集分析

将筛选后的 197 个基因用 R 语言程序包 GOSep 进行数据分析,并使用 topGO 包选择富集最显著的 30 个 GOterm 作柱状图(图 2)。这些基因在人体内的生物学过程主要涉及对药物的反应、对内毒素的反应、急性-时相反应、基因表达调控、胆固醇稳态等。涉及的细胞组分主要有细胞外空间、胞质小核糖体亚基、极低密度脂蛋白、乳糜微粒、膜攻击复合体、球型高密度脂蛋白等。分析这些基因的分子功能,发现其主要涉及亚铁血红素结合、核糖体的结

表1 DEGs

基因表达	基因名称
上调	<i>Ndst4</i> , <i>LOC100910678</i> , <i>Calcr</i> , <i>Isl1</i> , <i>Arhgap36</i> , <i>Ogn</i> , <i>Six3</i> , <i>Nfs1</i> , <i>Lhx8</i> , <i>Lnp1</i> , <i>Dach1</i> , <i>AABR07040887.1</i> , <i>Tsen34</i> , <i>Adra2b</i> , <i>Ndufa1</i> , <i>LOC108348083</i> , <i>Gbx2</i> , <i>Smyd1</i> , <i>LOC100364435</i> , <i>Tmco3</i> , <i>Rbm12</i> , <i>Zar1</i> , <i>Gpr101</i> , <i>Oxt</i> , <i>Fau</i> , <i>Htr1d</i> , <i>AC241873.1</i> , <i>Ntrk1</i> , <i>AABR07043288.1</i> , <i>Avp</i> , <i>Mrpl53</i> , <i>Ccdc187</i> , <i>Mpz</i> , <i>Kdm5d</i> , <i>Ddx3</i> , <i>Drd3</i> , <i>Scn5a</i> , <i>LOC103693015</i> , <i>Rps29</i> , <i>LOC100362339</i> , <i>Oprk1</i> , <i>Eif2s3y</i> , <i>Wbp11l1</i> , <i>Cilp</i> , <i>LOC100912282</i> , <i>Klf8</i> , <i>Drd2</i> , <i>Spp1</i> , <i>Slc10a4</i> , <i>Gpr6</i> , <i>Ngfr</i> , <i>Rgs9</i> , <i>Syndig1l</i> , <i>Rpl32</i> , <i>LOC100911372</i> , <i>LOC103689941</i> , <i>Drd1</i> , <i>Adora2a</i> , <i>Ankk1</i> , <i>Tac1</i> , <i>AABR07027854.1</i> , <i>Ecel1</i> , <i>LOC100360647</i> , <i>Chat</i> , <i>AC239701.1</i> , <i>Htr2c</i> , <i>Slfn4</i> , <i>AABR07055776.1</i> , <i>LOC100912571</i> , <i>Tma7</i> , <i>AABR07025328.1</i> , <i>Nexn</i> , <i>Nts</i> , <i>Exoc2</i> , <i>Abi3bp</i> , <i>Slc5a7</i> , <i>Gpr149</i> , <i>Trh</i> , <i>Col2a1</i> , <i>Tbc1d10c</i> , <i>Map3k7</i> , <i>NEWGENE_1310561</i> , <i>Mir186</i> , <i>Eno2</i> , <i>LOC100909505</i> , <i>P2ry1Krt71</i> , <i>Ppial4d</i> , <i>Lrrc10b</i> , <i>AC141489.1</i> , <i>Rarb</i> , <i>Rps18</i> , <i>LOC687679</i> , <i>Arhgap6</i> , <i>Ntn1</i> , <i>Magel2</i> , <i>Sv2c</i> , <i>Cartpt</i> , <i>Cdhr1</i> , <i>Penk</i> , <i>Sulf1</i> , <i>Mctp1</i> , <i>Gpr88</i> , <i>Nkx2-1</i> , <i>RT1-DMb</i>
	<i>Rps18l1</i> , <i>LOC100911516</i> , <i>Ppia</i> , <i>Mt2A</i> , <i>Zbtb20</i> , <i>Tnnc2</i> , <i>Xkr6</i> , <i>Apoa1</i> , <i>AABR07034639.1</i> , <i>Tm2d3</i> , <i>Apoa5</i> , <i>LOC498231</i> , <i>AABR07053472.1</i> , <i>Rpl21</i> , <i>Tnfsf15</i> , <i>Cyp2e1</i> , <i>AABR07028622.1</i> , <i>Pzp</i> , <i>RGD1563962</i> , <i>Azgp1</i> , <i>Plg</i> , <i>Serpina1</i> , <i>Hp</i> , <i>AABR07034295.1</i> , <i>Aldob</i> , <i>RF00009</i> , <i>LOC100365810</i> , <i>AC134224.3</i> , <i>Hpx</i> , <i>Apob</i> , <i>RF00181</i> , <i>LOC680227</i> , <i>Apoa2</i> , <i>LOC100911402</i> , <i>Apoh</i> , <i>Ambp</i> , <i>AABR07057436.1</i> , <i>Pon1</i> , <i>RF01268</i> , <i>RF00026</i> , <i>Hrg</i> , <i>Sult2a2</i> , <i>Cyp1a2</i> , <i>AABR07024441.1</i> , <i>RF00181</i> , <i>AABR07039356.2</i> , <i>Afm</i> , <i>Cyp2c23</i> , <i>AABR07017825.7</i> , <i>Cyp2d2</i> , <i>Cyp4a3</i> , <i>Cyp3a23/3a1</i> , <i>Cyp2c13</i> , <i>Cyp2c11</i> , <i>Serpina4</i> , <i>C8a</i> , <i>C8b</i> , <i>LOC100360095</i> , <i>Cyp2c7</i> , <i>Ces1f</i> , <i>Ugt2b</i> , <i>Fga</i> , <i>Fgl1</i> , <i>Itih1</i> , <i>LOC681180</i> , <i>RF00181</i> , <i>Alb</i> , <i>Cyp2c6v1</i> , <i>F2</i> , <i>Fabp1</i> , <i>G6pc</i> , <i>Cyp4a2</i> , <i>C9</i> , <i>Rup2</i> , <i>Orm1</i> , <i>Fetub</i> , <i>Pigr</i> , <i>Mat1a</i> , <i>Crp</i> , <i>Pck1</i> , <i>Apoc3</i> , <i>LOC297568</i> , <i>LOC103690160</i> , <i>Serpina3c</i> , <i>AABR07034632.1</i> , <i>Kng1</i> , <i>Fgg</i> , <i>Gc</i> , <i>LOC299282</i> , <i>Fgb</i> , <i>RF02266</i> , <i>Hba-a2</i>
下调	



纵坐标为富集的GOterm,横坐标为差异基因个数。不同颜色分别代表生物过程、细胞组分和分子功能。

图2 DEGs的GO分析柱状图

构组成、铁离子结合、电子载流子活度等。

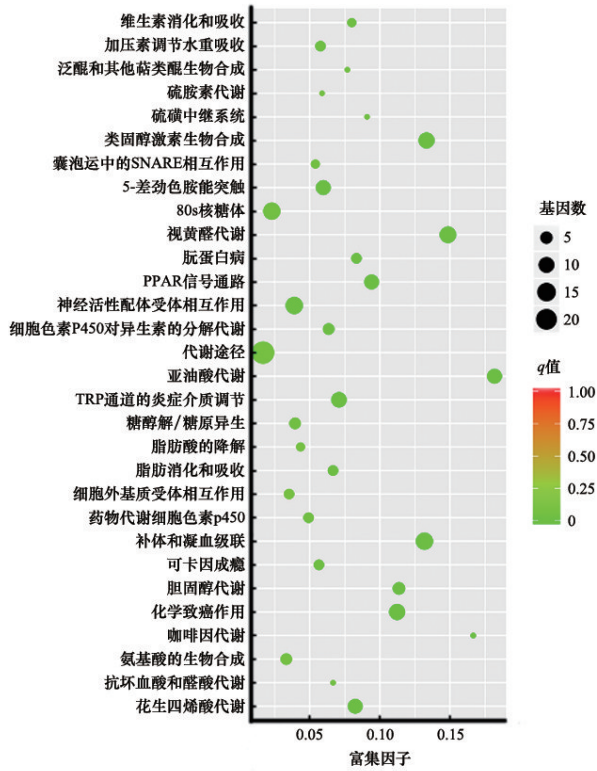
2.3 DEGs的KEGG富集分析

KEGG通路分析中,根据 $P < 0.05$ 条件进行筛选(图3)。DEGs主要涉及代谢、神经活性配体-受体相互作用、补体和凝血级联、类固醇激素的生物合

成等途径。

2.4 DEGs的蛋白互作网络分析

利用STRING在线工具分析DEGs,构建DEGs的蛋白互作网络图,结果显示共有166个节点和785条边,将其导入Cytoscape软件如图4(a)所



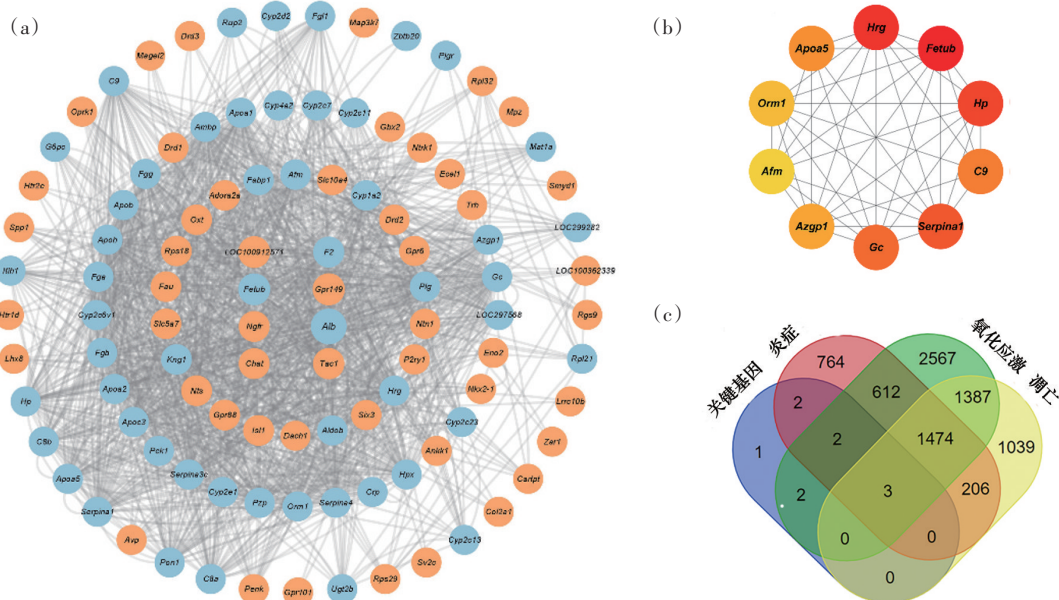
纵轴表示通路名称,横轴表示富集程度,点的大小表示此通路中DEGs个数多少,点的颜色对应不同的q值范围。

图3 DEGs的KEGG富集分析散点图

示。基于DMNC算法应用CytoHubba插件,确定PPI网络中的关键节点,得到10个关键基因,即HP, SERPINA1, FETUB, HRG, ORM1, AZGP1, GC, C9, APOA5, AFM如图4(b)和表2。至此,本研究从众多DEGs中筛选到10个关键基因,为后续找寻IS关键靶点及核心基因奠定了基础。

2.5 关键基因的通路和生物过程分析

在Genecards数据库设置条件“Relevance score >1”筛选得到参与炎症过程的基因3063个,参与氧化应激过程的基因6047个,参与凋亡的基因4109个。将关键基因与炎症、氧化应激、凋亡有关的基因取交集做维恩图,如图4(c)所示,可见关键基因中,共有3个核心基因(ORM1、SERPINA1、GC)同时与炎症、氧化应激、凋亡过程有关。这些基因分别编码α-1-酸性糖蛋白1(orosomuroid, ORM或α1-acid glycoprotein1, AGP1)、52 kDa的单链糖蛋白α1抗胰蛋白酶(α1-antitrypsin, AAT)及维生素D结合蛋白(vitamin D-binding protein, DBP),进而可以通过调节上述3个生物学过程影响IS的病理生理学改变,这为疾病机制研究发掘了新的靶点,为疾病临床防治开辟了新的领域。



(a) DEGs的蛋白互作网络,红色代表上调基因,蓝色代表下调基因; (b) 筛选出的关键基因互作网络,颜色越深,代表cytoHubba的DMNC分数越高; (c) 关键基因和炎症、氧化应激、凋亡取交集的Venn图。

图4 DEGs的蛋白互作网络和关键基因

表2 关键基因

基因	描述	调节	通路或生物过程		
			炎症	氧化应激	凋亡
<i>HP</i>	触珠蛋白	下调	+	+	-
<i>SERPINA1</i>	塞尔平家族A成员1	下调	+	+	+
<i>FETUB</i>	胎球蛋白B	下调	+	-	-
<i>HRG</i>	富组氨酸糖蛋白	下调	+	-	-
<i>ORM1</i>	血清类粘蛋白	下调	+	+	+
<i>AFM</i>	α -酸性糖蛋白	下调	-	-	-
<i>GC</i>	GC维生素D结合蛋白	下调	+	+	+
<i>C9</i>	补体C9	下调	-	-	-
<i>APOA5</i>	载脂蛋白A5	下调	+	+	-
<i>AZGP1</i>	α -2-糖蛋白1, 锌结合	下调	-	-	-

2.6 药物靶点预测

在DGIdb基因—药物作用数据库中,筛查作用于关键基因的药物。红色节点代表关键基因,蓝色节点代表靶向药物。本研究筛选到2个核心基因*SERPINA1*和*GC*,以及9种这些基因相关的靶向药物。其中,贝伐珠单抗(bevacizumab)、地拉罗司(deferasirox)、酒石酸阿非司他(afegostat tartrate)、茴茴二酮(anisindione)、哌多明(pirsidomine)、西妥昔单抗(cetuximab)、阿司匹林(aspirin)靶向*GC*;伊格美新(igmesine)和 α 1蛋白酶抑制剂(alpha.1-proteinase inhibitor)靶向*SERPINA1*(图5)。这些新老药物有抑制血小板的形成、抗肿瘤、保护神经的作用,均与核心基因功能调节相关,它们的发现为IS未来的防治提供了更多选择。

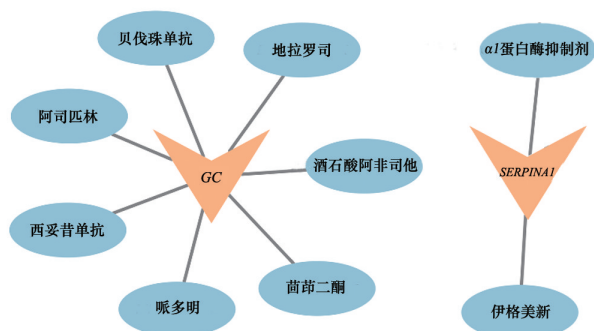


图5 关键基因-药物作用网络

3 讨论

GO富集分析结果显示,DEGs主要参加的生物学过程为急性时相反应。IS的特征是急性起病,突发神经系统缺损症状,本研究发现的DEGs作用特点与其一致,说明这些基因很可能在IS中起到关键作用。目前研究认为,局部和全身炎症反应是IS病理生理学的主要组成部分,神经炎症可能深度参与缺血性脑损伤的发生。不仅如此,坏死的脑组织还可以进一步提高炎症水平,继而加重神经损伤和临床症状。上述神经炎症的特征包括小胶质细胞迅速激活和细胞因子、趋化因子、自由基的产生,这些分子和IS继发性脑损伤密切相关^[9]。KEGG富集分析结果显示,DEGs主要参与能量代谢、补体和凝血级联等通路。细胞能量代谢的主要场所是线粒体,线粒体可以通过氧化磷酸化,利用电子传递链产生三磷酸腺苷(ATP),这是人体内能量产生的主要途径^[10]。能量对于神经元的兴奋性和突触传递至关重要,线粒体产生的大部分能量都被用于神经元的电活动,而人脑中良好的葡萄糖代谢和充足的血流量是神经元突触活动的重要保障^[11]。IS患者脑组织缺血缺氧时,电子传递链功能障碍,不能产生足够的ATP,导致能量生成障碍,能量代谢方式从氧化磷酸化转变为糖的无氧酵解,最终导致细胞损伤和死亡^[12]。本研究发现的代谢相关DEGs很显然与IS的发生发展密切相关,如果上调能量代谢

相关基因,将会提高脑组织的耐受性,保护细胞、减轻症状,为临床治疗赢得时间。凝血和纤溶系统的动态平衡是保证血流状态正常的根本,若是平衡紊乱,则可诱发血栓形成。补体和凝血级联通路障碍时,纤维蛋白原水平增加,血小板的异常活化、大量黏附、聚集,凝血-纤溶平衡被打破,可使机体血液黏稠度增加,从而导致脑血栓形成,IS的发生。反过来说,IS发生后,机体会维持在高凝状态,纤维蛋白原水平增加,从而促进凝血通路的激活^[13]。凝血功能相关DEGs的良性变化,将会有利于纠正凝血功能异常,对血管再通、组织恢复血氧供应提供有力保障。

本研究利用Cytoscape的cytoHubba插件,寻找与IS发病相关的关键基因,发现有7个关键基因参与了炎症过程,5个参与了氧化应激过程,3个参与了细胞凋亡过程。并且有3个关键基因(*ORM1*、*SERPINA1*、*GC*)同时参加了这3个过程,这提示IS是一种多因素、多通路介导的疾病,炎症、氧化应激、凋亡可能是它损伤发生过程的重要环节。氧化应激是缺血再灌注损伤的一个组成部分,ROS的过量产生与氧化应激密切相关。ROS包括超氧化物、过氧化氢、羟自由基等,它们是细胞生物反应的副产物之一,主要在线粒体中产生^[14]。正常情况下,ROS会被机体中包含超氧化物歧化酶、过氧化氢酶、谷胱甘肽硫转移酶等在内的强大抗氧化系统中中和。但是,一旦ROS过量,则会抑制细胞中的抗氧化系统,从而产生蛋白质破坏、脂质过氧化、DNA损伤等细胞效应,并最终导致线粒体电子呼吸链功能障碍和神经元的死亡^[15-16]。免疫系统参与缺血级联反应的所有阶段,包括血液供应中断引发的急性血管内事件、脑实质损伤以及随后的组织修复。脑缺血产生的分子信号激活先天免疫系统,促进炎症信号,并促进细胞成分破坏和细胞死亡。另一方面,它还会影响血管张力和内皮细胞通透性,血脑屏障破坏,启动脑细胞的凋亡和坏死过程^[17]。

同时,在参与3个过程的*ORM1*、*SERPINA1*、*GC*这3个基因中,*ORM1*基因编码的ORM是一种分子量为41~43 kDa的急性时相血浆糖蛋白,由肝细胞合成并分泌到血液中,含有一个高度分支的N-连

接的糖链。它有2个亚型,即ORM1和ORM2,ORM的合成是由ORM1和ORM2的2个位点的不同等位基因控制的^[18-19]。ORM的血浆含量可在慢性炎症、过敏、烧伤时增加^[20]。有文献报道显示,ORM可以调节血浆中的cfDNA(cell-free DNA)含量,从而促进血浆中免疫血栓的形成^[21]。这提示ORM可能参与IS中炎症相关病理改变,可能成为血栓加重及进展性卒中的干预靶点和方向,但其与脑血栓形成的具体关系和机制尚需进一步研究明确。*SERPINA1*基因编码的AAT主要由肝脏合成,作用是抑制丝氨酸蛋白酶,如中性粒细胞弹性蛋白酶、胰酶、凝乳酶和纤溶酶原激活剂,这种抑制作用是通过减少丝氨酸蛋白酶介导的炎症完成的^[22-23]。AAT有抗炎和抗细胞凋亡作用,它可以抑制促炎细胞因子如IL6的产生。有研究表明,将AAT给予脑缺血损伤的大鼠,可以减少缺血梗死的范围,起到神经保护和减少行为缺陷的作用。所以,AAT作为一种治疗缺血性脑卒中的新方法具有广阔的应用前景^[24]。*GC*基因编码的DBP属于白蛋白家族,主要由肝脏合成。DBP的主要作用是运输维生素D及其代谢产物^[25]。研究发现,低水平的维生素D和25羟维生素D[25(OH)D]是IS的危险因素之一,25(OH)D低的个体遗传倾向于较高的DBP^[26]。但是,维生素D、DBP和IS的关系还需要进一步证实,未来维生素D代谢调节通路可能会成为IS预防和治疗的环节。

可以发现,上述3个基因在IS发病机制、疾病预防、进展和治疗等方面具有很重要的作用,通过干预相关基因及相关蛋白、通路的不同靶点有可能找到新的IS治疗药物。于是,本研究在DGIdb数据库中查找靶向以上3个基因的药物,网络中共筛出2个核心基因和9种药物。其中,阿司匹林作为抗血小板药物现在已广泛应用于IS的治疗。在IS非发作期预防性给予神经保护剂可以建立神经保护状态,当缺血事件发生时可以保护神经。上述药物中的地拉罗斯就是一种神经保护剂,在IS发病前将其给与有复发风险的高危卒中患者,可以建立神经保护,减少卒中复发的缺血性损害^[27]。由于地拉罗斯是一种临床使用的口服药物,耐受性良好,它有望预防高危IS患者的卒中。但是,它对IS的预防效

果目前还未知,需要进一步展开临床试验研究。

4 结论

基于正常大鼠和BICAO大鼠皮层组织的基因表达检测,筛选得到DEGs共197个。对DEGs进行GO功能富集分析和KEGG通路富集分析,构建PPI网络,进一步分析得到和IS密切相关的关键基因。最后基于关键基因,预测了IS可能的治疗药物。

本研究成果加深了对IS发病机制的认识,通过RNAseq和生物信息学方法筛查出的疾病相关的关键基因可能会成为IS诊断的生物标志物或者新的药物治疗靶点。后续还需要对于这些基因在IS中的具体作用机制和相关药物的疗效进行更加深入的研究,从而对于更多的IS患者做到早诊早治,进一步降低疾病的致残率和致死率。

参考文献(References)

- [1] Campbell B C V, de Silva D A, Macleod M R, et al. Ischaemic stroke[J]. *Nature Reviews Disease Primers*, 2019, 5(1): 70.
- [2] Maida C D, Norrito R L, Daidone M, et al. Neuroinflammatory mechanisms in ischemic stroke: Focus on cardioembolic stroke, background, and therapeutic approaches [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(18): 6454.
- [3] Won S J, Kim J E, Cittolin-Santos G F, et al. Assessment at the single-cell level identifies neuronal glutathione depletion as both a cause and effect of ischemia-reperfusion oxidative stress[J]. *The Journal of Neuroscience*, 2015, 35(18): 7143-7152.
- [4] Vidale S, Consoli A, Arnaboldi M, et al. Postischemic inflammation in acute stroke[J]. *Journal of Clinical Neurology*, 2017, 13(1): 1-9.
- [5] Sorby-Adams A J, Marcoianni A M, Dempsey E R, et al. The role of neurogenic inflammation in blood-brain barrier disruption and development of cerebral oedema following acute central nervous system (CNS) injury[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2017, 18(8): 1788.
- [6] 梁宏艳, 李明, 惠文, 等. 急性缺血性卒中患者救治时间延迟的研究进展[J]. *中国脑血管病杂志*, 2019, 16(12): 662-666.
- [7] Akalin P K. Introduction to bioinformatics[J]. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2006, 50(7): 610-619.
- [8] Zou R, Zhang D, Lü L, et al. Bioinformatic gene analysis for potential biomarkers and therapeutic targets of atrial fibrillation-related stroke[J]. *Journal of Translational Medicine*, 2019, 17(1): 45.
- [9] Jiang C T, Wu W F, Deng Y H, et al. Modulators of microglia activation and polarization in ischemic stroke[J]. *Molecular Medicine Reports*, 2020, 21(5): 2006-2018.
- [10] Annesley S J, Fisher P R. Mitochondria in health and disease[J]. *Cells*, 2019, 8(7): 680.
- [11] Yang J L, Mukda S, Chen S D. Diverse roles of mitochondria in ischemic stroke[J]. *Redox Biology*, 2018, 16: 263-275.
- [12] Narne P, Pandey V, Phanithi P B. Interplay between mitochondrial metabolism and oxidative stress in ischemic stroke: An epigenetic connection[J]. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 2017, 82: 176-194.
- [13] 陈志奇, 兰小英. D-二聚体、纤维蛋白原联合血小板计数对缺血性脑卒中的诊断价值研究[J]. *吉林医学*, 2022, 43(7): 1934-1937.
- [14] Duan J, Gao S, Tu S, et al. Pathophysiology and therapeutic potential of NADPH oxidases in ischemic stroke-induced oxidative stress[J]. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2021, 2021: 6631805.
- [15] Andrabi S S, Parvez S, Tabassum H. Ischemic stroke and mitochondria: Mechanisms and targets[J]. *Protoplasma*, 2020, 257(2): 335-343.
- [16] Kiselyov K, Muallem S. ROS and intracellular ion channels[J]. *Cell Calcium*, 2016, 60: 108-114.
- [17] Iadecola C, Anrather J. The immunology of stroke: From mechanisms to translation[J]. *Nature Medicine*, 2011, 17(7): 796-808.
- [18] Qiong L, Yin J. Characterization of alpha-1-acid glycoprotein as a potential biomarker for breast cancer[J]. *Bioengineered*, 2022, 13(3): 5818-5826.
- [19] Mondal G, Chatterjee U, Das H R, et al. Enhanced expression of alpha1-acid glycoprotein and fucosylation in hepatitis B patients provides an insight into pathogenesis [J]. *Glycoconjugate Journal*, 2009, 26(9): 1225-1234.
- [20] Qiong L, Yin J. Orosomucoid 1 promotes epirubicin resistance in breast cancer by upregulating the expression of matrix metalloproteinases 2 and 9[J]. *Bioengineered*, 2021, 12(1): 8822-8832.
- [21] Lopez S, Martinez-Perez A, Rodriguez-Rius A, et al. Integrated GWAS and gene expression suggest ORM1 as a

- potential regulator of plasma levels of cell-free DNA and thrombosis risk[J]. *Thrombosis and Haemostasis*, 2022, 122(6): 1027–1039.
- [22] Tiensuu H, Haapalainen A M, Tissarinen P, et al. Human placental proteomics and exon variant studies link AAT/SERPINA1 with spontaneous preterm birth[J]. *BMC Medicine*, 2022, 20(1): 141.
- [23] Cabezas-Llobet N, Camprubí S, García B, et al. Human alpha 1-antitrypsin protects neurons and glial cells against oxygen and glucose deprivation through inhibition of interleukins expression[J]. *Biochimica et Biophysica Acta: General Subjects*, 2018, 1862(9): 1852–1861.
- [24] Moldthan H L, Hirko A C, Thinschmidt J S, et al. Alpha 1-antitrypsin therapy mitigated ischemic stroke damage in rats[J]. *Journal of Stroke & Cerebrovascular Diseases*, 2014, 23(5): e355–e363.
- [25] Moon M, Song H, Hong H J, et al. Vitamin D-binding protein interacts with A β and suppresses A β -mediated pathology[J]. *Cell Death and Differentiation*, 2013, 20(4): 630–638.
- [26] Schneider A L, Lutsey P L, Selvin E, et al. Vitamin D, vitamin D binding protein gene polymorphisms, race and risk of incident stroke: The atherosclerosis risk in communities (ARIC) study[J]. *European Journal of Neurology*, 2015, 22(8): 1220–1227.
- [27] Zhao Y, Rempe D A. Prophylactic neuroprotection against stroke: Low-dose, prolonged treatment with deferoxamine or deferasirox establishes prolonged neuroprotection independent of HIF-1 function[J]. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 2011, 31(6): 1412–1423.

Screening of key genes and prediction of therapeutic agents for ischemic stroke based on transcriptome sequencing and bioinformatics methods

WANG Yue^{1,2}, ZHOU Yue^{1,2}, ZHAO Li³

1. The National Clinical Research Center for Mental Disorders & Beijing Key Laboratory of Mental Disorders, Beijing Anding Hospital, Capital Medical University, Beijing 100088, China
2. Advanced Innovation Center for Human Brain Protection, Capital Medical University, Beijing 100069, China
3. Department of Neurobiology, School of Basic Medical Sciences, Capital Medical University, Beijing 100069, China

Abstract In this study, bioinformatics methods were used to preliminarily screen ischemic stroke (IS)-related differentially expressed genes (DEGs) and hub genes, and then predict potential IS therapeutics. DEGs were screened after transcriptome sequencing (RNA-Seq) in the cortex of the normal group and the bilateral internal carotid artery occlusion (BICAO) group. GO and KEGG enrichment analysis of DEGs were performed and protein interaction networks of DEGs were constructed, and key genes were obtained. Finally, IS related drugs were predicted according to the key genes. A total of 197 significant DEGs were obtained in this study, and enrichment analysis showed that these genes were mainly involved in metabolism, neuroactive ligand-receptor interactions, complement/coagulation cascade and biosynthesis of steroid hormones. DEGs have a close interrelationship, and among the genes most closely related, *ORM1*, *SERPINA1* and *GC* all participate in the process of inflammation, oxidative stress and apoptosis, which are the key genes in the pathogenesis of IS. Therefore, inflammation, oxidative stress and apoptosis may be closely related to the occurrence and development of IS. It has potential clinical significance for drug treatment targeting hub genes such as *ORM1*, *SERPINA1*, and *GC*.

Keywords ischemic stroke; RNA-sequencing; bioinformatics; differentially expressed genes; drugs prediction ●



(责任编辑 徐丽娇)