

基于生物信息学途径筛选缺血性脑卒中关键基因及药物预测

于 瑜, 王钟兴

(中山大学附属第一医院麻醉科, 广东 广州 510080)

摘 要:【目的】筛选缺血性脑卒中的关键基因及重要信号通路,预测可能对脑卒中有用的药物。【方法】从 GEO 数据库下载 GSE98319 基因芯片数据,该数据包含了假手术组、大脑中动脉梗塞组(MCAO)小鼠的基因芯片检测结果。用 R 语言的 Limma 包对数据进行差异表达分析, $P < 0.05$ 且 $\log_2FCI > 0.6$ 的基因为差异表达基因。借助 STRING 网站构建差异表达基因的蛋白质相互作用网络(PPIN)后由 Cytoscape 软件进行核心子网络筛选及可视化输出。筛选出核心基因后用实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)验证核心基因在脑缺血小鼠大脑皮层的表达情况。基因集富集分析(GSEA)算法用于京都基因与基因组百科全书(KEGG)和基因本体(GO)富集分析,以 $FDR < 0.05$ 作为富集标准。最后用 Connectivity Map 数据库预测脑卒中的潜在作用药物。【结果】共筛出 521 个差异 mRNA,其中 421 个上调、100 个下调,其中 2 个关键基因 *Drd4*($P=0.000\ 019$)和 *Hcar2*($P=0.000\ 094$)经 qRT-PCR 实验证实脑缺血后表达均升高。4 种小分子化合物艾司洛尔(Esmolol)、甲巯咪唑(Methimazole)、吐根酚碱(Cephaeline)、水仙环素(Narciclasine)可能对缺血性卒中有治疗作用。【结论】*Drd4* 和 *Hcar2* 可能与缺血性卒中的发生发展密切相关。预测出的 4 种药物可为后续药物研究提供参考。

关键词:缺血性脑卒中;基因集富集分析;生物信息学;药物预测

中图分类号:R743.4 文献标志码:A 文章编号:1672-3554(2021)01-0042-09

Screening of Key Genes and Prediction of Drugs for Ischemic Stroke Based on Bioinformatics Approach

YU Yu, WANG Zhong-xing

(Department of Anesthesiology, The First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Correspondence to: WANG Zhong-xing; E-mail: Doctorwx@126.com

Abstract:【Objective】To screen out key genes and important signal pathways of ischemic stroke to predict potential drugs that might be useful for stroke.【Methods】We obtained GSE98319 Microarray data from GEO database which contained sequencing results from control (Sham group) and experimental (middle cerebral artery occlusion, MCAO) mice. Limma package of R language was used to analyze Microarray data. Differentially expressed genes were selected with $P < 0.05$ and $\log_2FCI > 0.6$ as the criteria. Protein-Protein Interaction Network (PPIN) of differentially expressed genes was constructed by STRING online website and visualized by Cytoscape software. Quantitative real-time polymerase chain reaction(qRT-PCR)was performed to testify hub genes expression level. Gene Set enrichment analysis (GSEA) algorithm was used in functional enrichment analysis of Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomics (KEGG) and Gene Ontology (GO) with $FDR < 0.05$ as the enrichment standard. Finally, potential agents for stroke were predicted by Connectivity Map.【Results】A total of 521 differentially expressed genes were identified, 421 up-regulated and 100 down-regulated. Two hub genes: *Drd4*($P=0.000\ 019$)and *Hcar2*($P=0.000\ 094$)expression level upregulated in stroke mice cortex validated by qRT-PCR. Finally, four small molecule compounds: Esmolol, Methimazole, Cephaeline and Narciclasine were

收稿日期:2020-12-03

基金项目:国家自然科学基金(81971877);广州市科技项目(201904010418)

作者简介:于瑜,硕士,研究方向:脑缺血再灌注损伤的保护,E-mail:syuyuyu@163.com;王钟兴,通信作者,博士研究生导师,主任医师,E-mail:Doctorwx@126.com

predicted to have potential therapeutic effects on ischemic stroke. [Conclusions] *Drd4* and *Hcar2* may be closely related to the occurrence and development of ischemic stroke. Four potential therapeutic drugs are predicted, providing reference for the subsequent research on drug therapy.

Key words: ischemic stroke; GSEA; bioinformatics; drugs prediction

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2021, 42(1):42-50]

脑卒中作为全球第二大死亡原因,严重危害人类健康。全球每年约有550万人死于脑卒中,每4个成年人中就有1人发病^[1]。发病后遗留的身体残疾和神经功能障碍给中风幸存者的家庭及社会造成极大负担。在脑卒中病例中,缺血性脑卒中(以下简称脑缺血)约占70%,是脑卒中的主要类型^[1]。目前,临床上脑缺血的主要治疗方法包括脑血管再通和神经保护。遗憾的是,这些措施收益有限。为了找到更有效的治疗方式以及治疗靶点,许多科学家从遗传学角度出发,寻找与脑缺血密切相关的基因,希望为治疗提供更多选择。例如:有研究人员利用高通量组学技术发现CLDN20、GADD45G、RGS2、BAG5和CTNND2可以作为小鼠和人类血液样本中脑缺血的血液生物标记物,协助脑缺血的临床诊断^[2]。MAP2K4(丝裂原活化蛋白激酶4)是MAPK通路的重要枢纽,MAP2K4基因多态性rs3826392可能在脑缺血后的炎症反应中发挥调节作用^[3]。这些从基因层面解读脑缺血病理生理过程的研究对治疗方案的研发有一定启迪作用。因此,本研究借助生物信息学手段,通过对公共数据库的分析,寻找对缺血性脑卒中有重要作用的基因及相关通路,希望找到潜在治疗药物,能为缺血性脑卒中的进一步研究和后续治疗提供线索。

1 材料与方法

1.1 数据收集

大脑中动脉栓塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)是研究缺血性脑卒中的常用动物模型,可精确控制缺血时长。本研究选择GEO数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)中研究MCAO小鼠表达谱变化的芯片集GSE98319。该数据集包含MCAO小鼠和假手术组小鼠大脑皮层的检测结果。每组各3个样本。

1.2 差异表达分析

用R语言的ggplot包绘制6个样本总体基因表

达箱线图,并对芯片集进行多维度分析(multidimensional scaling, MDS)。Limma包用于差异表达分析,根据测序平台注释信息及Ensemble数据库对基因类型的注释信息,将探针ID转换为相应的基因名称(gene symbol)并删除LncRNA的数据。选择 $P < 0.05$ 且 $|\log_2FC| > 0.6$ 作为差异表达基因(differential expressed genes, DEG)筛选标准。差异分析结果以火山图形式呈现。用R语言绘制热图展示数据集的聚类情况。

1.3 蛋白质互作网络构建及核心基因筛选

利用STRING(<http://www.string-db.org/>)在线数据库对DEG进行分析,预测可能在脑缺血发病过程中发挥重要作用的基因所编码蛋白质之间的互作关系。选择中度置信度(作用关系综合得分0.4-0.7)作为显著标准。将STRING分析结果导入Cytoscape 3.7.1.软件进行可视化,使用Cytohubba和MCODE插件对PPIN进行分析。通过Cytohubba计算出每个节点的度(Degree)^[4],Degree得分前10的基因构成的网络可视作核心子网络。通过MCODE(molecular complex detection)从蛋白质互作网络(protein-protein interaction network, PPIN)中筛出得分最高的3个功能模块亦视作核心子网络^[5]。为了进一步缩小核心基因范围,将MCODE评分最高模块的基因及Degree得分前10的基因进行整合,他们与DEG中 $|\log_2FC|$ 排名前20基因的交集即为核心基因(hub genes)。

1.4 小鼠大脑中动脉梗塞模型建立及核心基因表达水平测定

1.4.1 大脑中动脉梗塞模型建立及实验分组 3只6~8周SPF级雄性C57B/6J小鼠购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,小鼠体质量为18~25g,许可证号:SCXK(湘)2019-0004。本实验经中山大学实验动物管理与使用委员会同意。3%异氟烷诱导后将小鼠仰卧固定于操作台并戴上麻醉面罩,术中以1.5%异氟烷维持麻醉。颈部备皮消毒后颈正中切口,小心暴露右侧颈动脉鞘并将右侧颈总、颈

外及颈内动脉分离出来,在三角分叉处远端结扎颈外动脉,近端穿一根线打活结,用动脉夹夹闭颈总动脉及颈内动脉,在颈外动脉中间剪一小口,将线栓插入颈外动脉后松开颈内动脉夹,将线栓缓慢沿着颈内动脉插入,线栓上的黑色标记点到达三角分叉处(插入约1 cm左右),有明显阻力时停止。固定线栓,松开颈总动脉夹,缝合伤口。将小鼠放回笼内,侧卧,插栓侧朝上,维持体温。缺血30 min后经原切口拔出线栓,恢复血供,再灌注12 h后留取小鼠双侧大脑皮质。小鼠缺血侧皮层为MCAO组,对侧为对照组(CTRL组)。

1.4.2 标本收集以及 qRT-PCR 验证基因表达变化 按照奕杉生物组织RNA提取试剂盒说明书提取小鼠双侧皮层RNA,用翊圣生物Hifair® III 1st Strand cDNA Synthesis SuperMix for qPCR试剂盒将RNA逆转录成cDNA后按照Hieff® qPCR SYBR® Green Master Mix配置出实时荧光定量PCR(quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)体系进行检测。以Actin为内参,用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 相对定量法分析待测基因的转录水平。所用引物序列见表1。

1.4.3 统计方法 采用SPSS 17.0统计软件进行统计分析。RNA相对表达量为连续性资料,以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用 t 检验(双侧), $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

1.5 GSEA算法进行功能富集分析

本研究选择GSEA C2数据集中的KEGG基因集(c2.cp.kegg.v7.2.)和C5数据集中的GO基因集(c5.go.mf.v7.2.entrez、c5.go.bp.v7.2.entrez、c5.go.cc.v7.2.entrez)为预设基因集,利用R语言对差异分析结果进行GSEA分析。FDR(false discovery rate) < 0.05作为富集通路的筛选标准。富集结果图由R语言的clusterProfiler包^[6]和GSEA函数进行绘制。

1.6 缺血性脑卒中药物预测

Connectivity Map (CMap)数据库包含1 309种小分子化合物作用于多种细胞系引起的基因表达谱变化数据,可用于比较药物诱导的基因图谱与基因表达之间的相似性,并得到一个从-100到100的连通性评分:该评分大于0,表示化合物引起和上传基因相似的变化;评分小于0,表示该化合物引起和上传基因相反的变化,即该化合物可能对疾病有治疗作用^[7]。由于CMap将上传基因数目限制在150个,本文将 $|\log_2 FCI|$ 前150上调DEG和全部下调DEG(100个)分别上传至Cmap在线数据库(<https://clue.io/>)进行药物预测。连通性评分<-80的小分子化合物作为本次预测的结果。

2 结 果

2.1 缺血性脑卒中差异表达基因的筛选

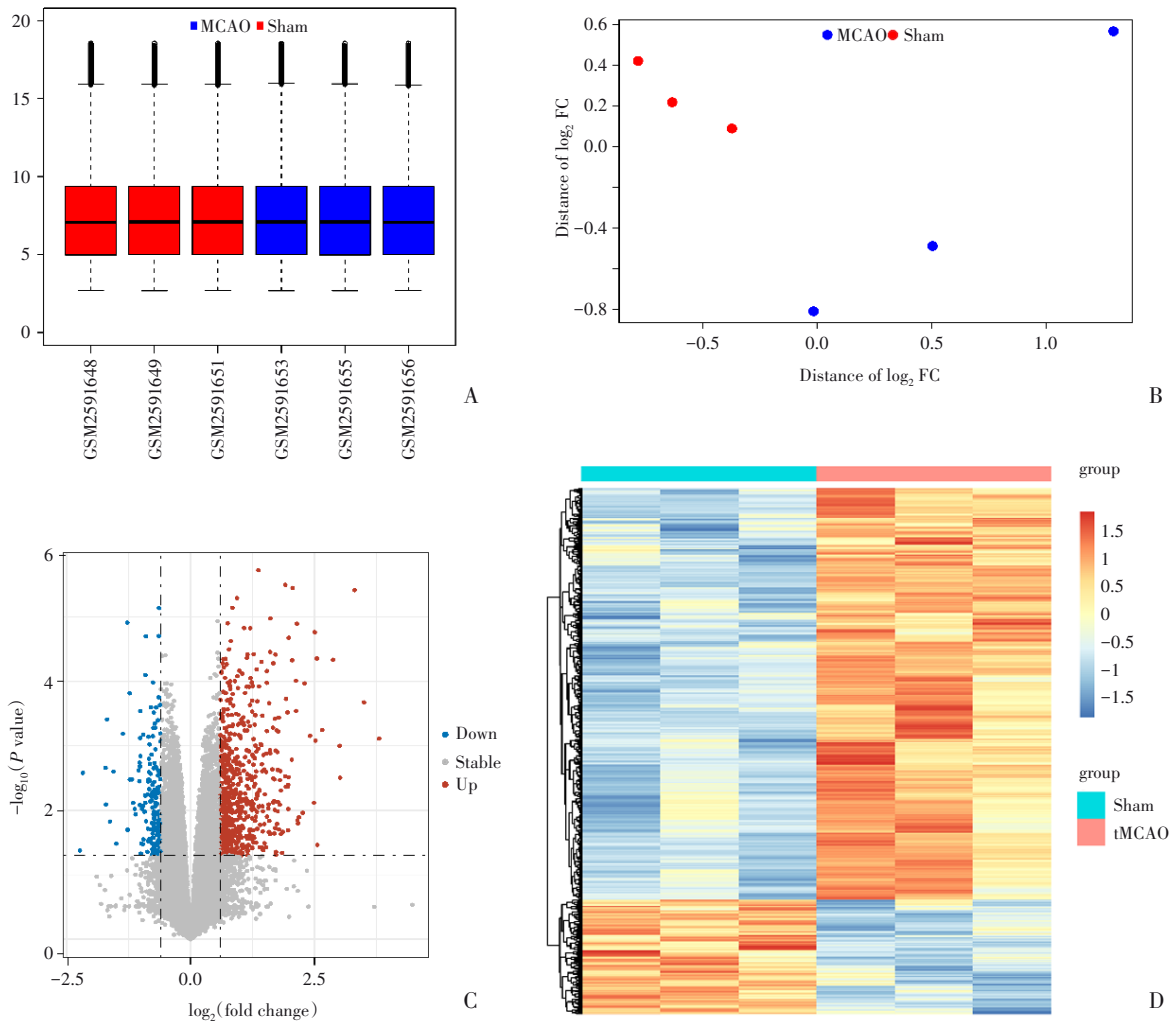
GSE98319数据集的箱线图提示各样本基因表达水平均衡(图1A),具有可比性。MDS(图1B)分析结果提示MCAO组和假手术组能进行有效区分。图1C显示GSE98319芯片集差异表达分析的结果;不同变化方向的基因表达基因用不同颜色进行展示。将这些差异基因中lncRNA删去,根据筛选条件,筛出521个差异mRNA,其中421个上调、100个下调。图1D为该数据集的热图,该数据集样本聚类效果较好,可信度较高。

2.2 缺血性脑卒中蛋白互作网络的构建以及核心基因的筛选

通过STRING预测521个DEG所编码蛋白质之间的相互作用关系。将预测结果导入Cytoscape软件构建出蛋白质互作网络(图2)。此外,用Cytoscape的插件CytoHubba和MCODE筛选出PPIN中的核心子网络:度(Degree)排名前10的基因构成的子网络(图3A)以及MCODE评分最高的子网络(图

表1 qRT-PCR使用引物序列
Table 1 Primers used for qRT-PCR

Gene	Forward Primer Sequence	Reverse Primer Sequence
<i>Hear2</i>	5'-CTGGAGGTTCCGAGGCATC-3'	5'-TCGCCATTTTTGGTCATCATGT-3'
<i>Drd4</i>	5'-GCCTGGAGAACCGAGACTATG-3'	5'-CGGCTGTGAAGTTTGGTGTG-3'
<i>Actin</i>	5'-GGCTGTATCCCCTCCATCG-3'	5'-CCAGTTGGTAACAATGCCATGT-3'



A: Boxplot of GSE98319 gene chip. B: MSD analysis plot of GSE98319 gene chip. C: Volcano map of GSE98319 gene chip. Red and blue spots represent differentially expressed genes, red dots represent up-regulated genes and blue ones represent down-regulated genes. D: Hierarchical clustering showed lncRNA and mRNA expression profile between the MCAO groups and Sham group. The color from blue to red indicates that the level of transcription is from low to high. (n=3/group)

图1 GSE98319 芯片数据集箱线图、MDS 图、差异表达基因火山图以及热图

Fig. 1 Plots of GSE98319 gene chips

3B)。为了进一步缩小核心基因的范围，Degree 前 10 的基因及构成 MCODE 得分最高子网络的基因与 DEG 中上调倍数最高的 20 个基因求交集(图4)，筛选出 *Drd4* 和 *Hcar2* 2 个核心基因，表 2 为他们的差异分析结果。

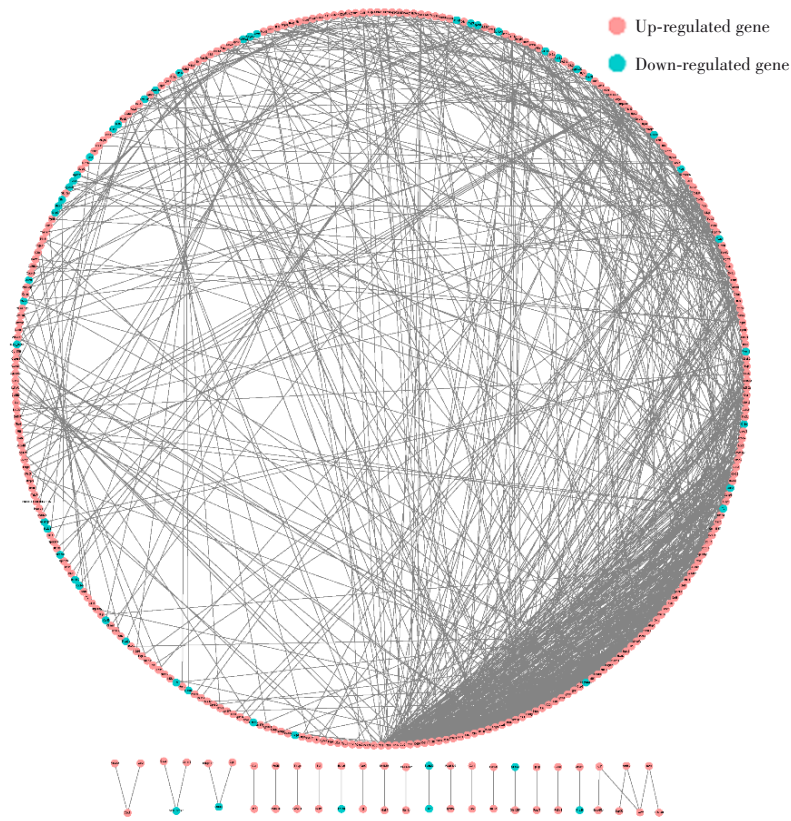
2.3 实时荧光定量 PCR 验证核心基因

MCAO 组与 CTRL 组各 3 个样本，经统计分析发现脑缺血后 *Hcar2* 基因的相对表达量为(6.01±0.54)与对照组(1.00±0.09)相比有所上升，差异有统计学意义($t=15.79, P=0.000\ 094$)。*Drd4* 在脑缺

表 2 芯片数据核心基因差异分析结果

Table 2 Results of analysis of microarray data for differential expression of hub genes

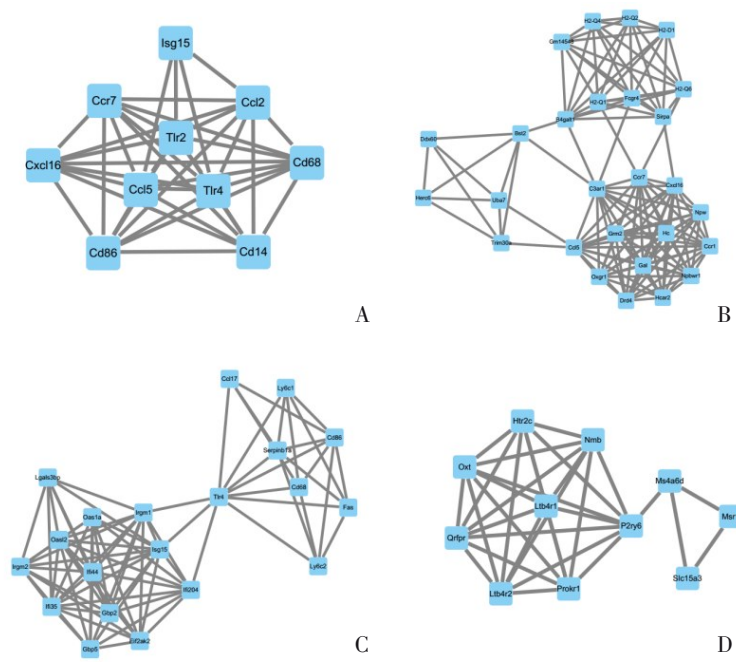
Gene Symbol	n	Log ₂ FoldChange	S	t	P Value	Regulation
<i>Drd4</i>	3	1.97	0.67	3.32	0.020 46	Up
<i>Hcar2</i>	3	2.66	0.42	7.63	0.000 57	Up



Pink circles represent up-regulated DEGs and green ones represent down-regulated DEGs

图2 差异表达基因的蛋白质互作网络

Fig. 2 PPIN of DEGs

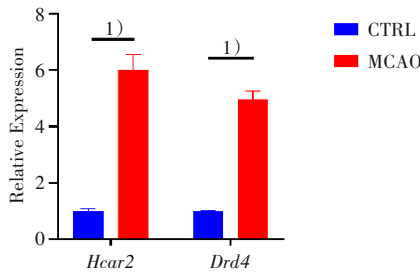


A: Sub-network consisted of top 10 genes in Degree Score calculated by CytosHubba. B-D: the first to third sub-networks rank in MCODE score respectively.

图3 核心子网络

Fig.3 Sub-networks of PPIN

血再灌注损伤组的相对表达量为(4.96±0.29)与对照组(1.00±0.02)相比,差异有统计学意义($t=23.74, P=0.000\ 019$;图4)。qRT-PCR结果与前述芯片差异分析结果一致。



Hcar2 and *Drd4* expression level were validated by qRT-PCR in samples from MCAO and CTRL. Gene expression was normalized to *ACTIN* expression and calculated by $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Hcar2*($t=15.79, P=0.000\ 094$) and *Drd4*($t=23.74, P=0.000\ 019$) were both upregulated. Red column represents MCAO group and blue column represents CTRL group. 1): compared with CTRL, $P<0.05, n=3/\text{group}$

图4 *Hcar2* and *Drd4* qRT-PCR验证结果

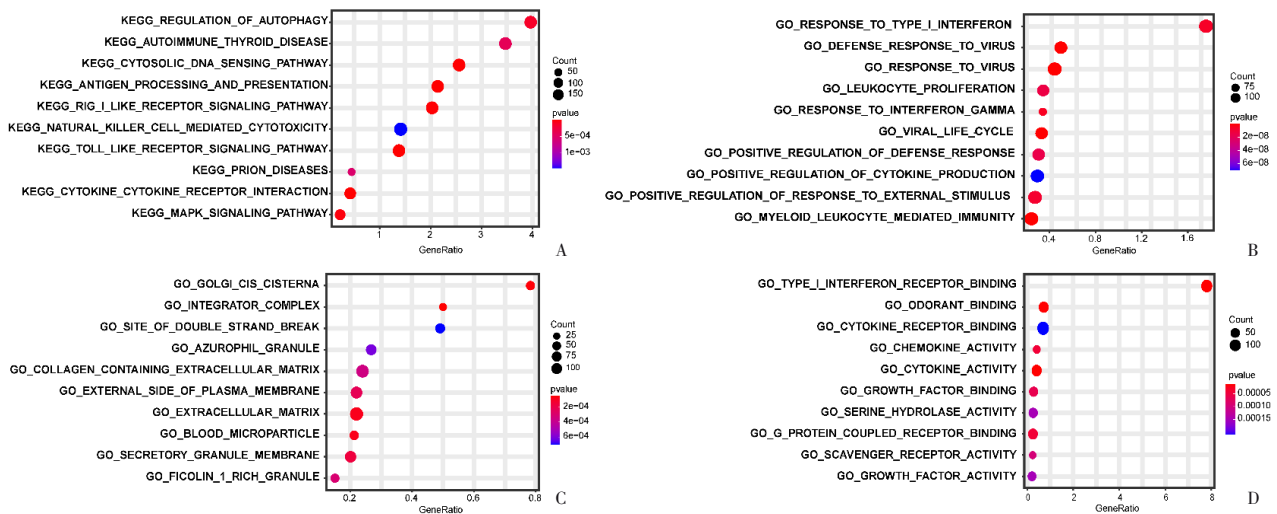
Fig. 4 *Hcar2* and *Drd4* expression level by qRT-PCR validation

2.4 GSEA功能富集分析结果

根据筛选条件,本次分析共富集到GO分析中的12个细胞组分(cellular component, CC)、16种分子功能(molecular function, MF)和158个生物过程(biological process, BP)以及11条KEGG通路。图5和图6分别显示了每一类富集结果中P值最小和

富集分数最高的10条富集通路。

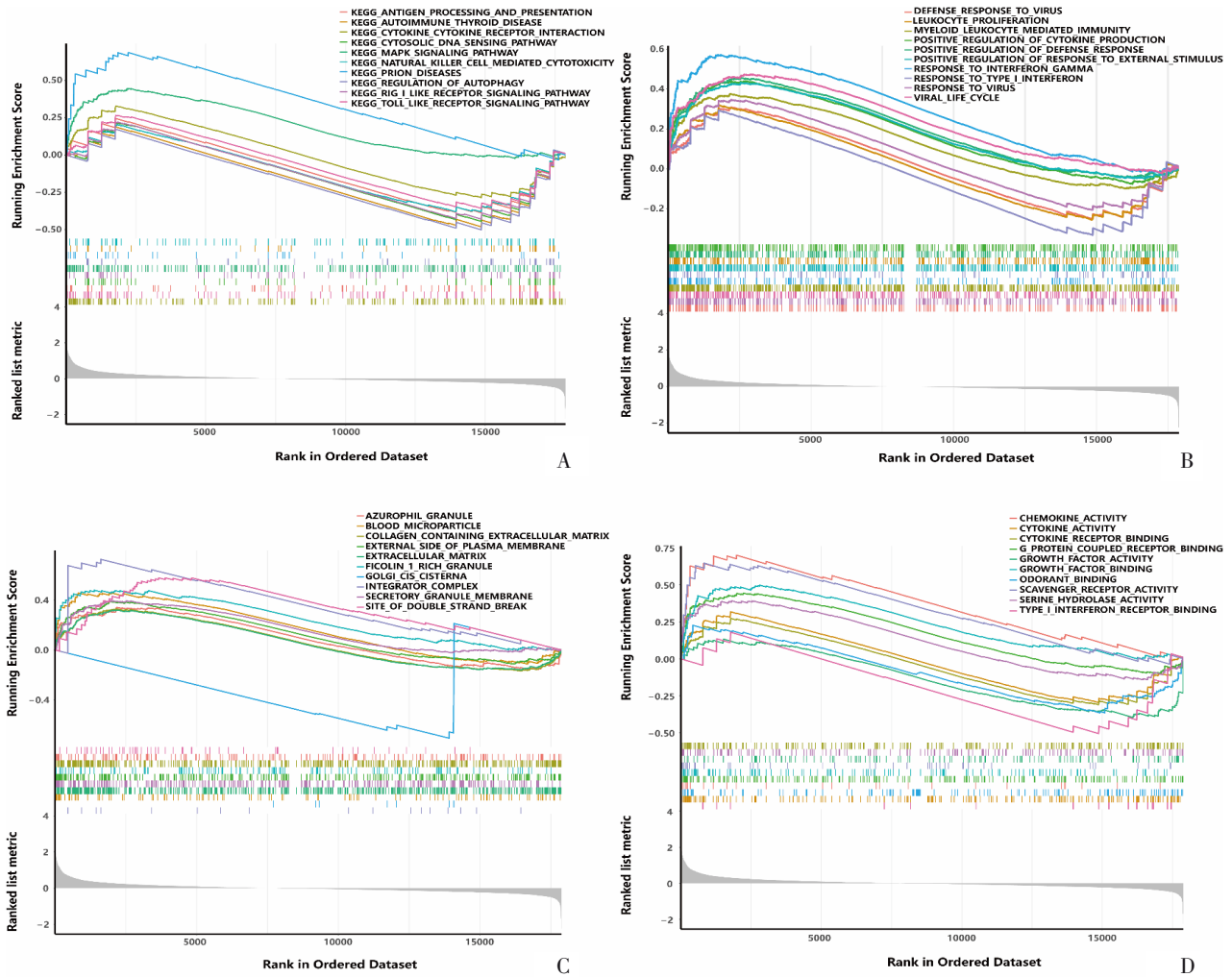
KEGG结果显示细胞因子-细胞因子受体的相互作用、Toll样受体信号通路、抗原加工呈递、胞质DNA传感通路、Rig I样受体信号、MAPK信号通路、自噬、自然杀伤细胞活性、NOD样受体信号通路与炎症反应密切相关的通路被富集,提示脑缺血再灌注损伤过程中炎症反应发挥了重要作用。GO富集分析得到了类似结果:对病毒的防御反应、病毒生命周期的变化、骨髓白细胞介导的免疫反应、对 γ 干扰素和I型干扰素的反应、对外部刺激反应的正向调节和白细胞的增殖以及细胞因子产生的正向调控相关基因在脑缺血后被显著富集,且全部处于激活状态,可能在脑缺血再灌注损伤中发挥重要作用;图5C、6C显示,整合子复合体、高尔基体顺面膜囊、血液微粒、细胞外基质、分泌颗粒膜、质膜的外侧面、富含M-纤维胶凝蛋白的颗粒体、构成细胞外基质的胶原蛋白、嗜天青颗粒和双链断裂部位可能是脑缺血再灌注损伤中重要的细胞组分。图5D、6D提示,脑缺血后脑组织在I型干扰素受体结合、细胞因子活性、气味结合、趋化因子的活性、G蛋白偶联受体结合、生长因子结合、清道夫受体的活性、生长因子的活性、丝氨酸水解酶活性、细胞因子受体结合等生物学功能方面发生了显著变化。在上述所有富集到的通路中,除高尔基体顺面膜囊的聚集为抑制外,其余通路均为上调或激活。



A: KEGG pathway enrichment results. B: GO biological process enrichment results. C: GO cell component enrichment results. D: GO molecular function enrichment results.

图5 KEGG、GO功能富集分析结果图

Fig. 5 Functional enrichment analysis results by GSEA algorithm



A: KEGG pathway enrichment results. B: GO biological process enrichment results. C: GO cell component enrichment results. D: GO molecular function enrichment results.

图6 GSEA 功能富集结果

Fig. 6 Functional enrichment analysis results by GSEA algorithm

2.5 CMap 药物预测结果

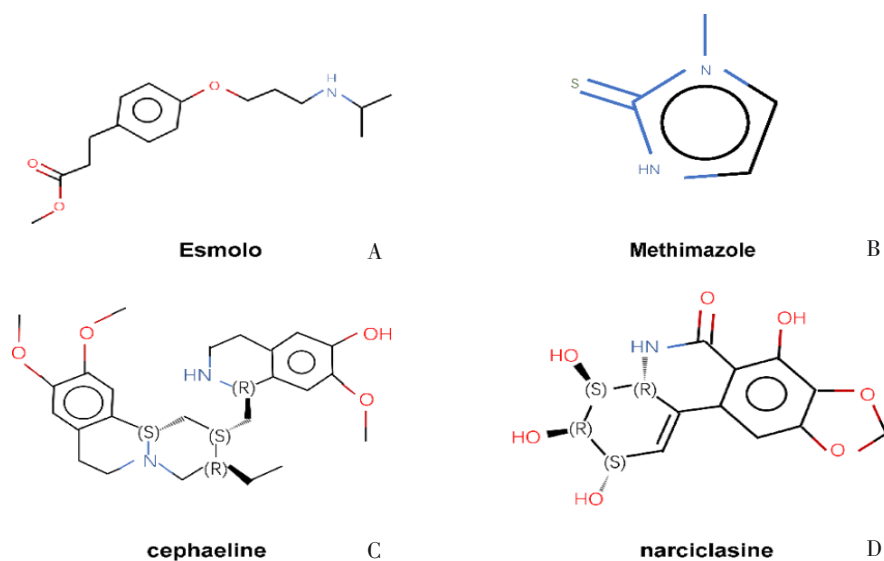
从CMap下载预测药物结果,基于对药物的连通性评分进行排序和筛选。连通性评分<-80的药物共有4个:艾司洛尔 Esmolol、甲巯咪唑 Methima-

zole、吐根酚碱 Cephaeline、水仙环素 Narciclasine。此4种小分子化合物有可能成为缺血性卒中的潜在治疗药物(表3)。图7为4种小分子化合物的化学结构示意图。

表3 CMap 预测结果
Table 3 Prediction Results from CMap

Score	Name	Description
-89.71	esmolol	Adrenergic receptor antagonist
-85.73	methimazole	Antithyroid
-84.38	cephaeline	Protein synthesis inhibitor
-81.92	narciclasine	Cofilin signaling pathway, LIM kinase activator and Rho associated kinase activator

CMap: Connectivity Map



A: Esmolol. B: Methimazole. C: cephaeline. D: narciclasine.

图7 4种预测药物的简化结构式

Fig. 7 Structure of 4 potential drugs

3 讨论

本研究基于生物信息学途径筛选了脑缺血关键基因并预测了潜在药物。对结果进行分析发现构成核心子网络的基因大多与炎症反应相关,他们包括 Toll 样受体(toll like receptor, TLR)家族(*Tlr2*、*Tlr4*)的成员、趋化因子 CC-chemokine ligand (CCL) 及相应受体 CC-chemokine receptor (CCR) 家族(*Ccl5*、*Ccl2*、*Cxcl16*、*Ccr7*), 白细胞分化抗原 *Cd86*、*Cd14* 和 *Cd68* 等。其中 *Tlr2* 和 *Tlr4* 均已被证实在大鼠脑缺血再灌注损伤后表达水平显著升高^[8], 同时甘草酸处理 MCAO 大鼠可下调缺血脑内 TLR2、高迁移率族蛋白 B1 (high mobility group box 1, HMGB1) 及基质金属蛋白酶 9 (matrix metalloproteinase-9, MMP-9) 从而发挥神经保护作用^[9]。脑缺血后 TLR4/NF- κ B 信号通路激活可能引起血小板聚集和星形胶质细胞激活从而加重神经损伤^[10]。小鼠脑缺血 72 小时后调节 T 细胞表面 CCR5 表达增多, 有利于减轻血脑屏障的损伤^[11]。Georgakis 等^[12] 基于全基因组关联分析发现较高水平 CCL2 有更高的缺血性卒中遗传倾向。这些结果均提示: 炎症反应的调控对于脑缺血再灌注损伤的治疗有着巨大的意义。*CD68*、*CD86*、*CD14*、*TLR2* 和 *TLR4* 都与巨噬细胞的功能密切相关。脑卒中患者血液中 *CD14*^{high} *CD16*⁺ 单核细胞的数量上升, 这类单核细胞显著高表达 TLR2 蛋白, 同时 *CD14*^{high} *CD16*⁺ 单核

细胞的高水平与高死亡率和脑卒中早期临床恶化相关^[13]。结合本文分析结果, 我们推测单核-巨噬细胞以及炎症反应的调控可能在脑缺血损伤中扮演了重要角色, 可能是一个强有力的潜在治疗靶点。此外, ISG15^{-/-} 的 MCAO 小鼠死亡率高, 梗死加剧, 神经系统恢复恶化, 提示 ISG15 可能作为内源性神经保护适应因子能减轻脑卒中损伤^[14]。

有文献报道本文筛选出的核心基因 *Hcar2* 在小鼠脑缺血 24 h 后显著升高, 48 h 开始下降^[15]。但其在脑缺血损伤中的作用以及机制仍不明确, 另一核心基因 *Drd4* 编码多巴胺受体 D4 (dopamine receptor 4, D4R), 能被多巴胺、肾上腺素和去甲肾上腺素激活参与情绪控制、视网膜节细胞的昼夜节律的调节^[16]。其在脑缺血的病理生理过程中的作用亦有待进一步探索。艾司洛尔是一种选择性 β_1 肾上腺素能受体拮抗剂, 对脑缺血有一定保护作用: 缺血前给予艾司洛尔能有效减轻双侧颈动脉闭塞引起的神经功能障碍^[17]。在沙鼠脑缺血模型中, 甲巯咪唑可诱导甲状腺功能减退以降低脂质过氧化、增加超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD1), 使海马 CA1 区神经元的死亡得到缓解^[18]。艾司洛尔和甲巯咪唑的脑保护作用目前已相对明确, 但具体作用机制尚未阐明。吐根酚碱和水仙环素是否对脑缺血损伤有保护作用则未见报道。

本文进行通路富集选用的 GSEA 算法不需要事先筛选出差异基因, 直接将全部基因与基因集进

行比较,能保留表达变化不大但功能重要的基因,分析结果更可靠。本研究虽然通过实时荧光定量pcr对 *Hcar2* 及 *Drd4* 的表达水平进行了验证,但未

检测筛选出的药物的作用,仍须后续实验进行验证。*Hcar2* 及 *Drd4* 以及4种潜在药物目前均未在脑缺血中得到充分的研究,可能是尚未发掘的新靶点。

参考文献

- [1] Campbell BCV, Silva DAD, Macleod MR, et al. Ischaemic stroke[J]. Nat Rev Dis Primers, 2019, 5(1): 1-22.
- [2] Simats A, Ramiro L, Berrocoso TG, et al. A mouse brain-based multi-omics integrative approach reveals potential blood biomarkers for ischemic stroke[J]. Mol Cell Proteomics, 2020, 19(12): 1921-1935.
- [3] Gu L, Wu YL, Hu SY, et al. Analysis of association between *MAP2K4* gene polymorphism rs3826392 and IL-1b serum level in Southern Chinese Han ischemic stroke patients[J]. J Stroke Cerebrovasc Dis, 2016, 25(5): 1096-1101.
- [4] Chin CH, Chen SH, Wu HH, et al. cytoHubba: identifying hub objects and sub-networks from complex interactome[J]. BMC Syst Biol, 2014, Suppl 4(Suppl 4): S11.
- [5] Bader GD, Hogue CWV. An automated method for finding molecular complexes in large protein interaction networks[J]. BMC Bioinformatics, 2003, 4: 2.
- [6] Yu GC, Wang LG, Han YY, et al. clusterProfiler: an R package for comparing biological themes among gene clusters[J]. OMICS, 2012, 6(5): 284-7.
- [7] Subramanian A, Narayan R, Corsello SM, et al. A next generation connectivity map: L1000 platform and the first 1,000,000 profiles[J]. Cell, 2017, 171(6): 1437-1452.
- [8] Chen HS, Guan BH, Wang B, et al. Glycyrrhizin prevents hemorrhagic transformation and improves neurological outcome in ischemic stroke with delayed thrombolysis through targeting peroxynitrite-mediated HMGB1 signaling[J]. Transl Stroke Res, 2020, 11(5): 967-982.
- [9] Li X, Huang LL, Liu G, et al. Ginkgo diterpene lactones inhibit cerebral ischemia/reperfusion induced inflammatory response in astrocytes via TLR4/NF- κ B pathway in rats[J]. J Ethnopharmacol, 2020, 249: 112365.
- [10] Tajalli-Nezhad S, Karimian M, Beyer C, et al. The regulatory role of Toll-like receptors after ischemic stroke: neurosteroids as TLR modulators with the focus on TLR2/4[J]. Cell Mol Life Sci, 2019, 76(3): 523-537.
- [11] Li PY, Wang L, Zhou YX, et al. C-C chemokine receptor type 5 (CCR5)-mediated docking of transferred tregs protects against early blood-brain barrier disruption after stroke[J]. J Am Heart Assoc, 2017, 6(8): e006387.
- [12] Georgakis MK, Gill D, Rannikmäe K, et al. Genetically determined levels of circulating cytokines and risk of Stroke [J]. Circulation, 2019, 139(2): 256-268.
- [13] Urrea X, Villamor N, Amaro S, et al. Monocyte subtypes predict clinical course and prognosis in human stroke [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2009, 29(5): 994-1002.
- [14] Nakka VP, Lang BT, Lenschow DJ, et al. Increased cerebral protein ISGylation after focal ischemia is neuroprotective [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2011, 31(12): 2375-2384.
- [15] Clausen BH, Lundberg L, Yli-Karjanmaa M, et al. Fumarate decreases edema volume and improves functional outcome after experimental stroke[J]. Exp Neurol, 2017, 295: 144-154.
- [16] Hwang CK, Chaurasia SS, Jackson CR, et al. Circadian rhythm of contrast sensitivity is regulated by a dopamine-neuronal PAS-domain protein 2-adenylyl cyclase 1 signaling pathway in retinal ganglion cells [J]. J Neurosci, 2013, 33(38): 14989-14997.
- [17] Goyagi T, Nishikawa T, Tobe Y. Neuroprotective effects and suppression of ischemia-induced glutamate elevation by β 1-adrenoreceptor antagonists administered before transient focal ischemia in rats [J]. J Neurosurg Anesthesiol, 2011, 23(2): 131-137.
- [18] Lee CH, Yoo KY, Hwang IK, et al. Hypothyroid state does not protect but delays neuronal death in the hippocampal CA1 region following transient cerebral ischemia: focus on oxidative stress and gliosis [J]. J Neurosci Res, 2010, 88(12): 2661-2668.

(编辑 孙慧兰)