

文章编号:1003-2754(2023)07-0628-08

doi:10.19845/j.cnki.zfysjbjzz.2023.0145



论著与经验总结

缺血性脑卒中缺氧相关生物标志物的筛选

胡彦兵, 达吾提江·依拉木, 郭雄, 潘红波, 何康民

摘要: **目的** 研究缺氧相关基因与缺血性脑卒中之间的关系,筛选缺氧相关的分子标志物。**方法** 首先,下载 GSE16561 和 GSE58294 数据集,以及缺氧相关基因集,筛选缺氧相关的差异表达基因,并进行功能注释。随后对这些差异表达的缺氧相关基因进行最小绝对收缩和选择算子(LASSO)回归和支持向量机算法分析,筛选缺氧相关的生物标志物,并对缺血性脑卒中组和对照组的差异免疫细胞进行分析。最后对转录因子和 miRNA 进行了预测。**结果** 本研究共筛选得到 13 个缺氧相关的差异表达基因,这 13 个基因主要富集到了葡萄糖跨膜转运、单糖跨膜转运以及线粒体自噬调节等过程。基于 LASSO 回归和支持向量机算法,最终确定了 8 个缺氧相关的生物标志物,这些标志物与大部分免疫细胞之间均存在显著相关性。此外,预测到 8 个基因对应的 209 个转录因子的关系网络,以及 6 个基因对应的 25 个 miRNA。**结论** 本文最终筛选了 8 个缺氧相关的生物标志物,它们可能作为抑制卒中后的脑损伤的治疗靶点。此外,糖代谢和免疫机制在缺血性脑卒中的发生和发展中发挥重要作用。

关键词: 缺血性脑卒中; 缺氧; 免疫; 基因

中图分类号:R743.3 **文献标识码:**A

Screening for hypoxia-related biomarkers in ischemic stroke HU Yanbing, DAWUTJAN Ilam, GUO Xiong, et al. (Department of Neurosurgery, Kashi Prefecture Second People's Hospital, Kashi 844000, China)

Abstract: **Objective** To investigate the relationship between hypoxia-related genes and ischemic stroke, and to screen for molecular markers related to hypoxia. **Methods** First, GSE16561 and GSE58294 datasets and hypoxia-related gene sets were downloaded to screen for hypoxia-related differentially expressed genes. After functional annotation, these hypoxia-related differentially expressed genes were analyzed by the least absolute shrinkage and selection operator least absolute shrinkage and selection operator(LASSO) regression and support vector machine algorithm to screen for immune-related biomarkers, and differential immune cells were analyzed between the ischemic stroke group and the control group. Finally, transcription factors and miRNAs were predicted. **Results** A total of 13 hypoxia-related differentially expressed genes were screened, which were enriched mainly in the processes of glucose transmembrane transport, monosaccharide transmembrane transport, and mitophagy regulation. Based on the LASSO regression and support vector machine algorithm analyses, eight hypoxia-related biomarkers were identified, which were significantly correlated with most immune cells. Furthermore, the network of 209 transcription factors corresponding to 8 genes and 25 miRNAs corresponding to 6 genes were predicted. **Conclusion** Eight hypoxia-related biomarkers are identified, which may be used as potential therapeutic targets for inhibiting brain injury after stroke. In addition, glucose metabolism and immune mechanisms may play an important role in the occurrence and progression of ischemic stroke.

Key words: Ischemic stroke; Hypoxia; Immune; Gene

脑卒中是目前世界范围内造成残疾和死亡的最重要的原因之一,每年约有 650 万人死于脑卒中^[1]。目前,脑卒中主要有两种亚型:出血性脑卒中和缺血性脑卒中。其中,缺血性脑卒中约占所有病例的 80%,主要是由于大血管闭塞,动脉到动脉栓塞或心源性栓塞^[2]。缺血性脑卒中的特点是大脑某一区域的血液循环突然丧失,导致不可逆的脑损伤,并在缺血几分钟后出现神经功能缺损^[3]。因此,对急性缺血性脑卒中的快速准确诊断对于治疗和预后至关重要^[4]。

缺氧是一系列神经系统疾病(包括脑卒中,脊髓损伤和外伤性脑损伤)的中心因素。人类 20% 的氧气是由大脑消耗的,氧气是维持脑组织持续运转的重要物质^[5,6],因此,在大脑中,氧生理过程更加重要。缺氧是脑卒中后的常见症状,与不良的临床

预后密切相关^[7]。研究缺氧相关基因与缺血性脑卒中之间的关系,筛选缺氧相关的分子标志物,可能为研究该疾病的发病机制提供新的思路。本研究主要基于缺氧相关基因,分析其在缺血性脑卒中患者和健康人之间的差异,并通过生物信息学方法筛选缺氧相关的生物标志物并分析其调控机制。

1 资料与方法

1.1 数据来源 从 NCBI GEO (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 数据库中下载 GSE16561 和

收稿日期:2022-11-20;修订日期:2023-04-11

基金项目:2022 年新疆自然科学基金面上项目(2022D01C18)

作者单位:(喀什地区第二人民医院神经外科,新疆维吾尔自治区喀什 844000)

通信作者:何康民, E-mail: kashgarhekangmin@126.com

GSE58294 数据集。其中, GSE16561 包含 64 个全血样本, 分别来自 39 例缺血性脑卒中患者和 24 位健康人; GSE58294 包含 92 个血液样本, 分别来自 69 例缺血性脑卒中和 23 位健康人。下载对应的平台探针注释信息, 将探针一一转化为基因符号, 如果不同的探针映射到同一基因, 取平均值作为该基因的表达值, 最终得到的基因表达矩阵用于后续分析。

1.2 差异表达基因的筛选 采用 R4.1.1 中的 limma 包 v3.34.7^[8] (<https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/limma.html>) 对 GSE16561 数据集中缺血性脑卒中和对照组的样本进行差异表达基因 (differentially expressed genes, DEGs) 的筛选, 选取 P 值小于 0.05 且 $|\log_2$ 差异倍数 (fold change, FC) | > 0.585 作为筛选 DEGs 的阈值, 并前 100 个 DEGs (上调和下调各 50 个) 的表达情况进行热图展示。

1.3 缺氧相关 DEGs 的鉴定 从 msigdb 数据库 (<http://www.gsea-msigdb.org/gsea/index.jsp>)^[9] 下载缺氧相关基因集, 并通过韦恩分析筛选缺氧相关基因与 DEGs 的交集基因, 即得到缺氧相关 DEGs。

1.4 功能富集分析 对于上一步得到的缺氧相关 DEGs, 利用 R 包 clusterProfiler^[10] (<http://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/clusterProfiler.html>, v4.0.5) 进行基因本体论 (Gene Ontology, GO) 功能富集分析, 探索关键基因参与的功能条目。GO 是一个国际化的基因功能分类体系, 它提供了一整套动态更新的标准词汇表用以全面描述生物体中基因和基因产物的属性。GO 总共有 3 个本体, 分别描述了基因的分子功能 (molecular function)、细胞成分 (cellular component) 和生物过程 (biological process)。

1.5 最佳缺氧相关生物标志物的鉴定 为了鉴定缺氧相关的生物标志物, 分别用最小绝对收缩和选择算子 (least absolute shrinkage and selection operator, LASSO) 回归^[11] 和支持向量机 (support vector machines, SVM)^[12,13] 算法进行特征选择, 将这两种算法得到的基因标志物进行交集分析, 最终确定的基因定义为最佳的缺氧相关生物标志物。LASSO 是以缩小变量集 (降阶) 为思想的压缩估计方法。它通过构造一个惩罚函数, 可以将变量的系数进行压缩并使某些回归系数变为 0, 进而达到变量选择的目的。SVM 是一种二分类模型, 适合中小型数据样本、非线性、高维的分类问题。

1.6 缺血性脑卒中组和对照组差异免疫细胞分析 单样本基因集富集分析 (single-sample gene

set enrichment analysis, ssGSEA) 是基于免疫相关的基因集^[14] 做分析, 就可以很准确地得到每个样本的免疫活性。其中, 免疫相关的基因集指的是免疫细胞、免疫相关通路以及免疫相关功能相关的基因集。本研究中, 我们使用 R gsva 包 (<http://master.bioconductor.org/packages/release/bioc/html/GSVA.html>, v1.42.0)^[15] 对每个样本进行了 ssGSEA 推算, 然后对不同分组下的样本进行差异免疫细胞分析, 并使用 Pearson 对上述筛选的生物标志物基因和差异免疫细胞进行相关性分析, 绘制相关性热图。

1.7 缺氧相关基因对缺血性脑卒中的诊断价值分析 采用受试者工作特征 (receiver operating characteristic, ROC) 曲线评估各基因对缺血性脑卒中的诊断价值, 曲线下面积 (AUC) 值越高, 诊断价值越高。

1.8 缺氧相关基因的表达水平验证 利用 GSE58294 数据集对筛选得到的标记物的表达水平进行验证。

1.9 关键基因上游调控机制挖掘 基因的表达受转录因子的调控, 因此我们利用转录因子数据库^[16] (<http://bioinfo.life.hust.edu.cn/hTFtarget>) 分析调控候选关键基因的转录因子。同时利用 miR-Walk 数据库^[17] 预测调控候选关键因子的 microRNA (miRNA), 我们选取 miRWalk 中提供的关联数据库 TargetScan 和 miRDB 共同预测的结果, 保留同时出现在两个数据库中的靶向调控对, 并通过 Cytoscape v3.9.2^[18] 对结果进行展示。

本研究的分析流程图见图 1。

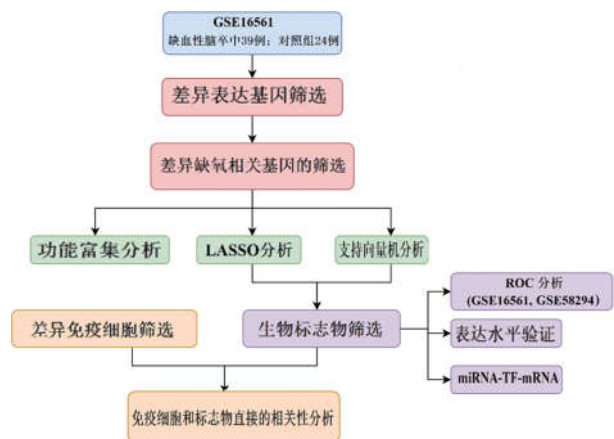


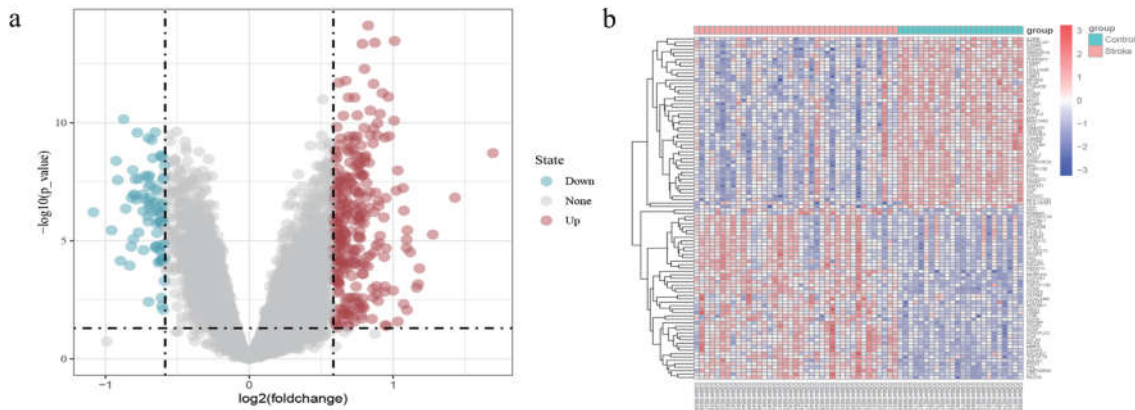
图1 分析流程图

2 结果

2.1 DEGs 的筛选结果 按照方法所述, 对疾病组和对照组样本进行 DEGs 分析。基于阈值 P 值

<0.05 且 $|\log_2^{FC}| > 0.585$, 共得到 349 个显著的 DEGs, 其中上调基因 268 个, 下调基因 81 个。对

DEGs 进行火山图展示 (见图 2a), 前 50 个上调和下调基因的表达情况热图 (见图 2b)。

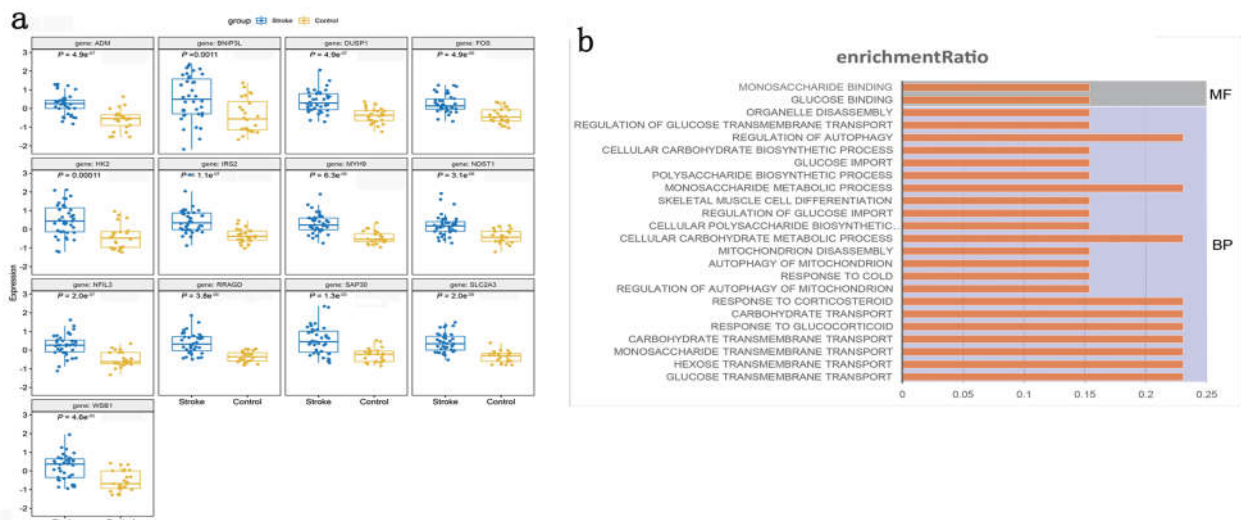


a: DEGs 火山图。横坐标表示差异倍数, 纵坐标表示 $-\log_{10}(P$ 值)。图中每个点代表一个基因, 红色和蓝色的点代表显著差异表达基因。且红色的点表示其基因表达量是上调的, 蓝色的点表示其基因表达量是下调的, 灰色的点表示这些基因没有显著差异。b: 前 100 个 DEGs 的表达热图。

图 2 差异表达基因 (DEGs) 的筛选结果

2.2 缺氧相关 DEGs 的鉴定 从 msigdb 数据库下载缺氧相关的基因集, 将 200 个缺氧相关基因与 DEGs 取交集, 得到 13 个缺氧相关的 DEGs (*ADM*、*FOS*、*HK2*、*IRS2*、*MYH9*、*DUSP1*、*WSB1*、*RRAGD*、*NDST1*、*NFIL3*、*BNIP3L*、*SAP30* 和 *SLC2A3*)。随后, 我们对 13 个基因在缺血性脑卒中和对照组中的差异情况进行分析 (见图 3a), 这 13 个基因在缺血性脑卒中组均显著上调。

2.3 功能富集分析 对上一步中得到的 13 个基因进行 GO 功能富集分析, 探索关键基因参与的功能。富集结果 (见图 3b), 这些基因主要富集到葡萄糖跨膜转运 (glucose transmembrane transport)、单糖跨膜转运 (monosaccharide transmembrane transport) 以及线粒体自噬调节 (regulation of autophagy of mitochondrion) 等功能。



a: 13 个基因在脑卒中组和对照组的差异情况箱线图; b: 差异缺氧相关基因 GO 富集结果。

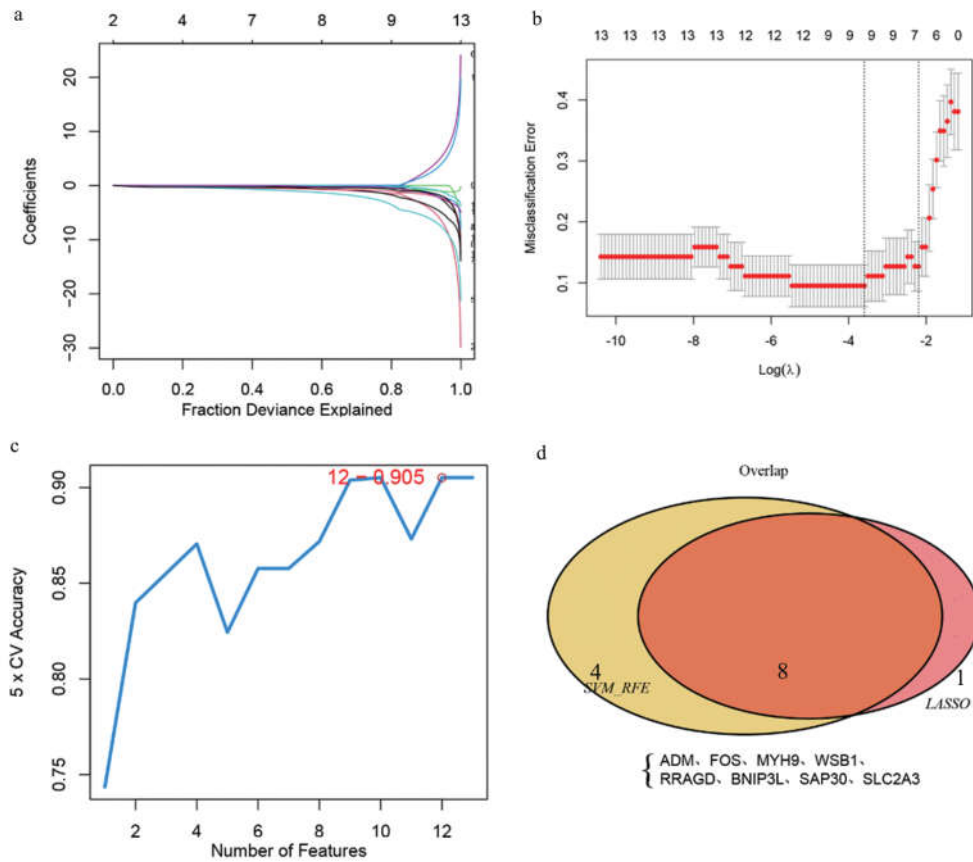
图 3 差异缺氧相关基因的表达情况及功能富集分析结果

2.4 最佳缺氧相关生物标志物的鉴定 我们使用 R glmnet 包对 13 个基因进行 LASSO 回归分析,

得到基因系数图和交叉验证的误差图 (见图 4a、图 4b), 筛出 9 个特征基因: *ADM*、*FOS*、*MYH9*、*WSB1*、

RRAGD、*NDST1*、*BNIP3L*、*SAP30* 和 *SLC2A3*。此外,基于 SVM 算法进行生物标志物的筛选,共得到 12 个基因:*MYH9*、*WSB1*、*IRS2*、*FOS*、*SLC2A3*、*NFIL3*、*RRAGD*、*HK2*、*DUSP1*、*SAP30*、*ADM* 和 *BNIP3L*(见图

4c)。最后,将两部分筛选的结果取交集,最终获得 8 个交集基因:*ADM*、*FOS*、*MYH9*、*WSB1*、*RRAGD*、*BNIP3L*、*SAP30* 和 *SLC2A3*(见图 4d),并将其定义为最佳的缺氧相关生物标志物。

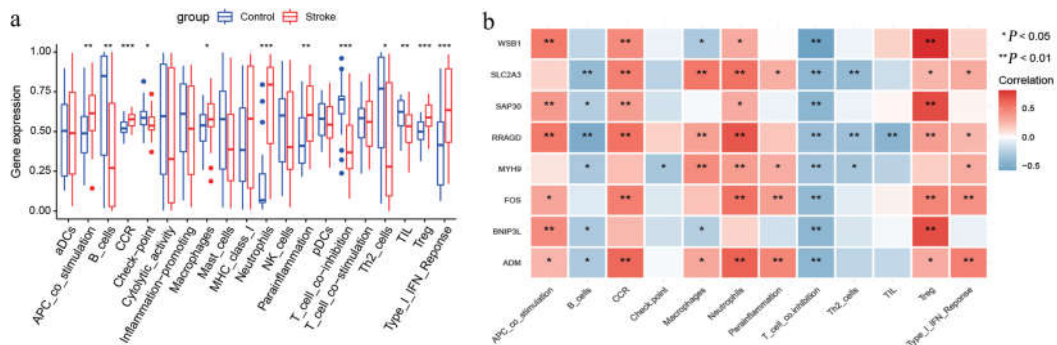


a 和 b:LASSO 回归分析结果。a:横坐标 deviance 表示模型解释的差异比例,显示了特征基因数量随解释的差异比例之间的变化关系,纵坐标是基因的系数;b:横坐标是 $\log(\lambda)$,纵坐标代表交叉验证的误差;c:支持向量机分析筛选特征基因;d:LASSO 和支持向量机确定最佳缺氧相关生物标志物。

图4 最小绝对收缩和选择算子(LASSO)回归和支持向量机算法分析缺氧相关的生物标志物

2.5 差异免疫细胞分析 我们使用 R *gsva* 包对每个样本进行 ssGSEA 推算,得到 12 个差异显著的免疫细胞。此外,使用 Pearson 方法分析不同组的

差异免疫细胞及其与上一步中获得的 8 个缺氧相关生物标志物的相关性,结果见图 5。这 8 个缺氧相关标志物与大部分免疫细胞之间均存在显著相关性。

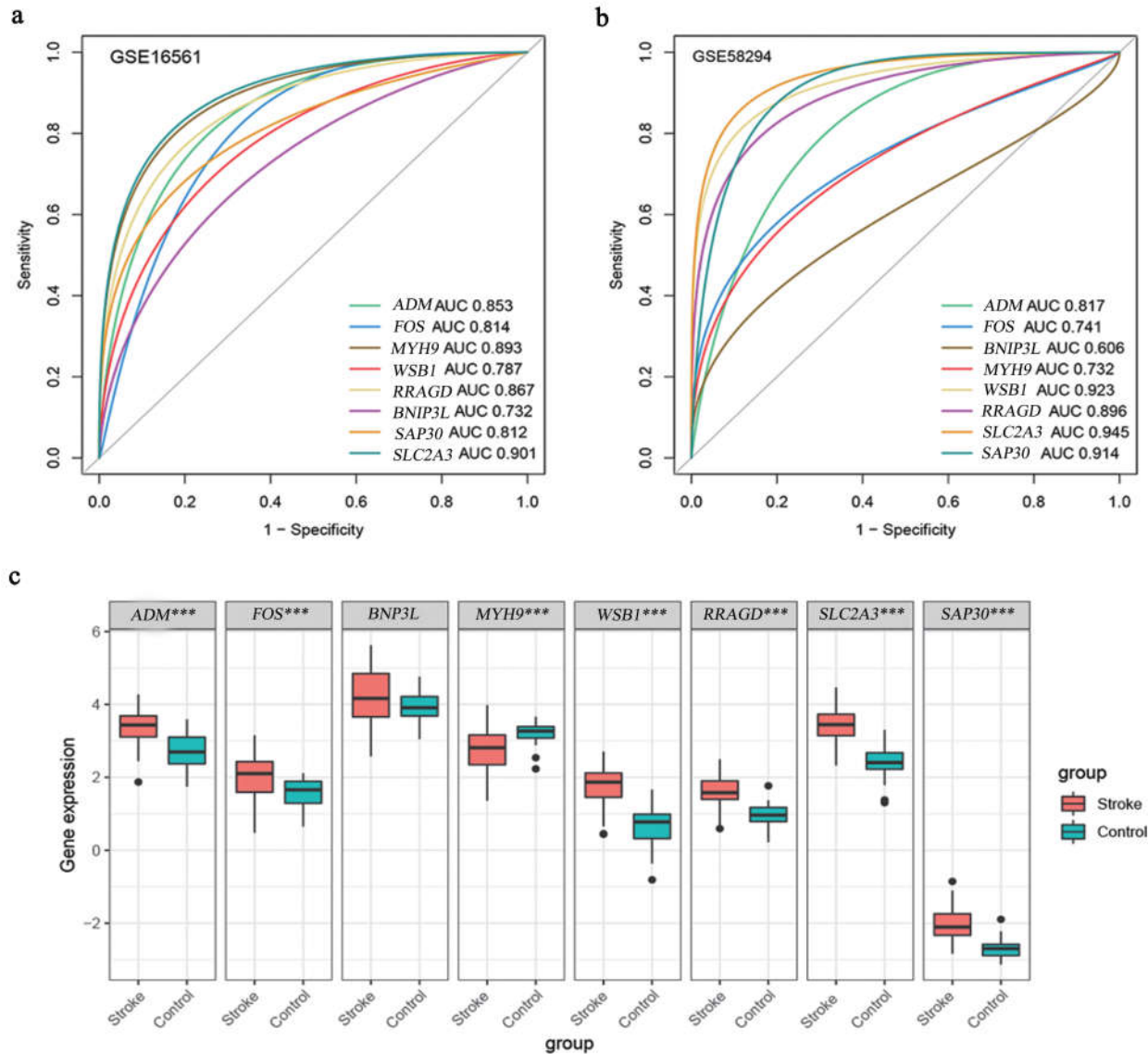


a:差异免疫细胞分析,其中 * 表示 $P < 0.05$, ** 表示 $P < 0.01$, *** 表示 $P < 0.001$;b:8 个标志物和差异免疫细胞的相关性分析。

图5 缺血性脑卒中组和对照组差异免疫细胞分析及差异免疫细胞与标志物的相关性分析结果

2.6 ROC分析及验证 对8个标志物基因分别绘制ROC曲线,在GSE16561数据集中,除WSB1和BNIP3L外,其余6个基因的AUC均大于0.8(见图6a),说明这6个基因在诊断缺血性脑卒中时比

WSB1和BNIP3L具有更高、更好的准确性。此外,我们通过GSE58294数据集对ROC结果进行了验证,发现了一致的结果(见图6b)。



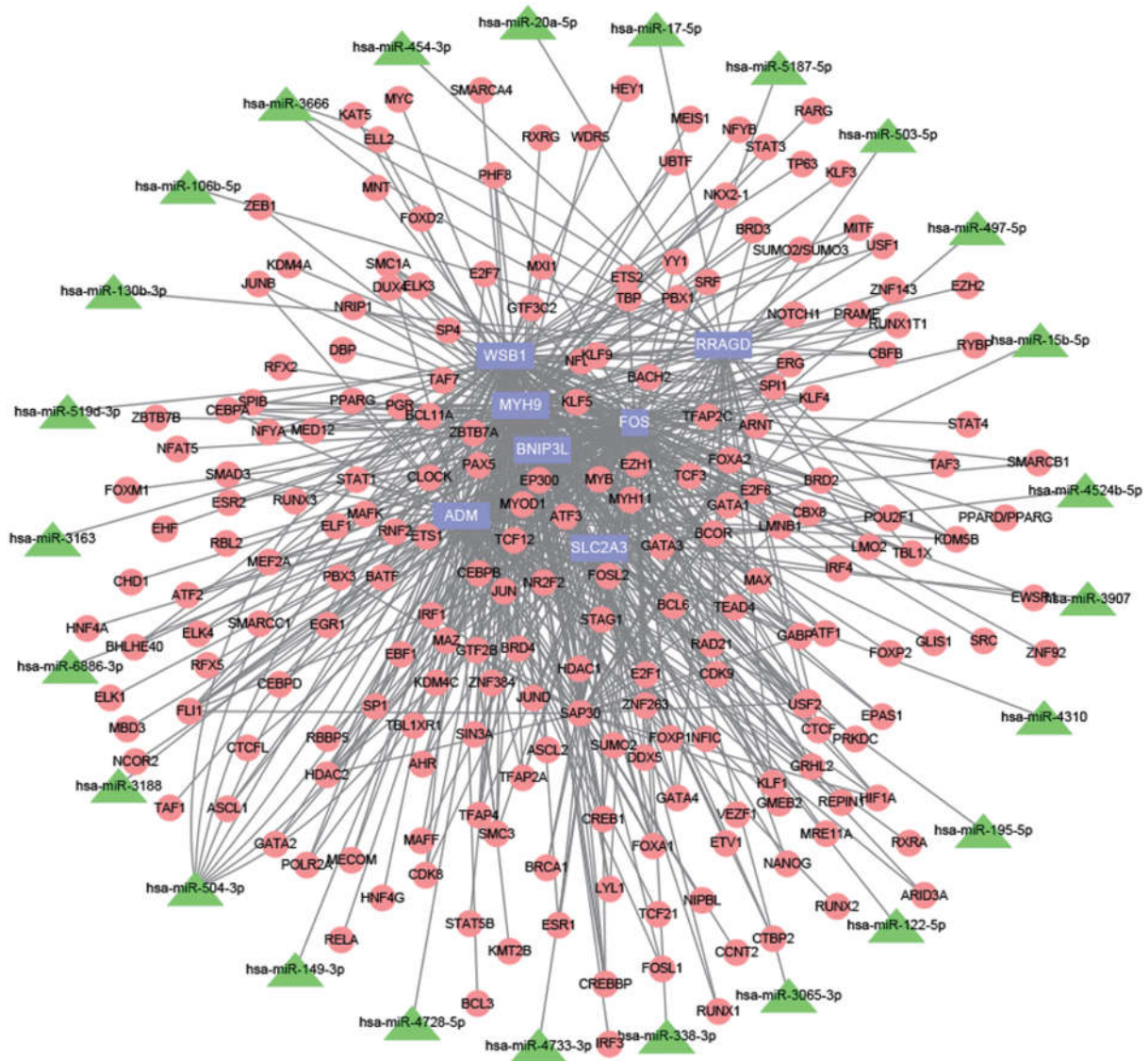
a和b:受试者工作特征(ROC)分析及验证;c:8个基因的表达验证,其中*表示 $P < 0.05$,**表示 $P < 0.01$,***表示 $P < 0.001$ 。

图6 缺氧相关标志物的诊断价值和表达验证结果

2.7 缺氧基因的验证 利用GSE58294数据集对筛选得到的标记物的表达量进行验证,结果见图6c。除BNIP3L外,其余7个基因的表达水平在疾病组和对照组之间均存在显著差异。其中,MYH9在疾病组中显著下调,而其他6个基因在疾病组中均显著上调。

2.8 关键基因上游调控机制挖掘 结合转录

因子数据库(hTFtarget)分析调控8个候选关键基因的转录因子,最终得到8个基因对应的209个转录因子的关系网络,例如NOTCH1-FOS。同时,通过miRWalk数据库预测,得到6个基因对应的25个miRNA,例如miR-122-5p-SLC2A3。基于获得的转录因子-靶基因以及miRNA-靶基因调控关系对,绘制了miRNA-转录因子-mRNA调控网络(见图7)。



红色○节点表示转录因子,紫色□表示 mRNA,△表示 miRNA。

图7 miRNA-转录因子-mRNA 网络图

3 讨论

本研究共筛选得到 349 个 DEGs,与缺氧相关基因取交集后共获得 13 个缺氧相关的 DEGs,这 13 个基因主要富集到了葡萄糖跨膜转运、单糖跨膜转运以及线粒体自噬调节等过程。随后,基于 LASSO 和 SVM 算法,最终确定了 8 个缺氧相关的生物标志物: *ADM*、*FOS*、*MYH9*、*WSB1*、*RRAGD*、*BNIP3L*、*SAP30* 和 *SLC2A3*。这 8 个缺氧相关标志物与大部分免疫细胞之间均存在显著相关性。此外,这 8 个基因中除了 *WSB1* 和 *BNIP3L* 外,其余 6 个基因对缺血性脑卒中具有较高的诊断价值。最终,基于预测的转录因子和 miRNA,绘制了 miRNA-转录因子-mRNA 调控网络。

哺乳动物细胞中主要通过线粒体中的氧化磷酸化和胞质中的糖酵解两种代谢途径产生 ATP,缺氧

可诱导许多细胞线粒体功能障碍^[19,20]。缺血性脑卒中发生后,受累的脑组织供血急剧减少,葡萄糖和氧的不足直接影响缺血区域的氧化代谢。此外,由于缺血后组织中的能量需求降低以及线粒体对丙酮酸氧化的限制,葡萄糖氧化显著降低,而且会继发线粒体的功能障碍,进而引发细胞凋亡^[21]。如果这种脑缺血的状态在短时间内没有消除,将会发生严重的缺血性梗死,而神经元会由于葡萄糖和氧气的供应中断而发生不可逆转的损伤^[22]。本研究结果发现 13 个缺氧相关的 DEGs 主要富集到了葡萄糖跨膜转运、单糖跨膜转运以及线粒体自噬调节等过程,进一步证实了糖代谢在缺血性脑卒中中的关键作用。因此,改善糖代谢对改善脑缺血损伤具有重要意义^[23]。

已有研究证实先天性免疫细胞和适应性免疫细胞都参与了卒中后的炎性损伤机制^[24]。免疫细胞浸润既可以介导神经元凋亡,加重缺血损伤,同时又能促进神经元的修复、分化和再生^[25]。研究发现,T淋巴细胞在缺血半球的浸润从卒中后的第1天开始明显,在卒中后第3天达到高峰^[24]。这些T淋巴细胞也在促进血栓炎症中发挥关键作用^[26]。巨噬细胞是先天免疫系统的重要参与者,是缺血组织的第一反应者^[24],其在主要心血管事件(如脑卒中)中同时发挥保护性和破坏性的双重作用^[27]。本文中,我们也分析了缺血性脑卒中与免疫细胞之间的关系,获得了12个差异显著的免疫细胞,其中包括T淋巴细胞和巨噬细胞。因此,对缺血性脑卒中免疫机制的了解可能有助于产生新的治疗靶点来抑制卒中后的脑损伤。

FOS 是一种原癌基因,具有亮氨酸拉链区,可与 c-Jun 二聚,形成序列特异性激活蛋白(AP-1) DNA 结合复合物^[28]。先前的研究已经发现,实验性的局灶性或全脑缺血和局灶性脑损伤后,神经元中的 *FOS* 水平显著升高^[29,30]。本研究中也发现,*FOS* 在缺血性脑卒中组的表达显著上调。此外,*FOS* 预测到127个转录因子,例如 NOTCH1。Notch 信号通路是一种高度保守的细胞信号系统,存在于大多数多细胞生物中。NOTCH1 的上调已被发现促进神经元凋亡^[31,32]。缺血条件下,NOTCH1 的表达显著升高,可能影响细胞活力、增殖和凋亡,促进缺血性卒中的发生^[33]。本研究中,我们发现 NOTCH1 可以调控 *FOS*,提示 NOTCH1 可能通过调控 *FOS* 的表达在缺血性脑卒中的进展中发挥重要作用。miRNA 在血液和血管中的所有细胞中都有表达,因此可以调节参与脑卒中发病过程的白细胞、血小板和脑微血管内皮细胞的功能^[34]。miRNA-122 由肝脏产生并分泌到血液中^[35]。已有研究发现,血液中 miR-122 的降低与包括脑卒中在内的多种疾病的炎症反应密切相关^[36]。Lv 等提出,miR-122 的过表达可以避免大脑中动脉闭塞大鼠发生脑卒中风险^[37]。Guo 等发现,miR-122 可以通过联合 FOXO3 使 HSP-70 介导的 NF- κ B 通路失活,从而减轻了缺血性脑卒中中的神经元损伤^[38]。本研究中,我们发现 miR-122-5p 可以调控 *SLC2A3* 的表达。最近的一项研究发现 *SLC2A3* 基因与神经退行性疾病阿尔茨海默病的遗传易感性有关^[39]。但目前 *SLC2A3* 在脑卒中发生中的作用尚未报道,因此我们推测 miR-122-5p 可能通过调控

SLC2A3 参与缺血性脑卒中的发病过程。具体的调控机制需要进一步地研究。

总之,本文最终筛选了8个缺氧相关的生物标志物,例如 *FOS* 和 *SLC2A3*。NOTCH1 可能通过调控 *FOS* 的表达在缺血性脑卒中的进展中发挥重要作用。miR-122-5p 可能通过调控 *SLC2A3* 参与缺血性脑卒中的发病过程。这些生物标志物可能作为新的治疗靶点来抑制卒中后的脑损伤。此外,研究发现糖代谢和免疫机制在缺血性脑卒中的发生和发展中发挥重要作用。

利益冲突声明:所有作者均声明不存在利益冲突。

作者贡献声明:胡彦兵负责设计论文框架、起草论文;达吾提江·依拉木负责研究过程的实施;郭雄负责数据收集、统计学分析、绘制图表;潘红波负责论文修改;何康民负责拟定写作思路、指导撰写论文并最后定稿。

[参考文献]

- [1] Makris K, Haliassos A, Chondrogianni M, et al. Blood biomarkers in ischemic stroke: potential role and challenges in clinical practice and research[J]. Crit Rev Clin Lab Sci, 2018, 55(5): 294-328.
- [2] Beal CC. Gender and stroke symptoms: a review of the current literature[J]. J Neurosci Nurs, 2010, 42(2): 80-87.
- [3] Chen Y, Xiao Y, Lin Z, et al. The role of circulating platelets microparticles and platelet parameters in acute ischemic stroke patients[J]. J Stroke Cerebrovasc Dis, 2015, 24(10): 2313-2320.
- [4] Dewdney B, Trollope A, Moxon J, et al. Circulating microRNAs as biomarkers for acute ischemic stroke: a systematic review[J]. J Stroke Cerebrovasc Dis, 2018, 27(3): 522-530.
- [5] Hoiland RL, Bain AR, Rieger MG, et al. Hypoxemia, oxygen content, and the regulation of cerebral blood flow[J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2016, 310(5): R398-R413.
- [6] Ferdinand P, Roffe C. Hypoxia after stroke: a review of experimental and clinical evidence[J]. Experimental & Translational Stroke Medicine, 2016, 8(1): 1-8.
- [7] Talan J. A model of the human blood-brain barrier shows the effects of hypoxia and inflammation after stroke[J]. Neurology Today, 2020, 20(18): 38-39.
- [8] Reinhardt J, Landsberg J, Schmid-Burgk JL, et al. MAPK signaling and inflammation link melanoma phenotype switching to induction of CD73 during immunotherapy[J]. Cancer Res, 2017, 77(17): 4697-4709.
- [9] Mootha VK, Lindgren CM, Eriksson KF, et al. PGC-1 α -responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes[J]. Nat Genetics, 2003, 34(3): 267-273.
- [10] Yu G, Wang LG, Han Y, et al. ClusterProfiler: an R package for comparing biological themes among gene clusters[J]. Omics, 2012, 16(5): 284-287.
- [11] Tibshirani R. Regression shrinkage and selection via the lasso[J]. J

- Royal Statistic Society: Series B (Methodological), 1996, 58 (1): 267-288.
- [12] Huang ML, Hung YH, Lee W, et al. SVM-RFE based feature selection and Taguchi parameters optimization for multiclass SVM classifier[J]. *Sci World J*, 2014, 795624:1-10.
- [13] Guo P, Luo Y, Mai G, et al. Gene expression profile based classification models of psoriasis[J]. *Genomics*, 2014, 103(1):48-55.
- [14] Xu Q, Xu H, Deng R, et al. Landscape of prognostic m6A RNA methylation regulators in hepatocellular carcinoma to aid immunotherapy[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9(8):669145.
- [15] Hänzelmann S, Castelo R, Guinney J. GSEA: gene set variation analysis for microarray and RNA-seq data[J]. *BMC Bioinformatics*, 2013, 14(1):1-15.
- [16] Zhang Q, Liu W, Zhang HM, et al. hTFtarget: a comprehensive database for regulations of human transcription factors and their targets[J]. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, 2020, 18(2):120-128.
- [17] Sticht C, De La Torre C, Parveen A, et al. MiRWalk: An online resource for prediction of microRNA binding sites[J]. *PLoS One*, 2018, 13(10):e0206239.
- [18] Shannon P, Markiel A, Ozier O, et al. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks[J]. *Genome Res*, 2003, 13(11):2498-2504.
- [19] Liu Y, Sun L, Zheng L, et al. Spexin protects cardiomyocytes from hypoxia-induced metabolic and mitochondrial dysfunction[J]. *Nannyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2020, 393(1):25-33.
- [20] Laouafa S, Roussel D, Marcouiller F, et al. Roles of oestradiol receptor alpha and beta against hypertension and brain mitochondrial dysfunction under intermittent hypoxia in female rats[J]. *Acta Physiologica*, 2019, 226(2):e13255.
- [21] Sevvick LK, Ghali S, Hill MD, et al. Systematic review of the cost and cost-effectiveness of rapid endovascular therapy for acute ischemic stroke[J]. *Stroke*, 2017, 48(9):2519-2526.
- [22] Brekke E, Berger HR, Widerøe M, et al. Glucose and intermediary metabolism and astrocyte-neuron interactions following neonatal hypoxia-ischemia in rat[J]. *Neurochem Res*, 2017, 42(1):115-132.
- [23] Geng J, Zhang Y, Li S, et al. Metabolomic profiling reveals that reprogramming of cerebral glucose metabolism is involved in ischemic preconditioning-induced neuroprotection in a rodent model of ischemic stroke[J]. *J Proteome Res*, 2019, 18(1):57-68.
- [24] Gelderblom M, Leypoldt F, Steinbach K, et al. Temporal and spatial dynamics of cerebral immune cell accumulation in stroke[J]. *Stroke*, 2009, 40(5):1849-1857.
- [25] Jones K, Maltby S, Plank M, et al. Peripheral immune cells infiltrate into sites of secondary neurodegeneration after ischemic stroke[J]. *Brain Behav Immun*, 2018, 67(1):299-307.
- [26] Kleinschnitz C, Schwab N, Kraft P, et al. Early detrimental T-cell effects in experimental cerebral ischemia are neither related to adaptive immunity nor thrombus formation[J]. *Blood*, 2010, 115(18):3835-3842.
- [27] Kanazawa M, Ninomiya I, Hatakeyama M, et al. Microglia and monocytes/macrophages polarization reveal novel therapeutic mechanism against stroke[J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(10):2135.
- [28] Angel P, Karin M. The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1991, 1072(2/3):129-157.
- [29] Jørgensen MB, Wright DC, Gehlert DR. Delayed c-fos proto-oncogene expression in the rat hippocampus induced by transient global cerebral ischemia: an in situ hybridization study[J]. *Brain Res*, 1989, 484(1/2):393-398.
- [30] Kindy M, Carney J, Dempsey R, et al. Ischemic induction of protooncogene expression in gerbil brain[J]. *J Mol Neurosci*, 1991, 2(4):217-228.
- [31] Zhao J, Sui M, Lü X, et al. Electroacupuncture promotes neural stem cell proliferation and neurogenesis in the dentate gyrus of rats following stroke via upregulation of Notch1 expression[J]. *Mol Med Rep*, 2015, 12(5):6911-6917.
- [32] LeComte MD, Shimada IS, Sherwin C, et al. Notch1-STAT3-ETBR signaling axis controls reactive astrocyte proliferation after brain injury[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015, 112(28):8726-8731.
- [33] Chen M, Wang F, Wang H. Silencing of lncRNA XLOC_035088 protects middle cerebral artery occlusion-induced ischemic stroke by Notch1 signaling[J]. *J Neuropath Exp Neurol*, 2021, 80(1):60-70.
- [34] Shi Y, Zhang L, Pu H, et al. Rapid endothelial cytoskeletal reorganization enables early blood-brain barrier disruption and long-term ischaemic reperfusion brain injury[J]. *Nat Commun*, 2016, 7(1):1-18.
- [35] Rivkin M, Simerzin A, Zorde-Khvaleyevsky E, et al. Inflammation-induced expression and secretion of microRNA 122 leads to reduced blood levels of kidney-derived erythropoietin and anemia[J]. *Gastroenterology*, 2016, 151(5):999-1010.
- [36] Liu da Z, Jickling GC, Ander BP, et al. Elevating microRNA-122 in blood improves outcomes after temporary middle cerebral artery occlusion in rats[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2016, 36(8):1374-1383.
- [37] Lv B, Cheng X, Sharp FR, et al. MicroRNA-122 mimic improves stroke outcomes and indirectly inhibits NOS2 after middle cerebral artery occlusion in rats[J]. *Front Neurosci*, 2018, 12(10):767.
- [38] Guo D, Ma J, Li T, et al. Up-regulation of miR-122 protects against neuronal cell death in ischemic stroke through the heat shock protein 70-dependent NF- κ B pathway by targeting FOXO3[J]. *Exp Cell Res*, 2018, 369(1):34-42.
- [39] Arseniou S, Siokas V, Aloizou A-M, et al. SLC2A3 rs12842 polymorphism and risk for Alzheimer's disease[J]. *Neurol Res*, 2020, 42(10):853-861.

引证本文:胡彦兵,达吾提江·依拉木,郭雄,等.缺血性脑卒中缺氧相关生物标志物的筛选[J].中 风 与 神 经 疾 病 杂 志,2023,40(7):628-635.