

缺血性脑损伤大鼠外周血动态共表达网络分析

潘宗富¹, 胡晓平¹, 张轶雯¹, 李 莉², 黄 萍¹

1. 浙江省人民医院 杭州医学院附属人民医院药学部, 浙江 杭州 310014

2. 浙江省淳安县第一人民医院(浙江省人民医院淳安分院)药剂科, 浙江 杭州 311700

[摘要] **目的:**研究大脑中动脉栓塞(MCAO)大鼠不同造模时程外周血的特异表达基因及特征共表达网络模块。**方法:**利用 GEO 数据库的基因表达谱芯片 GSE119121 联合 R 语言分析 MCAO 造模后不同时间点(0、1、2、3、6 及 24 h)外周血的差异表达基因。通过 STEM 工具筛选不同造模时程基因表达模式。利用基因本体(GO)数据库和京都基因与基因组百科全书(KEGG)数据库对差异表达的基因进行功能注释和通路富集。在 R 语言环境下利用 CEMiTool 包对基因表达谱矩阵进行共表达网络构建及模块分析,并将模块与不同造模时间点进行富集分析。**结果:**与造模 0 h 相比,造模后 1、2、3、6 及 24 h 差异表达基因数分别为 163、502、527、550、75。共有 38 种基因表达模式被富集,其中模式 65 和模式 34 分别在 2~6 h 特异上调或下调, *Hp*、*Nos2*、*P2ry10* 及 *Klf12* 为两种模式的代表性基因。共表达网络模块分析显示,造模急性期早期(1~6 h)基因状态与模块 2 正相关,造模 1~3 h 基因状态与模块 3 正相关,造模 2~6 h 基因变化与模块 4 正相关。基因模块 6 随着造模时间的迁移,与各时间点从正相关(0~2 h)逐渐转为负相关(3~24 h),模块 6 主要与病毒应答及固有免疫应答相关,其网络核心节点包括 *Mx1*、*Mx2*、*Rtp4* 等基因。**结论:**本研究初步筛选了缺血性脑卒中急性发病期大鼠外周血的特征基因及动态共表达网络模块,为探究缺血性脑卒中的病理生理变化规律提供了依据。



[关键词] 缺氧缺血,脑/血液;卒中/血液;基因表达;基因调控网络

[中图分类号] R743.3 **[文献标志码]** A

Identification of dynamic co-expression networks in peripheral blood of rats after middle cerebral artery occlusion

PAN Zongfu¹, HU Xiaoping¹, ZHANG Yiwen¹, LI Li², HUANG Ping¹ (1. Department of Pharmacy, Zhejiang Provincial People's Hospital, People's Hospital of Hangzhou Medical College, Hangzhou 310014, China; 2. Department of Pharmacy, First People's

收稿日期:2019-06-08 接受日期:2019-07-26

基金项目:国家自然科学基金(81802673);浙江省公益性技术研究计划(LQ18H160017);浙江省医药卫生科技计划(2017KY023);杭州市卫生科技计划(2017B56)

第一作者:潘宗富(1989—),男,博士,主管药师,主要从事神经再生研究;E-mail: panzongfu@163.com; <https://orcid.org/0000-0002-4054-6660>

通信作者:李 莉(1971—),女,学士,主任药师,主要从事医院药学研究;E-mail: 420683321@qq.com; <https://orcid.org/0000-0002-3701-0590>。黄 萍(1973—),女,博士,主任药师,主要从事药理研究;E-mail: huangping1841@zjcc.org.cn; <https://orcid.org/0000-0002-9598-502X>

Hospital of Chun'an, Hangzhou 311700, China)

Corresponding author: LI Li, E-mail: 420683321@qq.com, <https://orcid.org/0000-0002-3701-0590>; HUANG Ping, E-mail: huangping1841@zjcc.org.cn, <https://orcid.org/0000-0002-9598-502X>

[Abstract] **Objective:** To identify the time dependent profiles of gene expression and featured co-expression network modules in peripheral blood of rats after middle cerebral artery occlusion (MCAO). **Methods:** Microarray GSE119121 from GEO database was analyzed by R language to identify the significantly changed genes in peripheral blood at different time points (0, 1, 2, 3, 6 and 24 h) after MCAO. Gene expression patterns at different time courses were screened by STEM tools. Then, function annotation and pathway enrichment of differentially expressed genes (DEGs) were performed using the Gene Ontology (GO) database and the Kyoto Gene and Genomic Encyclopedia (KEGG) database. Depending on CEMiTool package, gene expression profile matrix was inputted into R to construct the co-expression networks and to analyze modules, and enrichment analysis was conducted to evaluate the correlation between the modules and different time points. **Results:** Comparing with gene at 0 h, the numbers of DEGs in peripheral blood at different time points after MCAO were 163 (1 h), 502 (2 h), 527 (3 h), 550 (6 h), and 75 (24 h), respectively. Moreover, a total of 38 gene expression patterns were enriched, and pattern 65 and pattern 34 were specifically up-regulated or down-regulated at 2 – 6 h. *Hp*, *Nos2*, *P2ry10*, and *Klf12* were representative genes of these two models. The co-expression network module analysis showed that the gene status in the early acute phase (1 – 6 h) was positively correlated with the Module 2. Module 3 and Module 4 was positively correlated with phase phase 1 – 3 h and 2 – 6 h, respectively. Noteworthy, Module 6 gradually changed from positive correlation (0 – 2 h) to negative correlation (3 – 24 h) with the MCAO time course, and Module 6 was mainly related to viral response and innate immune response. The hub genes of Module 6 included *Mx1*, *Mx2*, and *Rtp4*. **Conclusion:** Our study has identified the featured genes and dynamic co-expression network modules in peripheral blood after acute ischemic stroke, which provides a potential basis for judging the onset time of ischemic stroke.

[Key words] Hypoxia-ischemia, brain/blood; Stroke/blood; Gene expression; Gene regulatory networks

[J Zhejiang Univ (Med Sci), 2019,48(6):587-593.]

脑卒中已成为威胁人类健康的第三大“杀手”,具有高发病率、高致残率和高病死率等特点^[1]。中国是全世界脑卒中高发病率国家之一,国内首发脑卒中患病率每年增加6.5%,且发病年龄呈年轻化趋势,严重危害患者的健康和生活质量^[2]。缺血性脑卒中是脑卒中的主要类型,通常由脑内动脉栓塞造成局部供血障碍引起,最终导致脑组织缺血坏死。目前,唯一被证明对治疗缺血性脑卒中有效的方法是采用重组组织型溶酶原

激活剂(recombinant tissue plasminogen activator, rt-PA)超早期溶栓,通过恢复缺血区脑组织血液供应发挥疗效。然而,rt-PA的有效治疗时间窗仅为发病4.5 h内,极大地限制了其应用^[3]。由于病情诊断、初始发病时间、脑内出血风险等因素的不确定性,临床上rt-PA的合理使用并不理想^[4-5]。

缺血性脑卒中的进展是一个复杂的动态过程,其病理机制尚未完全明确。除了局部脑组织缺血坏死,缺血性脑损伤还可引起外周血细胞因

子及趋化因子等信号快速变化,同时外周血单核细胞、红细胞、血小板等的状态也随着病情进展而发生改变^[6-8]。因此,通过筛选缺血性脑损伤急性发病期不同时间点外周血的关键基因及分子网络变化,可为探索缺血性脑损伤的病理机制提供线索。基于此,本研究利用生物信息学技术分析大鼠中动脉栓塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)大鼠不同造模时程外周血基因表达谱,筛选不同时程特异表达的基因及特征分子共表达网络,进而挖掘关键网络节点,以探究缺血性脑损伤的动态进展过程及病理生理变化的规律。

1 材料与方法

1.1 基因表达谱芯片数据处理

在美国国立生物技术信息中心(NCBI)平台的基因表达综合数据库(GEO, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)中筛选得到缺血性脑损伤造模后不同时间点外周血基因表达谱芯片GSE119121^[9],并下载其分组信息及探针表达谱文件“GSE119121_series_matrix.txt.gz”。芯片平台为GPL6247,芯片含大鼠大脑MCAO造模后0、1、2、3、6及24 h外周血细胞基因表达谱,除了6 h为7只大鼠的数据,其余时间点均为8只大鼠的数据。

1.2 差异表达基因筛选

将芯片样本分成0、1、2、3、6及24 h六个组别,在R3.5.1(<http://www.bioconductor.org/>)环境下,利用limma包^[10]将每个组别分别与0 h进行比较,获取差异基因。筛选条件为 $|\log$ 差异倍数 $|\geq 1$,校正后的 P 值水平0.05。得到5份显著差异表达基因的列表。

1.3 不同时间点基因表达模式筛选

合并不同时间点的差异基因,利用时间序列分析软件Short Time-series Expression Miner(STEM, v1.3.11)^[11]设置100种表达模式,最大单位变化设为1,将差异基因标准化,0 h基因表达值设为1,计算不同时间点的相对表达值并进行表达模式富集,富集模式设为默认值。彩色模块为显著富集表达模式。

1.4 基因功能富集及注释

将差异基因列表分别导入DAVID 6.8(<https://david.ncifcrf.gov/>)在线基因功能富集工具,对其进行基因本体和京都基因与基因组百科

全书(KEGG)富集分析,得到对应的富集功能与信号通路信息。在R3.5.1环境下,利用GOplot包的GOCircle功能对富集结果进行可视化分析,按 P 值取显著性前10位的功能及信号通路。

1.5 共表达模块分析及网络构建

在R3.5.1环境下,利用CEMiTool包^[12]对基因表达谱矩阵进行共表达网络模块构建及分析。首先,从STRING v11.0(string-db.org)导出该基因表达谱对应的大鼠蛋白相互作用关系文件,并作为CEMiTool包进行共表达模块网络分析的背景文件。利用CEMiTool包输出共表达模块网络分析结果,包括样本聚类树(检验输入样本差异程度)、 β 与 R^2 平均连通性图(选定软阈值,以筛选无标度网络模块)、模块富集评分图(P 值大于0.05不显示)、模块基因表达折线图(不同组别的模块基因表达量变化可视化)、模块基因共表达及相互作用网络图(Degree值越大,节点直径越大,颜色越深)。

2 结果

2.1 大鼠MCAO造模后不同时间点外周血差异基因及特征基因筛选

差异基因分析显示,与造模0 h相比,造模后1、2、3、6及24 h差异基因数目分别为163、502、527、550、75,造模后各时间点上调及下调倍数前50位的差异基因如附表1~10所示。其中,五个时间点共有25个共同上调差异基因(附图1A)以及4个共同下调差异基因(附图1B)。此外,差异变化基因的交集显示各时间点共有30个差异变化基因(附图1C),其中LOC689230在1~6 h上调,在24 h下调(附图1D),提示LOC689230的表达模式可能与脑缺血造模急性期的机体状态相关。

为进一步分析不同时间点的特征表达基因,研究通过富集分析发现差异基因共存在38种表达模式,其中14种模式为显著富集(附图1E)。模式95(17个基因)、58(1个基因)和模式4(19个基因)为造模2 h的特征基因,在2 h上调或下调;模式97和模式83在2~3 h分别特异上调或下调;模式93(76个基因)和模式6(108个基因)在3~6 h特异变化;模式65(81个基因)和模式34(11个基因)分别在2~6 h上调或下调;模式91(34个基因)、57(18个基因)和模式8(5个基

因)、42(5个基因)在6h特异上调及下调;模式50和90为24h的特异表达模式。值得注意的是,模式28(3个基因)在1h特异下调而在6h特异上调;模式46在3h特异下调,而在24h特异上调。此外,研究亦发现7个基因随发病时程持续上调或下调,包括 *Fetub*、*Mx1*、*Mx2*、*Rtp4*、*LOC102556096*、*Igj* 及 *LOC100362391* (附图1F、G)。提示这些基因与MCAO大鼠病程进展密切相关。

2.2 MCAO造模后不同时间点外周血差异基因功能注释

不同时间点外周血差异表达基因基因本体的生物进程注释结果显示,MCAO造模后1h差异基因主要参与细胞对脂多糖的应答(上调)、炎症反应(上调)、免疫应答(下调)以及抗原加工和主要组织相容性复合体II介导的外源肽抗原呈递(下调)等生物进程(附图2A)。造模后2h上调排名前二的生物进程为炎症反应及细胞对脂多糖的应答,下调排名前二的为B细胞增殖正调控及对 γ 干扰素的反应(附图2B)。造模3h上调的生物进程排名前二为细胞对脂多糖的应答及固有免疫应答,下调排名前二的为细胞表面受体信号通路及获得性免疫应答(附图2C)。造模后6h上调排名前二的为细胞对脂多糖的应答及固有免疫应答,下调排名前二的为细胞对细胞因子刺激的反应及获得性免疫应答(附图2D)。造模后24h上调排名前二的为负调控内肽酶活性及负调控炎症反应,下调排名前二的为固有免疫应答及防御应答(附图2E)。以上数据提示,炎症反应、固有免疫应答及细胞对脂多糖的应答等生物进程在MCAO早期被激活,而在24h呈现负调控或未明显激活状态。

2.3 MCAO造模后不同时间点外周血差异基因通路富集

进一步对MCAO造模后不同时间点外周血差异基因进行KEGG通路富集分析。造模后1h差异基因参与排名前十的通路均为下调趋势,包括结核病、造血细胞系等通路(附图3A)。造模后2h上调排名前二的通路包括利什曼病及金黄色葡萄球菌感染,下调排名前二的通路包括造血细胞系及原发性免疫缺陷(附图3B)。造模后3h上调排名前二的通路包括结核病及利什曼病,下调排名前二的通路为造血细胞系及T细胞受体

信号通路(附图3C)。造模后6h上调排名前二的通路包括细胞因子-细胞因子受体相互作用及利什曼病,下调排名前二的通路为造血细胞系及原发性免疫缺陷(附图3D)。造模后24h无显著富集通路。

2.4 MCAO造模后不同时间点外周血特征共表达模块分析

为进一步考察与缺血性脑损伤发病时程密切相关的特征基因,研究通过构建共表达网络分析每个时间点的相关模块。首先对样本进行聚类,发现每个时间点的样本差异较小(附图4A)。共表达网络构建的软阈值筛选显示 β 值为10(附图4B、C)。共表达网络分析显示,共有六个特征模块被富集,模块与各时间点的相关性以标准化富集分数表示,所展示模块校正后的 P 值均小于0.05(附图4D)。基因模块富集分析表明,造模急性期早期(1~6h)基因状态与模块2显著正相关,造模1~3h基因变化与模块3正相关,造模2~6h基因状态与模块4密切正相关,提示这些模块可能与缺血性脑损伤的早期发病时程密切相关(附图4D)。值得注意的是,随着造模时间的迁移,模块6与各时间点从正相关(0~2h)逐渐转为负相关(3~24h),提示该模块可能与疾病进程相关(附图4D)。最后,研究进一步呈现了6个模块不同时间点的基因表达模式,结果提示基因的表达高低与模块的富集密切相关(附图4E)。

2.5 共表达网络构建及核心基因筛选

共表达网络构建结果显示:模块1共含696个基因,构建网络后其核心节点为 *Gngt2*、*Fos*、*Egr1*、*Ptgs2*、*Ccl2*、*Cd79b*、*Cd19*、*Isg15*、*Oasl* 及 *Ddx60* (附图5A);模块2共含694个基因,构建网络后其核心节点为 *Ptafr*、*Alox5ap*、*Lbp*、*Bmx*、*Ccr5*、*C3*、*Ccl2*、*Tlr2*、*Tlr6*、*Tlr10*、*Jun*、*Stat3*、*Mmp9* 及 *Tnf* (附图5B);模块3共含142个基因,构建网络后其核心基因为 *Clec5a*、*Nfkbia*、*Tlr5*、*Ifih1*、*Ifit2*、*Zbp1*、*Oasl2*、*Oas2*、*Xaf1* 及 *Usp18* (附图5C),模块3核心基因在造模后不同时间点的表达趋势如附图5D所示;模块4共含76个基因,其网络核心节点为 *Cd19*、*Cd33*、*Cd63*、*Flot2*、*Fbx15*、*Tfrc*、*Dab2*、*Tpd52*、*Xbp1* 及 *Sort1* (附图5E);模块5共含45个基因,但蛋白-蛋白互作用(PPI)较少,无法呈现网络;模块6共含38个基因,其网络核心节点为 *Slc12a2*、*Oas1b*、*Mx1*、*Mx2*、*Ifih1*、*Isg15*、*Rtp4*、*Usp18*、

Irgm、*Ifi47* 及 *Ifi2*(附图 5F)。

2.6 共表达模块基因功能注释及通路富集

为明确每个特征模块的生物学意义,研究利用基因本体及 KEGG 对其进行注释。模块 1 主要参与的生物进程包括 T 细胞受体信号通路、T 细胞分化等(附图 6A);模块 2 主要与炎症反应、细胞对脂多糖的应答等相关(附图 6B);模块 3 主要与衰老及嘌呤核苷酸生物合成过程等相关(附图 6C);模块 4 主要参与含吡啶的化合物合成过程及红细胞发育等生物进程(附图 6D);模块 5 主要参与正向调控神经元分化及血小板形成等过程(附图 6E);模块 6 主要与病毒应答及固有免疫应答相关(附图 6F)。KEGG 通路富集结果显示,模块 1 主要与造血细胞系及原发性免疫缺陷相关(附图 6G);模块 2 主要参与细胞因子-细胞因子受体互作及利什曼病等通路(附图 6H);模块 3 主要与丙型肝炎及肿瘤通路相关(附图 6I);模块 6 主要参与甲型流感及维甲酸诱导基因蛋白 1 样受体信号通路等(附图 6J)。模块 4、5 无显著富集通路。

3 讨论

缺血性脑卒中由于脑内动脉栓塞造成局部供血障碍,导致患者脑组织缺血坏死以及神经功能缺失。研究表明,急性缺血性脑卒中患者在未接受治疗时,大脑每分钟约 190 万个神经元、140 亿个突触及累计长达 12 km 的神经纤维被破坏^[13]。因此,脑卒中患者的早期治疗尤为关键。目前,采用 rt-PA 超早期溶栓是唯一被证明治疗缺血性卒中有效的方法。然而,研究显示多数患者对 rt-PA 的使用并未在最佳时间窗内^[4,14]。因此,筛选缺血性脑卒中不同发病时期的基因表达特征有助于诠释疾病的病理生理变化规律,为临床判断准确的发病时间提供线索。缺血性脑损伤常伴随全身组织的状态改变,外周血由于取样及检测便捷的优势,常作为疾病的标志物。本研究通过分析缺血性脑损伤急性发病期不同时间点外周血特征基因及共表达网络变化,发现了一些时间特异性表达的基因模块,为脑卒中外周血的病理机制研究提供线索。

缺血性脑卒中的进展动态而多变,反映在外周血的基因变化亦是如此。不同造模时间点基因表达模式富集结果显示,从造模前到急性发病期,

外周血基因共产生了 38 种表达模式。其中,在急性发病期早期(2~6 h),共有 92 个基因发生特异变化,*Hp*(编码触珠蛋白)、*Nos2*、*P2ry10* 及 *Klf12* 为变化最为明显的四个基因。触珠蛋白是一种急性期反应血浆蛋白,可在应激反应时保护机体免于氧化损伤。在 MCAO 造模 2~6 h,*Hp* 的表达显著上调,并于 6 h 达到高峰。研究表明,外周血中触珠蛋白表达上调是急性缺血性脑卒中患者的预后不良因素^[15]。Brea 等^[16]通过检测首次发生缺血性脑卒中且发病 12 h 以内的患者血清触珠蛋白及淀粉样蛋白 A,发现两者的表达水平均可较好地用于诊断确认动脉粥样硬化导致的缺血性卒中。然而,将触珠蛋白用于缺血性脑卒中急性发病期早期的诊断尚未见报道。*Nos2* 可参与脑卒中引起的神经炎症,上调血液中的 miR-122 可直接抑制 *Nos2* 表达,促进 MCAO 大鼠的神经功能恢复^[17]。本文资料显示,*Nos2* 在造模后 2~6 h 存在一过性高表达,提示 *Nos2* 可能参与缺血性脑损伤的进展,但目前将 *Nos2* 表达变化用于判断脑缺血进展时程的研究尚未见报道。*P2ry10* 及 *Klf12* 在造模后 2~6 h 一过性下调,24 h 又恢复正常水平。*P2ry10* 是一类 G 蛋白偶联受体,可被鞘氨醇-1-磷酸及溶血磷脂酸结合激活,目前在脑缺血中的作用未明。*Klf12* 是抗炎的调控因子,与脑卒中相关研究亦有限。这些急性发病期特异变化的基因可能作为机体异常的感受器,敏感地反映缺血性脑损伤早期的分子生物学状态。

病理状态下基因并非单独失调,而是伴随着整个分子网络的改变。共表达网络分析显示,缺血性脑损伤进展过程基因表达模块是动态且特异的,如造模急性期早期(1~6 h)基因状态与模块 2 正相关,造模 1~3 h 基因变化与模块 3 正相关,造模 2~6 h 基因状态与模块 4 正相关。模块 2 共包含 694 个基因,主要参与炎症反应、细胞对脂多糖的应答等生物进程。核心基因如 *Ptafr*、*Alox5ap*、*Tlr2*、*Tlr6*、*Tlr10*、*Jun*、*Stat3* 及 *Tnf* 等与上述进程密切相关。*Alox5ap* 参与白三烯的合成,研究表明 *Alox5ap* 是脑卒中的易感基因,其单核苷酸多态性位点如 *SG13S114* 突变与欧洲人群的中风风险相关^[18],初步临床试验显示针对 *Alox5ap* 的抑制剂可改善哮喘症状^[19],但是否对脑卒中患者有效尚待研究。此外,研究亦发现基因模块 6 随着造模时间的迁移,与各时间点从正相关(0~

2 h)逐渐转为负相关(3~24 h),模块6 主要与病毒应答及固有免疫应答相关,其网络核心节点包括 *Mx1*、*Mx2*、*Rtp4* 等基因。基因表达模式显示 *Mx1*、*Mx2*、*Rtp4* 等随着造模时程逐渐下调。*Mx1* 和 *Mx2* 可被干扰素诱导表达,参与抗病毒免疫应答^[20-21],但在缺血性脑损伤中的作用未知。*Rtp4* 是一类受体转运体蛋白,可参与调控鸦片受体的细胞膜定位,Décaillot 等^[22]发现吗啡可促进下丘脑 *Rtp4* 的表达。此外,Schoggins 等^[23]研究指出 *Rtp4* 可被 I 型干扰素上调进而参与抗病毒免疫应答。研究表明,在脑卒中时 I 型干扰素分泌增加,导致小胶质细胞过度活化,并影响脑内神经免疫环境以及血脑屏障完整性,引起白质的小胶质细胞过度增生以及促炎因子释放^[24]。虽然 *Mx1*、*Mx2*、*Rtp4* 在脑卒中的作用尚未明确,但 I 型干扰素分泌失调提示了这些下游分子参与脑卒中进展的可能性。

综上,本研究分析了缺血性脑卒中大鼠急性发病期的外周血特征基因及共表达网络模块,补充了脑部病灶以外的机体状态变化规律,为后续 rt-PA 的合理使用提供了潜在标志物。后续的研究仍需要大样本验证其诊断效能,包括扩大大鼠的样本量确定时间特异性表达基因以及收集临床患者血样进行标志物验证。此外,鉴于脑卒中的有效溶栓时间窗极短,目前基因检测技术尚无法实时呈现检测结果,如何提升标志物检测效率将是治疗脑卒中的重要研究方向。根据脑卒中的发病时间进行标志物细分,描绘动态的基因群变化,将为缺血性脑卒中提供一个精准的发病“时钟”,为后续临床决策提供参考依据。

(附图 1~6、附表 1~10 见本文网络版)

参考文献

- [1] MURRAY C J, LOPEZ A D. Measuring the global burden of disease[J]. *N Engl J Med*,2013,369(5): 448-457.
- [2] WANG J, AN Z, LI B, et al. Increasing stroke incidence and prevalence of risk factors in a low-income Chinese population[J]. *Neurology*,2015,84(4):374-381.
- [3] HACKE W, KASTE M, BLUHMKI E, et al. Thrombolysis with alteplase 3 to 4.5 hours after acute ischemic stroke[J]. *N Engl J Med*,2008,359(13): 1317-1329.
- [4] FAIZ K W, SUNDSETH A, THOMMESSEN B, et al. Reasons for low thrombolysis rate in a Norwegian ischemic stroke population[J]. *Neurol Sci*,2014,35(12):1977-1982.
- [5] FINK J N, SELIM M H, KUMAR S, et al. Why are stroke patients excluded from tPA therapy? An analysis of patient eligibility[J]. *Neurology*,2001,57(9): 1739-1740.
- [6] MOORE D F, LI H, JEFFRIES N, et al. Using peripheral blood mononuclear cells to determine a gene expression profile of acute ischemic stroke: a pilot investigation[J]. *Circulation*,2005,111(2): 212-221.
- [7] STAMOVA B, XU H, JICKLING G, et al. Gene expression profiling of blood for the prediction of ischemic stroke[J]. *Stroke*,2010,41(10): 2171-2177.
- [8] WANG Q, TANG X N, YENARI M A. The inflammatory response in stroke [J]. *J Neuroimmunol*,2007,184(1-2):53-68.
- [9] DAGONNIER M, WILSON W J, FAVALORO J M, et al. Hyperacute changes in blood mRNA expression profiles of rats after middle cerebral artery occlusion: Towards a stroke time signature[J/OL]. *PLoS One*,2018,13(11):e0206321.
- [10] SMYTH G K. **limma: linear models for microarray data**[M]//GENTLEMAN R, VINCENT J, CAREY V J, et al. Bioinformatics and computational biology solutions using R and bioconductor. Springer,2011:397-420.
- [11] ERNST J, BAR-JOSEPH Z. STEM: a tool for the analysis of short time series gene expression data[J]. *BMC Bioinformatics*,2006,7:191.
- [12] RUSSO P S T, FERREIRA G R, CARDOZO L E, et al. CEMiTool: a Bioconductor package for performing comprehensive modular co-expression analyses[J]. *BMC Bioinformatics*,2018,19(1):56.
- [13] SAVER J L. Time is brain-quantified[J]. *Stroke*,2006,37(1):263-266.
- [14] MINNERUP J, WERSCHING H, RINGELSTEIN E B, et al. Impact of the extended thrombolysis time window on the proportion of recombinant tissue-type plasminogen activator-treated stroke patients and on door-to-needle time [J]. *Stroke*,2011,42(10): 2838-2843.
- [15] ZHANG T, XIANG L. Elevated plasma haptoglobin level as a potential marker for poor prognosis in acute cerebral infarction[J]. *Eur Neurol*,2018,79(3-4): 154-160.
- [16] BREA D, SOBRINO T, BLANCO M, et al.

- Usefulness of haptoglobin and serum amyloid A proteins as biomarkers for atherothrombotic ischemic stroke diagnosis confirmation [J]. **Atherosclerosis**, 2009, 205(2):561-567.
- [17] LIU DA Z, JICKLING G C, ANDERB P, 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.
- [18] LÖHMUSSEAR E, GSCHWENDTNER A, MUELLERJ C, et al. ALOX5AP gene and the PDE4D gene in a central European population of stroke patients[J]. **Stroke**, 2005, 36(4):731-736.
- [19] EVANS J F, FERGUSON A D, MOSLEYR T, et al. What's all the FLAP about?: 5-lipoxygenase-activating protein inhibitors for inflammatory diseases [J]. **Trends Pharmacol Sci**, 2008, 29(2):72-78.
- [20] JOHANNES L, KAMBADUR R, LEE-HELLMICH H, et al. Antiviral determinants of rat Mx GTPases map to the carboxy-terminal half[J]. **J Virol**, 1997, 71(12):9792-9795.
- [21] ARNHEITER H, SKUNTZ S, NOTEBORN M, et al. Transgenic mice with intracellular immunity to influenza virus[J]. **Cell**, 1990, 62(1):51-61.
- [22] DÉCAILLOT F M, ROZENFELD R, GUPTA A, et al. Cell surface targeting of mu-delta opioid receptor heterodimers by RTP4[J]. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 2008, 105(41):16045-16050.
- [23] SCHOGGINS J W, WILSON S J, PANIS M, et al. A diverse range of gene products are effectors of the type I interferon antiviral response[J]. **Nature**, 2011, 472(7344):481-485.
- [24] MCDONOUGH A, LEE R V, WEINSTEIN J R. Microglial interferon signaling and white matter[J]. **Neurochem Res**, 2017, 42(9):2625-2638.

[本文编辑 余方]

· 学术动态 ·

陈枢青教授团队与哈佛大学医学院教授合作研究成果揭示死亡受体5跨膜区高度聚集特性及其机制

陈枢青教授与哈佛大学医学院周界文教授、吴皓教授合作在2019年第6期《细胞》(*Cell*)发表了题为“Higher-order clustering of the transmembrane anchor of DR5 drives signaling”的研究论文(<https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.02.001>)。该研究首次揭示了死亡受体5(death receptor 5, DR5)在激活后其跨膜区高度聚集,并直接激活下游的细胞凋亡通路。此外,该研究还提出DR5的胞外区在DR5激活前起到自我抑制作用,阻止DR5跨膜区的聚集倾向,从而防止受体由于跨膜区聚集而自动激活。该研究成功解释了部分二聚体或单体的抗体片段为何能够像三聚体的DR5肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(TRAIL)那样激活DR5,而且其中某些DR5上的抗体表位与TRAIL在DR5上的结合位点完全不同。此外,肿瘤坏死因子受体(TNFR)家族包含了许多重要的免疫受体,比如TNFR2、OX40等,它们的跨膜区与DR5相似,均拥有GXXXG motif,可促进跨膜区聚集。因此,该研究提出了全新的TNFR家族受体的信号传递机制,阐明了单次跨膜跨膜区在信号传递过程中的重要作用,为DR5激动型靶向抗肿瘤药物的研发提供了思路,对于目前热门的免疫治疗具有积极的理论指导意义。

该研究还发现TNFR家族的其他重要免疫受体也存在跨膜区聚集,通过酶切方式原位切除TNFR2和OX40 ECD均可激活下游NF- κ B通路,表明跨膜区聚集在TNFR家族受体中是一种较为普遍的信号传递调控机制,且有望应用至其他受体的信号传递过程。因此,该研究为单克隆抗体、双/多特异性抗体激活、调控免疫受体提供了新的理论支持,有望推动基于抗体的免疫治疗。

论文第一作者为潘利强博士、赵文彬博士研究生、傅天民博士和赵琳琳博士。部分研究工作获得了国家重点研发计划的支持。