

急性脑出血模型大鼠脑组织中差异表达基因测序的验证及功能分析

高玉广, 钟洁, 黄德庆, 马玉娟, 廖煜雄, 刘琦琦

<https://doi.org/10.12307/2024.354>

投稿日期: 2023-05-10

采用日期: 2023-06-07

修回日期: 2023-06-29

在线日期: 2023-07-26

中图分类号:

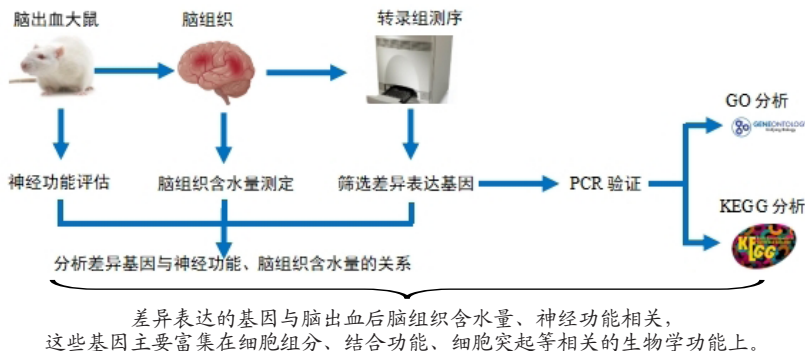
R496; R318; R446

文章编号:

2095-4344(2024)20-03182-08

文献标识码: A

文章快速阅读: 急性脑出血模型大鼠脑组织差异表达基因的筛选及功能分析



文题释义:

转录组测序: 是指利用第2代高通量测序技术进行cDNA测序, 全面快速地获取某一物种特定器官或组织在某一状态下的几乎所有转录本。

生物信息学: 是运用数学和信息学方法阐明和解释海量生物学数据所蕴含的生物学意义的重要手段和工具。

摘要

背景: 急性脑出血中存在差异表达的基因, 这些基因与脑出血发生发展有关。

目的: 筛选急性脑出血大鼠模型脑组织中差异表达的基因和关键基因, 并采用qPCR进行验证, 分析关键基因与脑出血后神经功能、脑组织含水量的关系。

方法: 78只SD大鼠随机分为2组: 脑出血组大鼠于右侧尾状核部位注射胶原酶构建脑出血模型, 假手术组大鼠于相同部位注射等量生理盐水。运用TRIzol法将2组大鼠的脑组织提取出RNA, 转录组测序, 筛选急性脑出血脑组织的差异表达的基因, 经过qPCR验证, 分析基因与脑出血后神经功能、脑组织含水量的关系, 并结合生物信息学对关键基因进行GO、KEGG功能富集分析。

结果与结论: ①筛选出10个关键基因, 分别是CXCL8、SERPINE1、TFPI2、CXCR4、GDA、KCNQ5、ERICH3、SCN3B、CACNA1E、CCL20; ②脑出血组的关键基因GDA、KCNQ5、ERICH3、SCN3B、CACNA1E含量低于假手术组($P < 0.05$), CXCL8、SERPINE1、TFPI2、CXCR4、CCL20含量高于假手术组($P < 0.05$); ③关键基因GDA、KCNQ5、ERICH3、SCN3B、CACNA1E含量与脑组织含水量、神经功能缺损评分正相关($P < 0.05$), CXCL8、SERPINE1、TFPI2、CXCR4、CCL20含量与脑组织含水量、神经功能缺损评分负相关($P < 0.05$); ④GO分析显示基因在生物过程差异表达基因主要富集于白细胞趋化性、趋化因子介导的信号通路; 细胞组成差异表达基因主要富集于阳离子通道复合物、离子通道复合物; 分子功能差异表达基因主要富集于门控通道活动、离子通道活动; ⑤KEGG分析显示基因集中于TNF信号通路、谷氨酸能突触、GABA能突触; ⑥结论: 在脑出血中出现差异表达的基因为CXCL8、SERPINE1、TFPI2、CXCR4、GDA、KCNQ5、ERICH3、SCN3B、CACNA1E、CCL20, 这些基因与脑出血后脑组织含水量、神经功能相关, 这些基因主要富集在细胞组分、结合功能、细胞突起等相关的生物学功能上。

关键词: 脑出血; 基因; 差异性表达; 神经功能; 脑组织含水量; 生物信息学分析

Sequencing, verification and functional analysis of differentially expressed genes in brain tissue of a rat model with acute intracerebral hemorrhage

Gao Yuguang, Zhong Jie, Huang Deqing, Ma Yujuan, Liao Yuxiong, Liu Qiqi

The First Affiliated Hospital of Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530023, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Gao Yuguang, Master, Attending physician, The First Affiliated Hospital of Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530023, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Corresponding author: Zhong Jie, Master, Associate chief physician, The First Affiliated Hospital of Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530023, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Abstract

BACKGROUND: There are differentially expressed genes in acute intracerebral hemorrhage, which are related to the occurrence and development of intracerebral hemorrhage.

广西中医药大学第一附属医院, 广西壮族自治区南宁市 530023

第一作者: 高玉广, 男, 广西壮族自治区博白县人, 汉族, 2016年广西中医药大学毕业, 硕士, 主治医师, 主要从事脑血管疾病及身心疾病的中西医结合治疗的研究。

通讯作者: 钟洁, 硕士, 副主任医师, 广西中医药大学第一附属医院, 广西壮族自治区南宁市 530023

<https://orcid.org/0000-0003-1704-6235> (高玉广)

基金资助: 广西教育厅高校中青年教师科研基础能力提升项目(2020KY07015), 项目负责人: 高玉广; 广西壮族自治区卫生健康委员会自筹经费科研课题(20210943), 项目负责人: 高玉广; 广西中医药重点学科建设项目(GZXK-Z-20-47); 广西医疗卫生重点培育学科建设项目(桂卫科教发[2021]8号)

引用本文: 高玉广, 钟洁, 黄德庆, 马玉娟, 廖煜雄, 刘琦琦. 急性脑出血模型大鼠脑组织中差异表达基因测序的验证及功能分析[J]. 中国组织工程研究, 2024, 28(20):3182-3189.



OBJECTIVE: To screen differentially expressed genes and key genes in brain tissue of a rat model with acute intracerebral hemorrhage, to validate them through qPCR, and to analyze the relationships between key genes and the neurological function and brain tissue water content after intracerebral hemorrhage.

METHODS: Seventy-eight Sprague-Dawley rats were randomly divided into two groups: in intracerebral hemorrhage group, a rat model of acute intracerebral hemorrhage was made using collagenase injection at the right caudate nucleus; and in sham-operated group, rats were injected with equal amount of saline at the same site. RNA was extracted from rat brain tissues of both groups using the TRIzol method and transcriptome sequencing technology was used to identify differentially expressed genes in brain tissues of acute intracerebral hemorrhage, which were then verified by qPCR and analyzed for the relationships between the genes and neurological function and brain tissue water content after intracerebral hemorrhage. And the key genes were analyzed by GO and KEGG functional enrichment analysis in combination with bioinformatics.

RESULTS AND CONCLUSION: Ten key genes were identified, including CXCL8, SERPINE1, TFPI2, CXCR4, GDA, KCNQ5, ERICH3, SCN3B, CACNA1E, and CCL20. The contents of GDA, KCNQ5, ERICH3, SCN3B, and CACNA1E in the intracerebral hemorrhage group were lower than those in the sham-operated group ($P < 0.05$). The contents of CXCL8, SERPINE1, TFPI2, CXCR4 and CCL20 in the intracerebral hemorrhage group were higher than those in the sham-operated group ($P < 0.05$). The contents of GDA, KCNQ5, ERICH3, SCN3B, and CACNA1E were positively correlated with brain tissue water content and neurologic deficit score ($P < 0.05$), while the contents of CXCL8, SERPINE1, TFPI2, CXCR4 and CCL20 were negatively correlated with brain tissue water content and neurologic deficit score ($P < 0.05$). GO analysis indicated that differentially expressed genes were mainly enriched in two biological processes (leukocyte chemotaxis and chemokine-mediated signaling pathways), two cell components (cation channel complexes and ion channel complexes), and two molecular functions (gated channel activity and ion channel activity). KEGG analysis indicated that differentially expressed genes were concentrated in tumor necrosis factor signaling pathway, glutamatergic synapses and GABAergic synapses. To conclude, the differentially expressed genes in intracerebral hemorrhage include CXCL8, SERPINE1, TFPI2, CXCR4, GDA, KCNQ5, ERICH3, SCN3B, CACNA1E, and CCL20, and these genes are related to brain tissue water content and neurological function after intracerebral hemorrhage. These genes are mainly enriched in cell components, binding functions, cellular protrusions, and other related biological functions.

Key words: intracerebral hemorrhage; gene; differential expression; neurological function; brain tissue water content; bioinformatics

Funding: Guangxi Education Department Project for Improving the Scientific Research Basic Ability of Young and Middle-aged Teachers in Universities, No. 2020KY07015 (to GYG); Self-financed Scientific Research Project of Guangxi Zhuang Autonomous Region Health Commission, No. 20210943 (to GYG); Guangxi Traditional Chinese Medicine Key Discipline Construction Project, No. GZXK-Z-20-47; Guangxi Medical and Health Key Cultivation Discipline Construction Project, No. [2021]8

How to cite this article: GAO YG, ZHONG J, HUANG DQ, MA YJ, LIAO YX, LIU QQ. Sequencing, verification and functional analysis of differentially expressed genes in brain tissue of a rat model with acute intracerebral hemorrhage. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2024;28(20):3182-3189.

0 引言 Introduction

脑出血作为中国老龄患者致残率、致死率最高的疾病之一^[1],随着中国社会的老龄化进程加快,其发病率逐渐升高。脑出血的发生发展使患者会遗留肢体偏瘫、不能自主进食、不能行走等症状,失去生活自理能力,降低了老龄患者的生活质量;同时,患者往往需要反复往返于医院就诊,对患者的家庭也造成精神和经济负担^[2]。目前,大多数急性脑出血的治疗采取外科治疗为主及内科治疗(包括止血、脱水降颅内压、保护神经、康复训练等),经过这些治疗在一定程度上降低了病死率,但对患者的长期预后[90 d时主要结局:改良 Rankin 量表(mRS)评分]的改善效果仍不十分理想^[3]。因此,研究其发病机制和治疗靶点对开发新药、采取有针对性的治疗措施、提高生存率至关重要。转录组测序(RNA-Seq)是研究组织细胞在特定状态下所能转录出来的所有 mRNA,从而准确地分析基因表达差异、基因结构变异。

近年来,转录组测序技术被运用于脑血管疾病研究中,尤其运用于脑梗死疾病的相关基因分析^[4-5],但在脑出血的研究中甚少^[6-9]。生物信息学分析已成为医学研究领域的重要组成部分,也成为了近年来医学研究的热点,生物信息学分析涉及计算机学、统计学、生物学等学科,使用软件工具收集生物数据,再使用生物计算机算法处理、分析数据,分析出来的结果可为研究疾病的关键基因、发病机制、治疗靶点提供生物学依据。转录组测序技术和生物信息学的快速发展为研究脑血管疾病的靶基因提供了新的契机,可运用于分析急性脑出血中差异性基因,对开发新药、采取有针对性的治疗措施具有重要意义。此次研究利用转录组测序技术筛选急性脑出血脑组织中差异表达的基因,运用 qPCR 进一步验证,并分析这些基因与脑出血后神经功能、脑组织含水量的关系,并进行 GO、KEGG 富集分析,为寻找治疗脑出血相关的靶基因提供依据。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 转录组测序技术筛选差异基因及功能分析。

1.2 时间及地点 实验于 2021 年 3 月至 2022 年 6 月在广西中医药大学第一附属医院实验室及上海解觉基因科技有限公司完成。

1.3 材料

1.3.1 实验材料、器械 TaqMan MicroRNA Assays(20x)(赛默飞); Trizol(Invitrogen, Cat.No.1596-026); TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit(Invitrogen, Cat.No.4366596); 胶原蛋白酶(美国 Sigma 公司, Cat.No.50190619); Dnase/RNase-FREE Water(Roche, Cat.No.11119915001); 5 μ L 微量注射器、脑立体定位仪(成都仪器厂, ST-4ND); PCR 仪(Roche, LightCycler 480® II); 离心机(Thermo, Micro17R); 组织研磨仪(武汉赛维尔生物有限科技公司, KZ-III-F)。

1.3.2 实验动物及分组 从长沙市天勤生物技术有限公司购入健康 4 月龄的 SPF 级 SD 大鼠 78 只,其中雄性 39 只,雌性 39 只,体质量(503 $\pm$ 24) g,许可证号为 SCXK 湘 2019-001。饲养温度为 23–26 $^{\circ}$ C,湿度 44%–55%,光照时长 9: 00–17: 00。

实验动物饲养于广西中医药大学动物实验中心,该项目的实验方案通过广西中医药大学伦理委员会审批,伦理号为 DW20201011-77。

78 只 SPF 级 SD 大鼠采用 SPSS 23.0 产生随机序列随机分出 2 组:脑出血组 39 只,其中雄性 19 只,雌性 20 只,体质量(502 $\pm$ 25) g,注射胶原酶构建脑出血模型;假手术组 39 只,雄性 20 只,雌性 19 只,体质量(505 $\pm$ 23) g,以等量生理盐水代替胶原酶,操作方法同上。2 组大鼠性别和体质量相比差异无显著性意义($P > 0.05$)。

1.4 实验方法

1.4.1 制作模型

脑出血组:术前 4 h 禁食,运用 3% 戊巴比妥钠(45 mg/kg,

腹腔注射)麻醉实验大鼠,麻醉成功后,将大鼠的头部固定在立体定位仪器上,在前囟靠后1 mm,偏右3 mm的位置,相当于右侧尾状核的位置,钻1个小孔,直径约1 mm,使用立体定位仪器上的微量注射器进针6 mm,注射胶原酶0.25 μL (1 μL含有0.2 U胶原酶,注射时间约10 min),注射结束后,停针5 min,再缓慢退针。

假手术组:以等量0.9%氯化钠注射液代替胶原酶,方法同胶原酶脑出血模型。

组织工程实验动物造模过程中的相关问题:

造模目的	筛选急性性脑出血大鼠模型脑组织中差异表达的基因,并筛选关键基因,分析关键基因与脑出血后神经功能、脑组织含水量的关系
模型与所研究疾病的关系	胶原酶脑出血大鼠模型与脑出血病理生理学相近,是脑出血研究较为理想的动物模型
动物品系	SPF级SD大鼠由长沙市天勤生物技术有限公司提供
造模技术描述	麻醉后,将大鼠的头部固定在立体定位仪器上,在前囟靠后1 mm,偏右3 mm的位置,相当于右侧尾状核的位置,钻1个小孔,直径约1 mm,使用立体定位仪器上的微量注射器进针6 mm,注射胶原酶0.5 U(约10 min),注射结束后,停针5 min,再缓慢退针
造模主要诱导用药	胶原酶
动物数量及分组方法	78只大鼠被随机分为脑出血组和假手术组,每组39只
造模成功评价指标	通过大鼠脑组织病理观察及神经功能缺损评分进行评价
造模后实验观察指标	①大鼠脑组织的苏木精-伊红染色观察、脑组织含水量及神经功能评分;②脑组织差异基因筛选结果;③验证关键基因在各组脑组织中的表达;④关键基因与脑组织含水量的关系;⑤关键基因与神经功能缺损评分的关系
造模后动物处理	神经功能缺损评分后,麻醉大鼠取出右侧尾状核脑组织,进行后续指标检测
伦理委员会批准	实验方案经广西中医药大学伦理委员会审批(批准号为DW20201011-77)

1.4.2 神经功能缺损评分 造模24 h后,对实验大鼠进行神经功能缺损评分。参照Longa评分标准:4分为大鼠无法行走,意识障碍;3分为中度神经功能缺损(大鼠向左侧倾斜);2分为中度神经功能缺损(大鼠行走时向左侧转圈);1分为轻度神经功能缺损(大鼠提尾时左前肢屈曲);0分为神经功能正常。

1.4.3 取脑组织及处理 于造模24 h后,将大鼠麻醉后,胸腔打开,注射针头向心尖置入主动脉,固定针头,将心耳剪开,快速灌注0.9%氯化钠注射液进冲洗,直到引流出的液体没有血水、大鼠上肢苍白,然后使用40 g/L多聚甲醛溶液进行下一步心脏灌注,直到大鼠身体僵硬,迅速开颅,取出右侧尾状核脑组织(包括出血的周边和出血的组织),用液氮和40 g/L多聚甲醛固定液保存,便于后续RNA测序和病理切片观察。

1.4.4 转录组测序分析 随机取2组大鼠各4只脑组织,研磨成浆液,采用TRIzol处理,从脑组织中提取RNA,分析样本的完整性,检测合格后,使用VAHTS Universal V6 RNA-seq Library Prep Kit制备文库,检测文库质量,使用cyanine 3荧光标记引物进行扩增,将双链PCR产物与磁珠结合,并变性,使用IllumiCode序列的RNA微阵列杂交测序。对于检测到的

RNA,进一步使用htseq-count软件剔除比对质量低于10的reads,并计算RNA表达count矩阵。过滤掉在多数样本中不表达的基因,并进行标准化,进行最后的测序数据分析。

1.4.5 苏木精-伊红染色观察 每组取5只大鼠脑组织,固定脑组织,运用乙醇脱水,加入二甲苯和无水乙醇,脑组织呈现透明状态,采用石蜡包埋脑部组织,再用切片机切成片,再次进行脱蜡,染色,分化、漂洗,脱水,复染,最终用中性树胶封固,使用显微镜200倍镜下观察结果。

1.4.6 PPI网络构建分析和筛选关键基因 采用在线的STRING信息库(<https://cn.string-db.org/>)对上面的基因对应的蛋白做PPI(Protein-Protein Interaction)蛋白间互作图,并将PPI网络数据通过Cytoscape软件进行可视化分析,通过MCC算法,选取关系度排名前面10位的基因作为关键基因。

1.4.7 脑组织含水量 取15只实验大鼠出血半球的脑组织放入烘干箱,烘烤设置为100℃,烘烤的时间为24 h,最后再称干质量。脑组织含水量(%)=(湿质量-干质量)/湿质量×100%。

1.4.8 反转录聚合酶链反应(qPCR) 每组取剩下的15只大鼠的脑组织,进行研磨后,提取总RNA,测定浓度,反转录制备cDNA,将试剂盒中各种成分预混,将RT primer tube从-80℃冰箱中取出并溶解,加入相应的primer,把反应管盖好盖子,放入PCR仪。反应结束后,从电脑自动得出熔解曲线,将电泳仪打开,进行电泳,结束后,关闭电源,取出凝胶,进行染色25 min,染色后,漂洗,最后在凝胶成像系统观察结果并照相,见表1。

表1 | 引物序列及产物长度

Table 1 | Primer sequence and product length

基因	引物序列 (5'-3')	产物长度 (bp)
CXCL8	上游 CTG GTC CAT GCT CCT GCT G	19
	下游 GGA CGG ACG AAG ATG CCT AG	20
SERPINE1	上游 CTC CTC ATC CTG CCT AAG TT	20
	下游 GCC AGG GTT GCA CTA AAC AT	20
TFPI2	上游 GTG GGC TCC GTT CTT GGT C	19
	下游 AAG CAG CCT CCA TAG TTG AAT C	22
CXCR4	上游 GAG CAT GAC GGA CAA GTA CC	20
	下游 TGG ACA ATA GCG AGG TAC CG	20
GDA	上游 TCT GAT GAG TGA ACT TGG CAA C	22
	下游 CAA TGT GCA ATG GAT GCT CCT	21
KCNQ5	上游 CGC CAG AAG CAT TTT GAG A	19
	下游 TGG GAA CTC TTG AGC CGT AG	20
ERICH3	上游 GAA CTA CAT GGA CCA TTC CCA G	22
	下游 GCT ATG CGG CGC TGT TTT AT	20
SCN3B	上游 CCT CCA CTC TCA ATT AAC TGC ACA CCC	27
	下游 CCT GGT TAG CGA GTC TCA GAT CTT C	25
CACNA1E	上游 AGC AGG AAC CGA CAA GGA ACC	21
	下游 GGT GGC CAG GAT CAT GTA CTC	21
CCL20	上游 CGA CTG TTG CCT CTC GTA CA	20
	下游 GAG GAG GTT CAC AGC CCT TT	20
GAPDH	上游 CAG TGG CAA AGT GGA GAT TG	20
	下游 TGC CGT GAG TGG AGT CAT AC	20

1.4.9 功能富集分析 将上述筛选出来的差异表达基因(differentially expressed genes, DEGs)数据运用在线信息库DAVID(<https://david.ncifcrf.gov/>)进行基因(Gene Ontology, GO)本体论分析,同时针对上述基因进行京都基因和基因组在线信息库(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes,

KEGG) 进行基因的功能富集分析。

1.5 主要观察指标 ①大鼠脑组织的苏木精-伊红染色观察、脑组织含水量及神经功能评分; ②脑组织差异基因筛选结果; ③ PPI 网络图构建和筛选关键基因结果; ④验证关键基因在各组脑组织中的表达; ⑤关键基因与脑组织含水量的关系; ⑥关键基因与神经功能缺损评分的关系; ⑦关键基因 GO 和 KEGG 富集分析。

1.6 统计学分析 使用 R 软件包中经验贝叶斯的方法遴选出脑出血的差异基因, 采取 SPSS 23.0 进行分析, 计量资料呈现正态分布, 且方差齐性时, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 *t* 检验。当非正态分布或者方差不齐时, 计量资料用中位数和四分位间距来表示, 数据之间差异比较用 *U* 检验检测, 采用 Pearson 法明确两个因素之间的关系, $P < 0.05$ 表示差异有显著性意义。文章的统计学方法已经经过广西中医药大学生物统计学专家审核。

2 结果 Results

2.1 实验动物数量分析 实验动物分为 2 组共 78 只, 其中脑出血组 39 只大鼠造模后均出现神经功能缺损, 提取脑组织均可见出血灶, 说明造模成功, 所有大鼠进入结果分析。

2.2 脑组织苏木精-伊红染色及含水量、神经功能评分 显微镜 200 倍镜下见: 假手术组脑组织内结构正常、细胞排列整齐、无细胞肿胀, 轮廓清楚, 见图 1A; 脑出血组脑组织出现结构损伤, 可见明显出血灶, 细胞肿胀且轮廓模糊不清, 见图 1B。脑出血组脑组织含水量、神经功能缺损评分高于假手术组 ($P < 0.05$), 见表 2。

表 2 | 两组大鼠的脑组织含水量、神经功能缺损评分比较 ($\bar{x} \pm s$)
Table 2 | Comparison of brain tissue water content and neurological deficit scores in two groups of rats

组别	脑组织含水量 (n=15, %)	神经缺损评分 (n=39)
假手术组	69.03±6.24	0.00±0.00
脑出血组	75.84±5.34	3.52±0.74
t 值	3.68	18.41
P 值	0.001	< 0.001

2.3 差异基因筛选结果 见图 2。脑出血组大鼠的脑组织可见明显出血灶 (图 2A)。PCA 图 (图 2B) 和 UMAP 图 (图 2D) 表示脑出血组和假手术组的样本分开, 两组之间差异明显, 后续的差异基因分析有意义。以 $\log_2FC$ 的绝对值 > 1 和校正 $P < 0.05$ 为标准分析, 经过分析, 总共筛选出 81 个差异基因, 其中包含 8 个表达上调基因和 73 个表达下调基因, 将该数据集差异基因进行可视化 (图 2C, E); 同时根据 $\log_2FC$ 数值大小筛选出排名最靠前的 20 个的差异基因: CXCL8、CCL20、SERPINE1、METTL14、TFPI2、CXCR4、HCN1、GDA、ANO3、KCNQ5、WIF1、KCNJ4、ERICH3、RAB27B、SCN3B、ENC1、SLITRK4、VSTM2A、HNRNPC、CACNA1E, 见表 3。

2.4 PPI 网络图构建和筛选关键基因 将差异基因导入至 STRING 数据库得到一个 PPI 网络图 (图 3A), 通过 MCC 算法选取前 10 个关键基因: CXCL8、SERPINE1、TFPI2、CXCR4、GDA、KCNQ5、ERICH3、SCN3B、CACNA1E、CCL20 (图 3B)。

表 3 | 大鼠脑组织排名前 20 位的差异基因
Table 3 | Top 20 differentially expressed genes in rat brain tissue

基因名	logFC	P 值	表达
CXCL8	5.791 923	0.022 702	up
CCL20	4.888 872	0.002 652	up
SERPINE1	4.506 625	0.001 966	up
METTL14	4.404 280	0.002 077	up
TFPI2	4.301 560	0.003 634	up
CXCR4	4.270 813	0.000 225	up
HNRNPC	4.080 124	0.000 178	up
GDA	-5.602 590	0.000 426	down
ANO3	-5.285 577	0.000 059	down
KCNQ5	-5.253 615	0.000 215	down
WIF1	-5.159 275	0.000 013	down
KCNJ4	-5.132 767	0.000 226	down
ERICH3	-4.869 261	0.000 127	down
RAB27B	-4.861 057	0.000 144	down
SCN3B	-4.859 217	0.000 040	down
ENC1	-4.520 173	0.000 113	down
SLITRK4	-4.364 575	0.000 001	down
VSTM2A	-4.300 983	0.000 240	down
HCN1	-4.284 946	0.000 870	down
CACNA1E	-4.265 009	0.000 045	down

表注: up 表示高表达, down 表示低表达

2.5 qPCR 验证关键基因在各组脑组织中的表达情况 脑出血组的关键基因 GDA、KCNQ5、ERICH3、SCN3B、CACNA1E 低于假手术组 ($P < 0.05$, 图 4A), 脑出血组的关键基因 CXCL8、SERPINE1、TFPI2、CXCR4、CCL20 高于假手术组 ($P < 0.05$, 图 4B)。

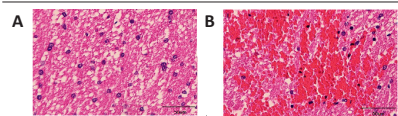
2.6 关键基因与脑组织含水量的关系 脑出血组的脑组织含水量 (75.84 ± 5.34)%, 其中关键基因 GDA、KCNQ5、SCN3B、CACNA1E、ERICH3 与脑组织含水量正相关 (*OR* 值分别是 0.71, 0.61, 0.75, 0.85, 0.78, P 均 < 0.05); 关键基因 CXCL8、SERPINE1、TFPI2、CXCR4、CCL20 含量与脑组织含水量负相关 (*OR* 值分别是: -0.66, -0.64, -0.87, -0.68, -0.82, P 均 < 0.05), 见图 5。

2.7 关键基因与神经功能缺损评分的关系 脑出血组的神经功能缺损评分为 (3.52 ± 0.74) 分, 其中关键基因 GDA、KCNQ5、SCN3B、CACNA1E、ERICH3 与神经功能缺损评分正相关 (*OR* 值分别是: 0.71, 0.60, 0.72, 0.78, 0.71, P 均 < 0.05); 关键基因 CXCL8、SERPINE1、TFPI2、CXCR4、CCL20 含量与神经功能缺损评分负相关 (*OR* 值分别是: -0.72, -0.60, -0.75, -0.74, -0.80, P 均 < 0.05), 见图 6。

2.8 GO 和 KEGG 富集分析结果 见图 7, 表 4, 5。

2.8.1 GO 分析 生物过程 (biological processes, BP): DEGs 主要富集于白细胞趋化性 (leukocyte chemotaxis)、趋化因子介导的信号通路 (chemokine-mediated signaling pathway)、血管创伤的调节 (regulation of vascular wound); 细胞组成 (cellular components, CC): DEGs 主要富集于阳离子通道复合物 (cation channel complex)、离子通道复合物 (ion channel complex)、跨膜转运蛋白复合物 (transmembrane transporter complex); 分子功能 (molecular functions, MF): DEGs 主要富集于门控通道活动 (gated channel activity)、离子通道的活动 (ion channel activity)、通道的活性 (channel activity)。

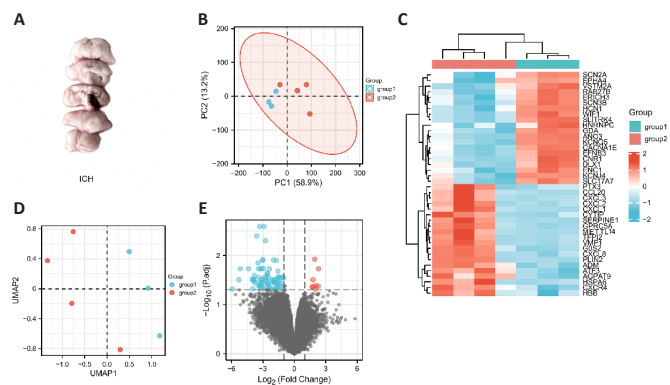
2.8.2 KEGG 通路富集分析 DEGs 集中于 TNF 信号通路 (TNF signaling pathway), 谷氨酸能突触 (Glutamatergic synapse)、GABA 能突触 (GABAergic synapse)。



图注：图 A 为假手术组，脑组织内结构正常；B 为脑出血组，可见脑组织结构损伤及明显的出血灶

图 1 | 两组大鼠的脑组织苏木精-伊红染色图 (×200)

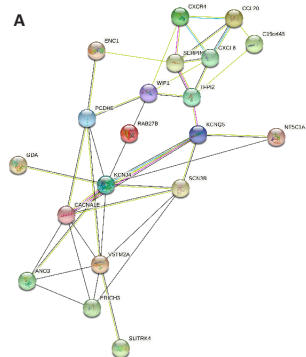
Figure 1 | Hematoxylin-eosin staining of rat brain tissue in two groups (×200)



图注：图 A 为脑出血模型脑组织；图 B、D 为样本聚类情况，蓝色代表 group1 为假手术组，红色代表 group2 为脑出血组，PC 图体现 13.2% 差异，表明数据存在较大的差异，UMAP 图红点和蓝点离散程度大，代表 2 个组之间存在差异；图 C 为热图，group1 为假手术组，group2 为脑出血组，纵坐标表示基因，蓝色代表基因下调，红色代表基因上调；图 E 为火山图，蓝色为差异下调的基因，红色为差异上调的基因

图 2 | 大鼠数据样本的处理和差异基因的筛选

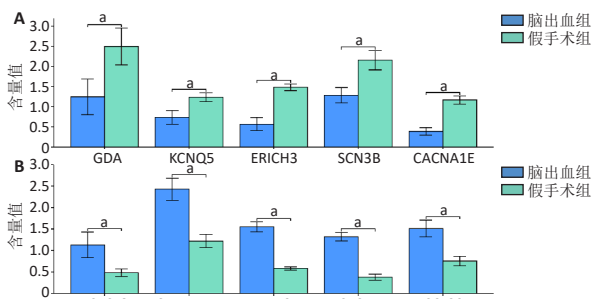
Figure 2 | Processing of rat data samples and screening of differentially expressed genes



图注：图 A 为将差异基因导入至 STRING 数据库得到一个 PPI 网络图；B 为选取的前 10 个关键基因

图 3 | 大鼠脑组织 PPI 网络图构建和筛选关键基因

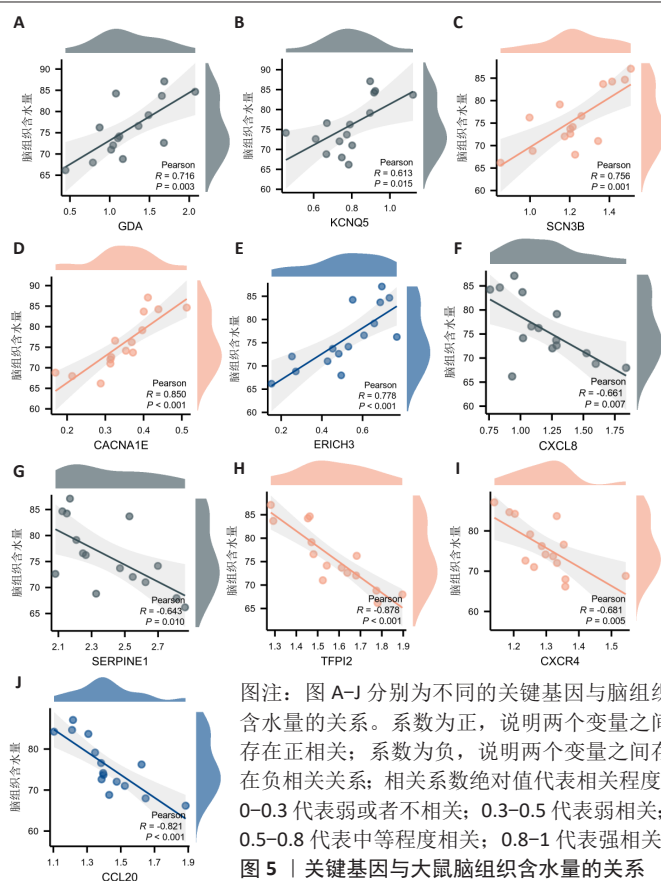
Figure 3 | Construction of protein-protein interaction network and screening of key genes in rat brain tissue



图注：^a $P < 0.001$

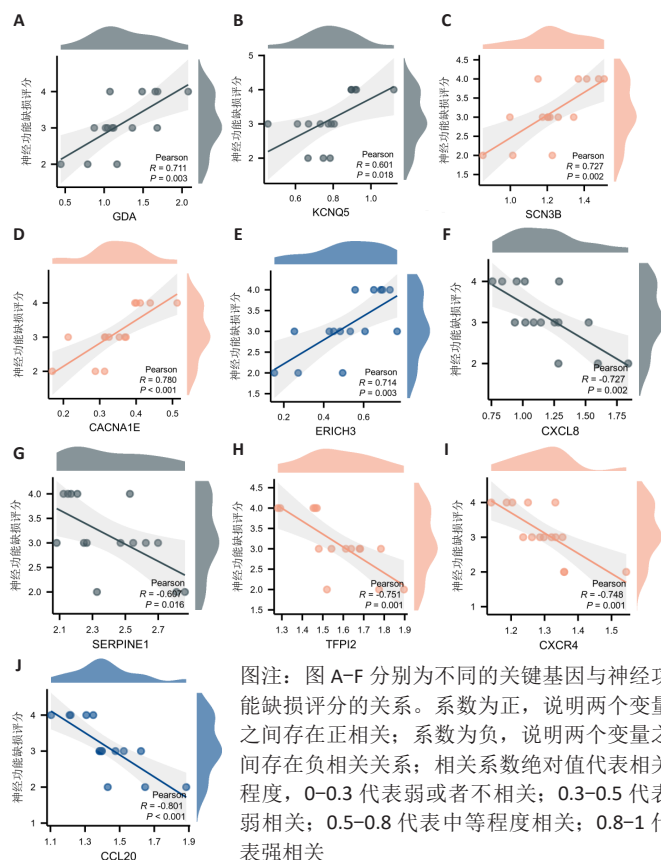
图 4 | 关键基因在 2 组大鼠脑组织中的表达情况

Figure 4 | Expression of key genes in rat brain tissue



图注：图 A-J 分别为不同的关键基因与脑组织含水量的关系。系数为正，说明两个变量之间存在正相关；系数为负，说明两个变量之间存在负相关关系；相关系数绝对值代表相关程度，0-0.3 代表弱或者不相关；0.3-0.5 代表弱相关；0.5-0.8 代表中等程度相关；0.8-1 代表强相关

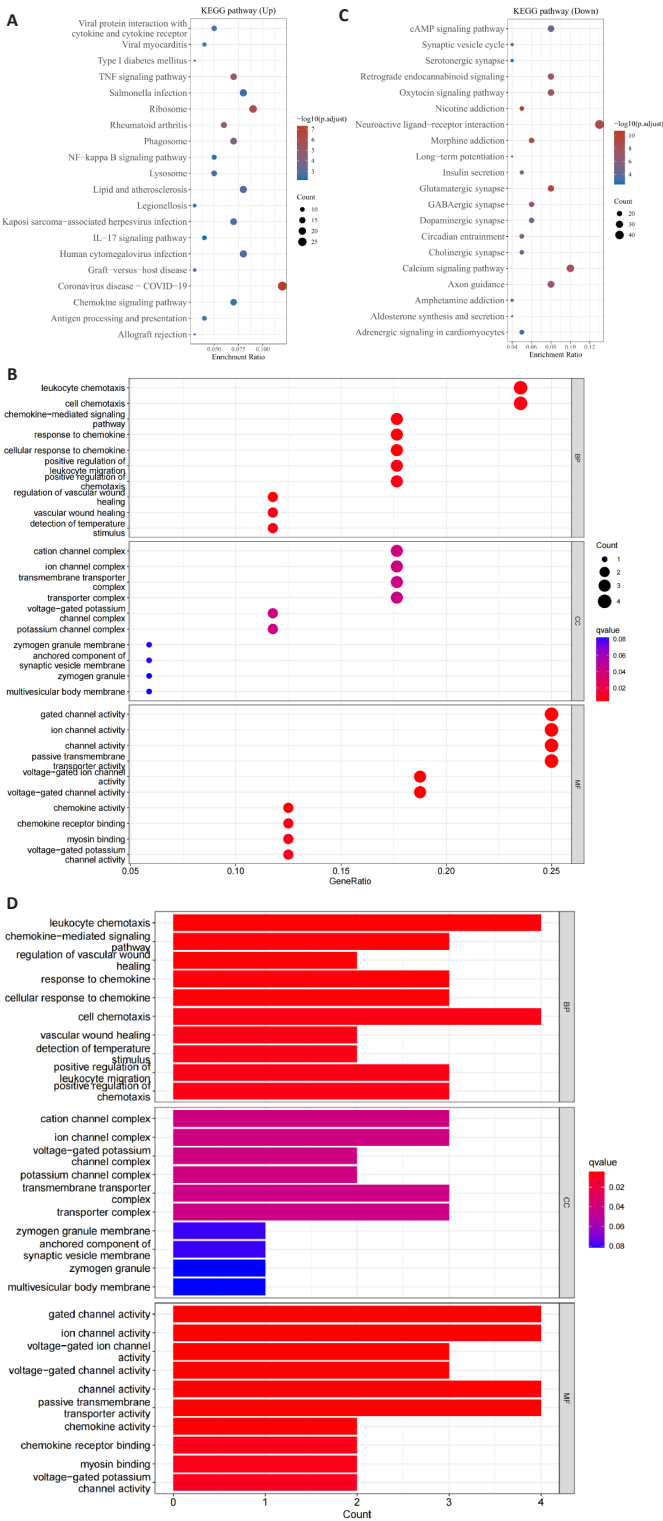
Figure 5 | Relationship between key genes and brain tissue water content in rats



图注：图 A-F 分别为不同的关键基因与神经功能缺损评分的关系。系数为正，说明两个变量之间存在正相关；系数为负，说明两个变量之间存在负相关关系；相关系数绝对值代表相关程度，0-0.3 代表弱或者不相关；0.3-0.5 代表弱相关；0.5-0.8 代表中等程度相关；0.8-1 代表强相关

图 6 | 关键基因与大鼠神经功能缺损评分的关系

Figure 6 | Relationship between key genes and neurological deficit scores in rats



图注：图 A，C 分别为 KEGG 上调基因和下调基因富集通路图；图 B，D 分别为 GO 上调基因和下调基因富集功能图。横坐标是富集在该通路/功能富集的基因占总基因的百分比，纵坐标代表 KEGG/GO 的条目，圆圈大小代表富集在该通路/功能的基因数量，颜色代表 $-\log_{10}(P)$ 值大小
Figure 7 | GO and KEGG enrichment analysis of key genes in rat brain tissue

3 讨论 Discussion

脑卒中是全球范围内死亡率较高的十大疾病之一，在西方国家脑出血约占急性脑卒中的 15%^[10]，在中国，脑出血的发病比例更高，占脑卒中的 18.8%–47.6%^[11]。在急性期的 30 d 内，脑出血患者病死率较高，较为少数的患者在 6 个月能恢

表 4 | 大鼠脑组织差异基因的 KEGG 富集分析结果
Table 4 | KEGG enrichment analysis of differentially expressed genes in rat brain tissue

KEGG ID	注解	富集基因数目	P 值
hsa03010	Ribosome(核糖体)	21/242	< 0.01
hsa04668	TNF signaling pathway(TNF 信号通路)	16/242	< 0.01
hsa05323	Rheumatoid arthritis(类风湿性关节炎)	14/242	< 0.01
hsa04145	Phagosome(吞噬体)	17/242	< 0.01
hsa05332	Graft-versus-host disease(移植植物抗宿主病)	8/242	< 0.01
hsa05033	Nicotine addiction(尼古丁成瘾)	17/329	< 0.01
hsa04724	Glutamatergic synapse(谷氨酸能突触)	25/329	< 0.01
hsa04080	Neuroactive ligand-receptor interaction (神经活性配体-受体相互作用)	43/329	< 0.01
hsa05032	Morphine addiction(吗啡成瘾)	21/329	< 0.01
hsa04727	GABAergic synapse(GABA 能突触)	20/329	< 0.01

表注：分析中只列出 P 值排名前 10 的条目

表 5 | 大鼠脑组织差异基因的 GO 富集分析结果
Table 5 | GO enrichment analysis of differentially expressed genes in rat brain tissue

分	GO 号	注解	富集基	P 值
类			数因	
BP	GO: 0030595	白细胞趋化性(leukocyte chemotaxis)	4	< 0.01
BP	GO: 0070098	趋化因子介导的信号通路 (chemokine-mediated signaling pathway)	3	< 0.01
BP	GO: 0061043	血管创伤的调节(regulation of vascular wound)	3	< 0.01
BP	GO: 1990868	对趋化因子的反应(response to chemokine)	3	< 0.01
BP	GO: 1990869	细胞对趋化因子的反应 (cellular response to chemokine)	3	< 0.01
CC	GO: 0034703	阳离子通道复合物(cation channel complex)	3	< 0.01
CC	GO: 0034702	离子通道复合物(ion channel complex)	3	< 0.01
CC	GO: 0008076	跨膜转运蛋白复合物 (transmembrane transporter complex)	3	< 0.01
CC	GO: 0034705	转运蛋白复合物(transporter complex)	2	< 0.01
CC	GO: 1902495	电压门控钾通道综合体 (voltage-gated potassium channel complex)	2	< 0.01
MF	GO: 0022836	门控通道活性(gated channel activity)	4	< 0.01
MF	GO: 0005216	离子通道的活性(ion channel activity)	4	< 0.01
MF	GO: 0005244	通道的活性(channel activity)	3	< 0.01
MF	GO: 00022803	被动跨膜转运蛋白活性 (passive transmembrane transporter activity)	3	< 0.01
MF	GO: 0008009	电压门控离子通道活性 (voltage-gated ion channel activity)	4	< 0.01

表注：分析中只列出各组 P 值排名前 5 的条目。BP：生物学过程；CC：细胞组分；MF：分子功能

复正常的生活起居自理能力^[2]，目前脑出血的治疗效果仍不十分理想^[3]，因此，研究脑出血的发病机制和治疗靶点至关重要。生物信息学是信息技术和分子生物学的结合体，通过研究各种各样的生物信息学数据，通过计算机对庞大的数据和错综复杂的数据进行处理、编辑、筛选，充分挖掘网络信息数据库的信息，对核酸序列、蛋白序列、表达谱进行分析，阐明基因的基本信息和生物学功能，对进一步深入研究和靶点药物的开发有重要的指导意义。

在此次研究中，经过差异性对比分析，筛选出 81 个差异基因，其中包含 8 个表达上调基因和 73 个表达下调基因，其中排名前 20 位的基因是 CXCL8、CCL20、SERPINE1、METTL14、TFPI2、CXCR4、HCN1、GDA、ANO3、KCNQ5、WIF1、KCNJ4、ERICH3、RAB27B、SCN3B、ENC1、SLITRK4、VSTM2A、HNRNPC、CACNA1E。这些基因的 GO 分析表明生物过程主要富集于白细胞趋化性、趋化因子介导的信号通路、血管创伤的调节，这可能是与脑出血后血管内皮细胞损伤、

血管内生长因子增多,同时释放大量的趋化炎症因子有关^[12-13]。细胞组成方面:DEGs 主要富集于阳离子通道复合物、离子通道复合物、跨膜转运蛋白复合物,这可能是与脑出血后血红蛋白降解,产生铁离子,加重脑损伤,同时,脑组织神经细胞 Na^+ 和 K^+ 的聚积有关^[14-15]。分子功能方面:DEGs 主要富集于门控通道活动、离子通道的活动、通道的活性,这可能与脑出血后血肿体积增加、形成梯度静水压,钙离子内流增加,钙离子通道活性增加有关^[16-17]。KEGG 通路富集分析中,DEGs 集中于 TNF 信号通路,谷氨酸能突触、GABA 能突触。TNF 信号通路包括很多信号分子,如 TNF- α , 这条信号通路参与炎症反应,是评估机体炎症水平的评估指标。研究表明,急性脑出血发生后, TNF 因子会急剧升高,且 TNF 因子的水平与脑出血患者的神经功能损伤程度正相关^[18-19]。GABA 和谷氨酸是脑组织的重要神经递质, GABA 与突触后膜的特异性受体结合之后,促进氯离子跨膜转运,降少神经元的放电,对细胞的兴奋性有抑制作用,然而谷氨酸主要是激活 N- 甲基-D- 天冬氨酸型受体,改变钠离子和钾离子的通透性,导致钙离子内流,进一步诱发兴奋性突触后电流,在脑出血后,脑脊液的 GABA 含量会减少,谷氨酸含量会增加^[20-21],上述的基因主要富集在上述的通路中,与脑出血的发病过程中炎症因子增多、神经递质 GABA 和谷氨酸变化密切相关。

此项目的研究也证实脑出血后脑组织的 GDA、KCNQ5、ERICH3、SCN3B、CACNA1E 含量会下降, CXCL8、SERPINE1、TFPI2、CXCR4、CCL20 含量会升高; 其中 GDA、KCNQ5、ERICH3、SCN3B、CACNA1E 含量与脑组织含水量、神经功能缺损评分正相关 (P 均 < 0.05)。GDA 是一种天冬氨酸甘油酯,存在于大脑皮质、海马以及三叉神经节和脊神经的神经元中^[22], GDA 可调节细胞增殖和细胞周期,调控 STAT3/NF- κ B 信号通路形成细胞的增殖和炎症,引起炎性水肿,并增加白细胞介素和趋化因子配体 -CCL20 的分泌^[23]。KCNQ5 通过电压门控通道控制钾离子,调控特定神经元群体的兴奋性^[24-25], KCNQ5 影响神经功能可能与调节神经兴奋性有关。ERICH3 在中枢神经系统细胞中高度表达,免疫荧光显示 ERICH3 与 5-HT 在囊泡样结构中定位, ERICH3 可能在 5- 羟色胺能和其他神经元细胞类型的囊泡功能中发挥重要作用^[26]。SCN3B 是突触相关基因,其发生变化时,神经功能也随之变化^[27],可见 SCN3B 影响神经功能可能与突触相关^[28]。CACNA1E 基因调控电压门控通道控制钙离子内流,调控突触传递作用进而影响神经功能^[29],脑出血发生后, CACNA1E 会影响钙离子内流,抑制钙离子通道的活性,形成梯度静水压,血肿体积增加^[30]。CXCL8、SERPINE1、TFPI2、CXCR4、CCL20 含量与脑组织含水量、神经功能缺损评分负相关 (P 均 < 0.05)。CXCL8 又称为白细胞介素 8,是趋化因子的一种细胞因子,是巨噬细胞和上皮细胞等分泌的细胞因子,通过与其特异性受体进行结合,趋化中性粒细胞,激活 PI3K-AKT 信号通路,参加炎症反应;此外, CXCL8 还有很强的促进血管生成作用;脑出血后, CXCL8 会升高,参与炎症反应,加重神经功能损伤^[31-32]。SERPINE1 又

称为人纤溶酶原激活物抑制剂,此基因是组织纤溶酶原激活物和尿激酶的主要抑制剂,是纤维蛋白溶解的抑制剂^[22];脑出血后, SERPINE1 会发生异常,大量凝血酶产生,血脑屏障的通透性受损,形成脑水肿^[33]。TFPI2 是一种血管生成抑制剂^[34],当 TFPI2 被敲除时,血管生成能力增加,其可能通过抑制脑出血后血管修复来影响神经功能。CXCR4 调节活性氧中介物 (ROS)^[35],活性氧直接调控细胞存活和死亡,进而影响神经细胞的稳态,影响神经功能,同时活性氧是血脑屏障分解的关键介质,脑出血后,活性氧可破坏血脑屏障的紧密连接,增加脑血屏障的通透性,诱发了脑水肿^[36]。目前国内对脑出血的转录组测序研究较少^[7-9],国内的转录组测序分析主要是针对 miRNA、肠道菌群及白细胞单细胞测序分析为主,与此次研究项目不同,此次项目针对 mRNA 进行转录组分析,得出脑出血差异表达的基因。

综上,此研究明确了急性脑出血中存在差异表达的基因为 CXCL8、SERPINE1、TFPI2、CXCR4、GDA、KCNQ5、ERICH3、SCN3B、CACNA1E、CCL20,这些基因与脑出血后脑组织含水量、神经功能相关,这些基因主要富集在细胞组分、结合功能、细胞突起等相关的生物学功能上。但此研究也有一定不足之处,由于经费有限,所选取的转录组测序的样本例数略少,故结合 PCR 检测再次验证差异基因的表达;文章对脑出血脑组织差异基因的细胞组分、结合功能、细胞突起等相关生物学功能,仅仅从生物信息学分析,有待实验进一步验证。望今后能开展大样本数据、多实验标本的研究以及单细胞测序分析,进一步分析及验证差异基因的生物学功能

作者贡献: 文章撰写、课题设计由高玉广主治医师完成,审核校对由钟洁副主任医师完成,实验指导和开展并负责落实实验整个进程由黄德庆完成,神经功能评估时实施了双盲法评估,由黄德庆和钟洁完成,资料收集、数据分析由马玉娟硕士研究生完成,动物造模和 PCR 检测由廖煜雄和刘琦琦硕士研究生完成,转录组测序分析由上海解觉基因科技有限公司完成。

利益冲突: 文章的全部作者声明,在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章,根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享 4.0”条款,在合理引用的情况下,允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展,同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献,并为之建立索引,用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

版权转让: 文章出版前全体作者与编辑部签署了文章版权转让协议。

出版规范: 文章撰写遵守了《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。文章经小同行外审专家双盲外审,同行评议认为文章符合期刊发表宗旨。

4 参考文献 References

- [1] PUY L, PARRY-JONES AR, SANDSET EC, et al. Intracerebral haemorrhage. Nat Rev Dis Primers. 2023;9(1):14.
- [2] COCHRANE A, CHEN C, STEPHEN J, et al. Antithrombotic treatment after stroke due to intracerebral haemorrhage. Cochrane Database Syst Rev. 2023;1(1):CD012144.

- [3] CHENG Z, ZHANG W, ZHAN Z, et al. Cerebral small vessel disease and prognosis in intracerebral haemorrhage: A systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Eur J Neurol.* 2022;29(8):2511-2525.
- [4] DIANQUAN ZHANG, GUOLIANG CAI, KAI LIU, et al. Microglia exosomal miRNA-137 attenuates ischemic brain injury through targeting Notch1. *Aging(Albany NY).* 2021;13(3):4079-4095.
- [5] MOVAHED M, BROCKIE S, HONG J, et al. Transcriptomic Hallmarks of Ischemia-Reperfusion Injury. *Cells.* 2021;10(7):1838.
- [6] ROSELL A, VILALTA A, GARCÍA-BERROCOSO T, et al. Brain perihematoma genomic profile following spontaneous human intracerebral hemorrhage. *PLoS One.* 2011;6(2):e16750.
- [7] 万志刚. 基于大鼠脑出血高通量测序的 miRNA 表达谱生物信息学分析 [D]. 南昌: 南昌大学, 2018.
- [8] 李裕思, 许华冲, 王俊月, 等. 16S rRNA 基因测序技术分析肝阳上亢型脑出血患者的肠道菌群结构 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2019, 25(8):83-88
- [9] 张萌. 血液白细胞单细胞转录组测序解析高血压脑出血的发病机制 [D]. 北京: 北京协和医学院, 2021.
- [10] TSIVGOULIS G, PATOUSI A, PIKILIDOU M, et al. Stroke Incidence and Outcomes in Northeastern Greece: The Evros Stroke Registry. *Stroke.* 2018;49(2):288-295.
- [11] 中华医学会神经病学分会. 中国脑出血诊治指南 (2019) [J]. *中华神经科杂志*, 2019,52(12):994-1006.
- [12] MAGID-BERNSTEIN J, GIRARD R, POLSTER S, et al. Cerebral Hemorrhage: Pathophysiology, Treatment, and Future Directions. *Circ Res.* 2022; 130(8):1204-1229.
- [13] PUY L, PERBET R, FIGEAC M, et al. Brain Peri-Hematoma Area, a Strategic Interface for Blood Clearance: A Human Neuropathological and Transcriptomic Study. *Stroke.* 2022;53(6):2026-2035.
- [14] LIU H, HUA Y, KEEP RF. Brain Ceruloplasmin Expression After Experimental Intracerebral Hemorrhage and Protection Against Iron-Induced Brain Injury. *Transl Stroke Res.* 2019;10(1):112-119.
- [15] HALCROW PW, LYNCH ML, GEIGER JD, et al. Role of endolysosome function in iron metabolism and brain carcinogenesis. *Semin Cancer Biol.* 2021;76:74-85.
- [16] LIU J, LI Q, REN J, et al. Association of Sex with Serum Potassium, Sodium, and Calcium Disorders after Hypertensive Intracerebral Hemorrhage. *World Neurosurg.* 2020;141:e367-e373.
- [17] KITAMURA M, TATEISHI Y, SATO S, et al. Association between serum calcium levels and prognosis, hematoma volume, and onset of cerebral hemorrhage in patients undergoing hemodialysis. *BMC Nephrol.* 2019;20(1):210.
- [18] LI L, QI C, LIU Y, et al. MicroRNA miR-27b-3p regulate microglial inflammation response and cell apoptosis by inhibiting A20 (TNF- α -induced protein 3). *Bioengineered.* 2021;12(2):9902-9913.
- [19] 龚浩, 郑波, 何俊, 等. 急性脑出血病人血清 TNF- α 、TGF- β 1、ICAM-1 水平与神经功能损伤及预后的相关性 [J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2021,19(13):2264-2267
- [20] LEIRA R, CASTELLANOS M, ALVAREZ-SABÍN J, et al. Headache in cerebral hemorrhage is associated with inflammatory markers and higher residual cavity. *Headache.* 2005;45(9):1236-1243.
- [21] 宋春旺, 田军, 李国英, 等. 右美托咪定在危重高血压脑出血患者开颅术后的应用研究 [J]. *河北医药*, 2020,42(21):3205-3208+3213
- [22] ORDRONNEAU P, WOODLEY JC, GROSSMAN G, et al. Characterization of an antiserum to glycyl-d-aspartate (GDA) and its use as a probe for endogenous N-methyl-d-aspartate (NMDA)-like compounds. *Mol Cell Neurosci.* 1992;3(3):259-266.
- [23] LI X, CHEN F, JU J, et al. Long Non-Coding RNA-GDA-1 Promotes Keratinocyte Proliferation and Psoriasis Inflammation by Regulating the STAT3/NF- κ B Signaling Pathway via Forkhead Box M1. *Inflammation.* 2023. doi: 10.1007/s10753-023-01800-x.
- [24] KRÜGER J, SCHUBERT J, KEGELE J, et al. Loss-of-function variants in the KCNQ5 gene are implicated in genetic generalized epilepsies. *EBioMedicine.* 2022;84:104244.
- [25] NAPPI M, BARRESE V, CAROTENUTO L, et al. Gain of function due to increased opening probability by two KCNQ5 pore variants causing developmental and epileptic encephalopathy. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2022;119(15):e2116887119.
- [26] LIU D, ZHUANG Y, ZHANG L, et al. ERICH3: vesicular association and antidepressant treatment response. *Mol Psychiatry.* 2021;26(6): 2415-2428.
- [27] HAN Y, CHEN L, LIU J, et al. A Class I HDAC Inhibitor Rescues Synaptic Damage and Neuron Loss in APP-Transfected Cells and APP/PS1 Mice through the GRIP1/AMPA Pathway. *Molecules.* 2022;27(13):4160.
- [28] DONG Y, CHEN Y, YAO B, et al. Neuropathologic damage induced by radiofrequency ablation at different temperatures. *Clinics (Sao Paulo).* 2022;77:100033.
- [29] WANG Y, TIAN Y, ZHAO J, et al. Effect of electroacupuncture on gene expression in calcium signaling pathway in hippocampal cells in mice with cerebral ischemia reperfusion. *J Tradit Chin Med.* 2017;37(2): 252-260.
- [30] 郭廷旺, 郝石磊, 王伯初. 力学通道蛋白 Piezos 在脑出血后静水压传导过程中的作用 [J]. *医用生物力学*, 2019,34(S1):174
- [31] ZHANG J, ZHANG X, SHANG Y, et al. Effect of Cinepazide Maleate on Serum Inflammatory Factors of ICU Patients with Severe Cerebral Hemorrhage after Surgery. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2021;2021:6562140.
- [32] ZHOU X, CHEN J, WANG C, et al. Anti-inflammatory effects of Simvastatin in patients with acute intracerebral hemorrhage in an intensive care unit. *Exp Ther Med.* 2017;14(6):6193-6200.
- [33] ZHANG W, ZHAO W, GE C, et al. Scopolestin Attenuates Intracerebral Hemorrhage-Induced Brain Injury and Improves Neurological Performance in Rats. *Neuroimmunomodulation.* 2021;28(2):74-81.
- [34] KREMER V, BINK DI, STANICEK L, et al. MEG8 regulates Tissue Factor Pathway Inhibitor 2(TFPI2) expression in the endothelium. *Sci Rep.* 2022;12(1):843.
- [35] LUO L, ZANG G, LIU B, et al. Bioengineering CXCR4-overexpressing cell membrane functionalized ROS-responsive nanotherapeutics for targeting cerebral ischemia-reperfusion injury. *Theranostics.* 2021; 11(16):8043-8056.
- [36] PUN PB, LU J, MOOCHHALA S. Involvement of ROS in BBB dysfunction. *Free Radic Res.* 2009;43(4):348-364.

(责任编辑: WZH, ZN, WL, LCH)