

ERCC1、SYK、GNAS在急性缺血性脑卒中中的 生物信息学分析及机制验证

郑建彪¹ 张金彪^{2*} 冯娜娜³¹河北省沧州中西医结合医院, 脑病二科, 沧州 061000; ²河北省沧州中西医结合医院, 检验科, 沧州 061000; ³河北省沧州中西医结合医院, 科教科, 沧州 061000)

摘要 急性缺血性脑卒中(acute ischemic stroke, AIS)的核心病理生理特征为脑血流急性中断导致的局部脑组织缺血缺氧和神经元损伤, *ERCC1*、*SYK*和*GNAS*分别参与DNA损伤修复、免疫炎症应答及G蛋白信号转导, 均与AIS病理过程密切相关, 但三者AIS中的协同表达特征及整合调控机制尚不清楚。该研究通过整合GEO数据库(GSE37587、GSE140275)及GeneCards数据库中的AIS患者基因表达谱数据, 采用生物信息学方法筛选差异表达基因(differentially expressed genes, DEGs), 并进行GO/KEGG通路富集分析、免疫细胞浸润分析及多层次调控网络构建, 同时结合GTEx数据库探讨目标基因与血栓相关分子标志物的相关性, 进一步通过建立大鼠大脑中动脉闭塞(MCAO)模型, 开展体内实验对上述生信分析结果进行验证。结果共鉴定出14个AIS相关关键DEGs, GO/KEGG分析显示, 这些基因主要参与DNA损伤修复、免疫调控及G蛋白偶联信号通路等生物学过程。TIMER数据库分析显示, 3个目标基因*ERCC1*、*SYK*及*GNAS*与免疫浸润程度呈显著相关性($P<0.05$); GTEx分析进一步提示其与多种血栓形成相关分子标志物存在调控关系。多层次网络分析识别出靶向*ERCC1*/*GNAS*的转录因子5个(MXD3、KLF9、DPF2、MAZ、ATF1)、靶向*GNAS*/*SYK*的转录因子3个(KLF4、SUZ12、EZH2), 以及同时靶向*ERCC1*、*SYK*和*GNAS*的miRNA 6个(hsa-miR-7-5p、hsa-miR-15a-5p、hsa-miR-18a-5p、hsa-miR-218-5p、hsa-let-7a-5p、hsa-let-7b-5p); 蛋白互作分析显示UBC为三者唯一共同互作蛋白, CALM1为*SYK*与*GNAS*共同互作蛋白。动物实验显示, 与对照组相比, MCAO模型组大鼠在术后24 h神经功能缺损评分明显升高, 脑梗死体积显著增加($P<0.001$), HE染色可见典型的缺血性病理改变(神经元空泡变性、炎性浸润)。Western blot结果显示, 与对照组相比, 模型组大鼠脑组织中*ERCC1*、*SYK*及*GNAS*蛋白表达水平均显著升高($P<0.001$)。以上结果表明, *ERCC1*、*SYK*和*GNAS*在AIS中协同上调, 三者通过调控免疫炎症、DNA修复及血管稳态等机制参与AIS的病理生理过程。

关键词 急性缺血性脑卒中; *ERCC1*; *SYK*; *GNAS*; 生物信息学分析; 免疫浸润

Bioinformatics Analysis and Mechanistic Validation of *ERCC1*, *SYK* and *GNAS* in Acute Ischemic Stroke

ZHENG Jianbiao¹, ZHANG Jinbiao^{2*}, FENG Nana³¹Second Department of Neurology, Cangzhou Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Cangzhou 061000, China; ²Department of Laboratory Medicine, Cangzhou Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Cangzhou 061000, China; ³Department of Scientific Research and Education, Cangzhou Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Cangzhou 061000, China)

收稿日期: 2025-12-23

接受日期: 2026-07-20

沧州市自然科学基金(批准号: 23241001012N)资助的课题

*通信作者。Tel: 18031785529, E-mail: zhangjinbiao1_1@163.com

Received: December 23, 2025

Accepted: July 20, 2026

This work was supported by the Cangzhou Municipal Natural Science Foundation (Grant No.23241001012N)

*Corresponding author. Tel: +86-18031785529, E-mail: zhangjinbiao1_1@163.com

Abstract The core pathophysiological feature of AIS (acute ischemic stroke) is local cerebral ischemia/hypoxia and neuronal damage resulting from acute interruption of cerebral blood flow. *ERCC1* (excision repair cross-complementing group 1), *SYK* (spleen tyrosine kinase), and *GNAS* [guanine nucleotide-binding protein G(s) subunit alpha] are involved in DNA damage repair, immune-inflammatory response, and G protein signaling, respectively, and are all closely associated with the pathological process of AIS; however, their co-expression characteristics and integrated regulatory mechanisms in AIS remain unclear. This study integrated gene expression profile data from the GEO databases (GSE37587, GSE140275) and the GeneCards database of AIS patients, employed bioinformatics approaches to screen for DEGs (differentially expressed genes), and performed GO/KEGG pathway enrichment analysis, immune cell infiltration analysis, and multi-layered regulatory network construction. Meanwhile, the correlations between target genes and thrombosis-associated molecular markers were investigated using the GTEx database. Furthermore, a rat model of middle cerebral artery occlusion (MCAO) was established, and *in vivo* experiments were performed to validate the above bioinformatics analysis results. A total of 14 key AIS-related DEGs were identified. GO and KEGG analyses revealed their involvement in DNA damage repair, immune regulation, and G protein-coupled signaling pathways. Literature review confirmed the close association of *ERCC1*, *SYK*, and *GNAS* with AIS pathophysiology. TIMER analysis demonstrated significant correlations between these genes and immune infiltration levels ($P < 0.05$). GTEx further suggested their regulatory relationships with multiple thrombosis-related markers. Multi-layered network analysis identified five transcription factors (MXD3, KLF9, DPF2, MAZ, ATF1) co-targeting *ERCC1* and *GNAS*, and three transcription factors (KLF4, SUZ12, EZH2) co-targeting *GNAS* and *SYK*, as well as six miRNAs (hsa-miR-7-5p, hsa-miR-15a-5p, hsa-miR-18a-5p, hsa-miR-218-5p, hsa-let-7a-5p, hsa-let-7b-5p) commonly targeting all three genes. Protein-protein interaction analysis revealed that UBC was the sole shared interactor among the three proteins, while CALM1 was the shared interactor between SYK and GNAS. Animal experiments showed that, compared to controls, MCAO rats exhibited significantly higher neurological deficit scores at 24 h post-surgery, increased infarct volumes ($P < 0.001$), and typical ischemic pathology (HE staining: neuronal vacuolar degeneration and inflammatory infiltration). Western blot revealed markedly elevated *ERCC1*, *SYK*, and *GNAS* protein levels in MCAO rat brains ($P < 0.001$). These results indicate that *ERCC1*, *SYK*, and *GNAS* are coordinately upregulated in AIS and participate in its pathophysiological process through regulating immune inflammation, DNA repair, and vascular homeostasis.

Keywords acute ischemic stroke; *ERCC1*; *SYK*; *GNAS*; bioinformatics analysis; immune infiltration

急性缺血性脑卒中 (acute ischemic stroke, AIS) 是全球范围内致死和致残的主要原因之一^[1]。世界卫生组织统计数据显示, 脑卒中每年导致超过 1 200 万例死亡和约 5 000 万例长期残疾^[2]。AIS 的高发病率和高致残率使其成为重大公共卫生问题, 尤其在老龄化社会背景下, 其疾病负担日益加重^[3]。AIS 的核心病理生理特征为脑血流急性中断导致的局部脑组织缺血缺氧和神经元损伤。其中, 血栓形成在 AIS 发病机制中扮演着关键角色, 尤其是动脉粥样硬化斑块破裂或血栓栓塞引起的脑血管阻塞^[4]。随着分子生物学技术的发展, 分子标志物在 AIS 早期诊断和干预中得到了广泛关注^[5]。大量研究表明, 多种分子

标志物与 AIS 的发生发展密切相关^[6], 尤其是在血栓形成、炎症反应和细胞凋亡等病理过程中^[7-8]。这些标志物不仅有助于疾病早期诊断, 还为靶向治疗提供了新思路。然而, 目前临床可用的生物标志物仍然有限, 需要进一步研究和验证。

ERCC1 (ERCC excision repair 1, endonuclease non-catalytic subunit)、脾酪氨酸激酶 (spleen tyrosine kinase, SYK) 和 GNAS (guanine nucleotide binding protein, alpha stimulating) 作为参与细胞修复、免疫反应和代谢调控的关键因子, 近年来受到广泛关注。虽然 ERCC1 在 DNA 损伤修复中的作用已被多次研究, 然而其在脑缺血性损伤中的具体机制尚未被完

全阐明^[9]。*SYK*在免疫细胞活化及炎症反应中的作用日益被认可,但其在脑卒中中的潜在机制尚不清晰^[10]。*GNAS*参与的G蛋白信号转导途径与多种神经系统疾病的发生发展相关^[11],但其在AIS中的作用仍缺乏系统研究^[12]。

本研究采用生物信息学方法分析 *ERCC1*、*SYK*和*GNAS*在AIS中的表达特征及作用机制,并通过动物实验进行验证。研究结果有望填补该领域的研究空白,阐明这些分子在急性AIS中的生物学作用,为AIS的早期诊断和靶向治疗提供新的思路 and 依据。

1 材料与方法

1.1 生物信息学分析

1.1.1 GEO数据库差异表达分析 从GEO数据库下载GSE37587数据集(包含34例AIS患者发病后24 h和48 h内的血清基因表达谱)和GSE140275数据集(包含3例AIS患者和3例健康对照者的血清基因表达谱)。为消除数据集间的批次效应,采用ComBat算法对合并后的表达矩阵进行批次校正,以数据集来源作为批次变量。

基于批次校正后的联合表达矩阵,以AIS患者与健康对照为分组变量,使用limma包进行差异表达基因(differentially expressed genes, DEGs)筛选。对于GSE140275的RNA-seq数据,分析前首先将每百万映射读段中每千碱基转录本的片段数(fragments per kilobase of transcript per million mapped reads, FPKM)值进行 $\log_2$ 转换,使用limma-voom方法进行差异表达分析。筛选标准为 $|\log_2(\text{fold change})| \geq 1$ 且校正后 P 值(Benjamini-Hochberg法) < 0.05 。同时整合GeneCards数据库中与疾病相关的基因数据(筛选条件:蛋白编码基因 > 50 个,相关性评分 > 10),最终获得DEGs的交集。

1.1.2 GO/KEGG富集分析 将DEGs列表导入DAVID数据库分析平台(<https://david.ncicrf.gov/>),选取*Homo sapiens*(人类)作为参考基因组背景,分别进行基因本体(Gene Ontology, GO)功能注释和京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)通路富集分析。以 $P < 0.05$ 作为统计学显著性阈值,对分析结果进行系统分类整理并采用可视化方法呈现。

1.1.3 免疫浸润分析 为系统评估目标基因在肿

瘤微环境中的免疫调控作用,本研究采用TIMER数据库(tumor immune estimation resource, <http://timer.cistrome.org/>)进行免疫细胞浸润分析。该数据库基于癌症基因组图谱(The Cancer Genome Atlas, TCGA)的肿瘤转录组数据,通过去卷积算法定量评估六种主要免疫细胞亚群(包括B细胞、 $CD4^+$ T细胞、 $CD8^+$ T细胞、中性粒细胞、巨噬细胞和树突状细胞)的浸润丰度。本研究重点利用TIMER数据库的基因功能模块,探究目标基因表达水平与中性粒细胞、巨噬细胞浸润程度的相关性,采用Spearman秩相关系数进行统计学分析,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

1.1.4 目标基因与血栓标志分子的相关性 为探讨目标基因与血栓形成关键标志物之间的表达调控关系,采用GEPIA2在线分析平台(<http://gepia2.cancer-pku.cn/>),基于GTEx数据库中正常人脑组织的RNA测序表达数据,计算目标基因*ERCC1*、*SYK*、*GNAS*与血栓相关分子[血酶-抗凝血酶复合物(thrombin-antithrombin complex, TAT)、P-选择素(selectin P, CD62P)、血管性血友病因子(von Willebrand factor, vWF)、内皮素-1(endothelin-1, ET1)]的Pearson相关性。采用 $\log_2(\text{TPM}+1)$ 标准化转换后的表达量进行计算,并自动剔除异常值。以Pearson相关系数(r)评估基因表达的相关性程度,以 $P < 0.05$ 为统计学显著阈值。通过散点图形式呈现分析结果,并标注 r 值及 P 值,为后续分子机制研究提供数据支持。

1.1.5 *ERCC1*、*SYK*与*GNAS*的多级调控网络构建 为探究*ERCC1*、*SYK*与*GNAS*之间的潜在调控关系,本研究采用NetworkAnalyst在线平台(<https://www.networkanalyst.ca/>)进行多层次网络分析。以*ERCC1*、*SYK*和*GNAS*的基因符号(gene symbol)作为输入,物种设定为*Homo sapiens*(人类),通过ENCODE ChIP-seq数据库和miRNet数据库分别预测靶向三个基因的转录因子和miRNA,并通过IMEx数据库构建蛋白互作(protein-protein interaction, PPI)网络。

1.2 分组与动物模型构建

1.2.1 实验分组 本研究选取12只健康成年雄性SD(Sprague-Dawley)大鼠[体质量为250~280 g,购自成都达硕实验动物有限公司,生产许可证号:SCXK(川) 2020-030],采用随机数字表法将其分为

以下2组($n=6$), ①对照组: 仅行颈动脉暴露术, 不实施线栓插入干预; ②模型组(MCAO组): 采用线栓法构建大脑中动脉闭塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)模型, 实施90 min缺血后行再灌注处理。

1.2.2 饲养条件 所有实验动物在标准SPF级环境中饲养, 环境参数恒定[(22 ± 2) °C、相对湿度(50 ± 10)%和12 h/12 h明暗循环], 自由摄食饮水。实验前适应性饲养7 d。本实验方案经河北省沧州市中西医结合医院实验动物伦理委员会审批通过[批准编号: CZX2024138(申)]。

1.2.3 MCAO模型构建方法 采用改良Longa线栓法构建MCAO模型。具体操作流程如下: 大鼠经腹腔注射3%戊巴比妥钠(50 mg/kg)或吸入2%异氟烷麻醉后, 取仰卧位固定于手术台; 行颈部正中切口, 依次分离右侧颈总动脉(common carotid artery, CCA)、颈外动脉(external carotid artery, ECA)和颈内动脉(internal carotid artery, ICA); 结扎ECA近心端后离断其远心端, 将经聚乙烯醇涂层处理(直径0.26~0.28 mm, 头端圆钝)的尼龙线栓经ECA残端插入, 沿ICA向颅内推进18~20 mm至大脑中动脉始部。线栓留置90 min后缓慢撤出, 建立再灌注模型。

1.2.4 模型成功标准 采用Longa神经功能缺损评分系统评估造模效果, 具体标准见表1。

1.2.5 质量控制 模型成功判定标准为术后1 h神经功能评分 ≥ 1 分。评分工作由两名实验人员在不知实验分组的情况下独立完成, 评分取平均值作为最终得分。

1.2.6 动物样本分配与检测流程说明 为减少个体差异并提高不同检测结果之间的可比性, 本研究中Western blot、三苯基氯化四氮唑(triphenyltetrazolium chloride, TTC)染色及苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色均采用同一批实验

动物完成。各组大鼠($n=6$)在术后24 h达到实验终点后统一处死, 迅速取脑组织。

每只大鼠脑组织按解剖部位进行分区处理: 同侧缺血半球皮层组织用于蛋白提取及Western blot分析; 相邻冠状切片用于TTC染色以评估脑梗死体积; 剩余脑组织经固定、包埋后用于HE染色进行病理学观察。该处理流程确保不同检测结果来源一致, 避免重复取样对实验结果造成干扰。

1.3 分子与组织学检测

1.3.1 Western blot检测ERCC1、SYK和GNAS蛋白表达情况 采用RIPA裂解缓冲液(含蛋白酶抑制剂, P0013B, 上海碧云天生物技术股份有限公司)冰上裂解细胞, $12\ 000\times g$ 、4 °C离心10 min后收集上清。使用二喹啉甲酸法(bicinchoninic acid assay, BCA)法测定蛋白浓度。取等量蛋白样品(30~50 μg), 经10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)分离后, 通过湿转法将其转移至0.22 μm 聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜(Millipore公司)。转膜结束后, 用5%脱脂奶粉或牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)室温封闭1 h, 再分别与一抗4 °C孵育过夜, 一抗包括抗ERCC1(兔多抗, 1:1 000, A4971, 武汉爱博泰克生物科技有限公司)、抗SYK(兔多抗, 1:1 000, A25741, 武汉爱博泰克生物科技有限公司)、抗GNAS(兔多抗, 1:1 000, A5546, 武汉爱博泰克生物科技有限公司)及内参抗GAPDH(兔多抗, 1:5 000, A19056, 武汉爱博泰克生物科技有限公司)。次日用TBST缓冲液洗涤3次(每次10 min), 加入HRP标记的山羊抗兔二抗(1:5 000, AC054, 武汉爱博泰克生物科技有限公司)室温孵育1 h, ECL化学发光试剂(Millipore公司)显影后, 使用ImageJ分析条带灰度值, 目标蛋白条带的灰度值均以GAPDH作为内参进行标准化。

表1 Longa神经功能缺损评分标准
Table 1 Longa neurological deficit scoring scale

评分 Score	神经行为学表现 Neurobehavioral manifestation
0	No neurological deficit
1	Incomplete extension of contralateral forepaw (mild deficit)
2	Circling to the contralateral side (moderate deficit)
3	Falling to the contralateral side (severe deficit)
4	Loss of consciousness with absence of spontaneous motor activity (very severe deficit)

1.3.2 TTC染色法评估脑梗死体积 为定量分析脑组织梗死范围,于造模后24 h处死实验动物并迅速取脑。剥除脑膜后,将脑组织于 -20°C 预冷5 min,再沿冠状面连续切割为厚度约2 mm的脑片。将脑片浸没于2%的2,3,5-三苯基氯化四氮唑[2,3,5-triphenyltetrazolium chloride, TTC, Sigma公司]溶液中, 37°C 避光孵育15 min,使TTC与线粒体内脱氢酶反应生成红色甲臢产物。染色完成后,脑片转移至4%多聚甲醛中 4°C 固定过夜。染色结果显示,正常脑组织因脱氢酶活性保留呈现红色,而缺血梗死区因酶活性丧失呈白色。使用ImageJ软件对每片脑组织中红白区域面积进行测量,并计算梗死体积百分比, $P=(V_{\text{梗死体积}}/V_{\text{全脑体积}})\times 100\%$, P代表梗死体积比。

1.3.3 HE染色 脑组织经4%多聚甲醛固定24~48 h后,依次进行常规脱水、透明及石蜡包埋处理,切片厚度为4~5 μm 。切片贴附于载玻片后, 60°C 恒温烘烤1 h以增强组织黏附性。脱蜡流程包括二甲苯浸泡(2次,每次10 min)及梯度乙醇(100%、95%、80%、70%)水化。在室温条件下,苏木素染色5~10 min后,以1%盐酸乙醇分化数秒,流水冲洗返蓝;再经伊红复染1~3 min。染色后组织经梯度乙醇脱水、二甲苯透明,中性树胶封固。于光学显微镜下观察脑组织的细胞排列、核固缩、神经元坏死及血管结构损伤等病理学改变,并采集图像进行后续分析。

1.4 统计学方法

所有实验数据均采用GraphPad Prism 9.0软件进行处理分析。计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较采用独立样本 t 检验。 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 AIS相关血栓分子标志物的筛选

将GSE37587数据集及GSE140275数据集进行均一化,结果显示,去批次后样本未出现明显分离,后续可基于联合数据集进行差异表达分析。结合GeneCards数据库(筛选条件:蛋白编码基因 >50 个,相关性评分 >10),最终鉴定出14个共同DEGs: *CASP3*、*SP1*、*HSPB1*、*NFKB1*、*FYN*、*SYK*、*PTPN11*、*ITGB1*、*CALR*、*TNFSF10*、*STAT1*、*ERCC1*、*IFNG*、*GNAS*(图1)。

2.2 关键DEGs的富集分析

GO/KEGG分析显示,14个DEGs显著富集于

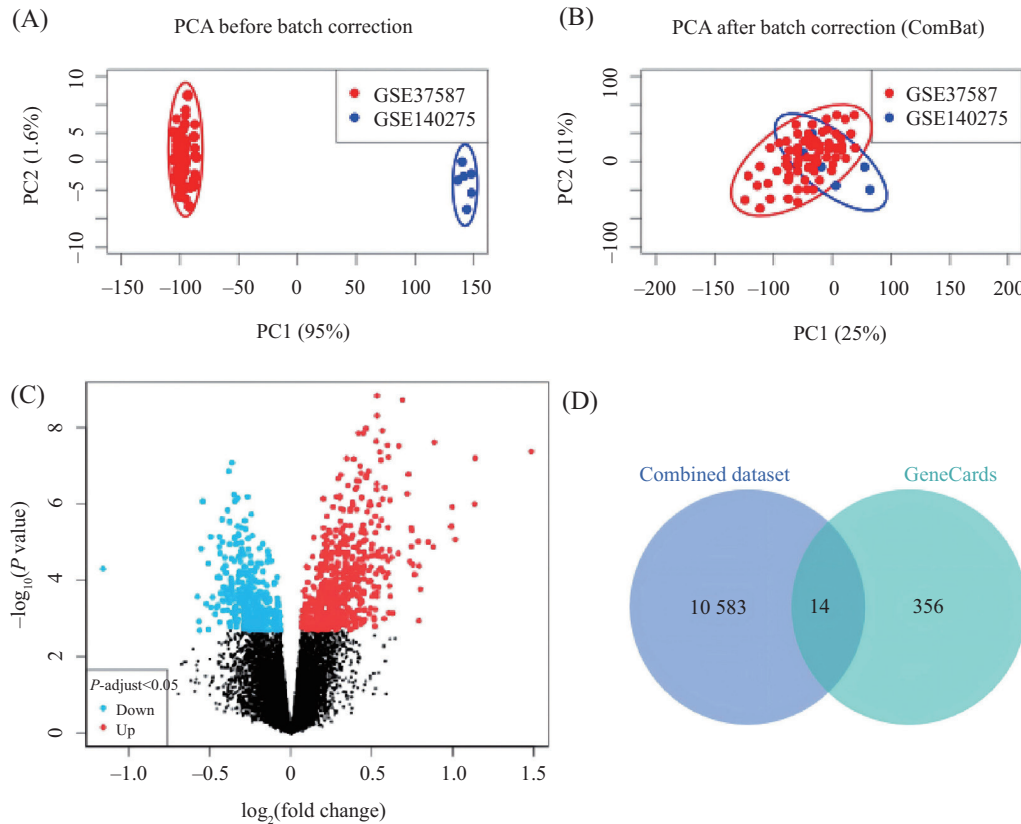
DNA修复、免疫调节和G蛋白信号通路(图2)。其中,通路网络图(cnetplot)展示差异表达基因与富集GO-生物过程(biological process, BP)/细胞组分(cellular component, CC)/分子功能(molecular function, MF)条目之间的关系,每个节点表示一个基因或通路,颜色表示显著性,连接表示其参与的通路;BP/CC/MF富集结果的关系图(emapplot):各圆圈表示不同的GO-BP/CC/MF条目,颜色表示显著性,边表示不同条目之间的基因重叠程度。富集得分气泡图(dotplot):横坐标表示基因比例,颜色表示 P 值,气泡大小表示基因数量,用于展示显著富集的BP/CC/MF条目。GO三大类(BP、CC、MF)功能富集分析结果的综合气泡图,整合展示三类GO功能条目(BP/CC/MF)的显著性、基因数量与富集程度;GO三大类(BP、CC、MF)功能注释柱状图:根据功能显著性和基因富集量筛选前若干GO功能条目进行可视化。此外,桑基图(Sankey plot)展示基因与其参与的KEGG通路之间的多对多映射关系,直观反映基因功能分布。

2.3 目标基因与免疫浸润相关性

TIMER数据库分析表明, *ERCC1*、*SYK*和*GNAS*与巨噬细胞/中性粒细胞浸润显著相关,提示其通过免疫调控参与AIS进展(图3)。

2.4 关键DEGs与血栓标志分子的相关性

相关性分析显示, *ERCC1*基因与TAT表现出显著正相关($r=0.16$, $P<0.001$),提示其可能在促进凝血过程中发挥调控作用;而与CD62P的相关性较弱($r=0.008$, $P=0.94$),说明其与血小板活化的关联性不显著;此外, *ERCC1*与vWF($r=0.059$, $P=0.4$)及ET1($r=-0.052$, $P=0.46$)相关性较弱。*SYK*基因与CD62P呈显著正相关($r=0.48$, $P<0.001$),提示其可能在促进血小板活化中发挥关键作用;与vWF呈显著正相关($r=0.53$, $P<0.001$),与ET1也具有显著正相关性($r=0.34$, $P<0.001$),进一步提示其可能参与血管内皮功能与血管反应性的调控;而与TAT的相关性较弱($r=0.18$, $P=0.069$),尚无明确结论。*GNAS*基因与vWF表现出轻度负相关($r=-0.14$, $P=0.048$),与CD62P几乎无相关性($r=-0.061$, $P=0.38$),提示其在血小板活化调控中的作用有限;然而,其与TAT呈弱正相关($r=0.12$, $P=0.021$),与ET1呈显著负相关($r=-0.33$, $P<0.001$),提示*GNAS*可能通过影响内皮功能和凝血通路,在血栓形成中具有一定的调节作用(图4)。



A: 去批次前GSE37587数据集及GSE140275数据集的PCA图; B: 去批次后GSE37587数据集及GSE140275数据集的PCA图; C: 联合数据集的差异基因火山图; D: 数据集差异基因Venn图。

A: PCA plot of the GSE37587 and GSE140275 datasets before batch effect removal; B: PCA plot of the GSE37587 and GSE140275 datasets after batch effect removal; C: volcano plot of differentially expressed genes in the combined dataset; D: Venn diagram of overlapping DEGs between datasets.

图1 AIS相关血栓分子标志物的筛选流程图

Fig.1 Workflow for screening AIS-related thrombotic molecular markers

2.5 ERCC1、SYK与GNAS的调控网络分析

基于ENCODE ChIP-seq数据库的转录因子预测分析, 识别出MXD3、KLF9、DPF2、MAZE(MAZ)及ATF1共5个转录因子可同时靶向*ERCC1*和*GNAS*, KLF4、SUZ12及EZH2共3个转录因子可同时靶向*GNAS*和*SYK*, 但未检测到可同时靶向*ERCC1*、*SYK*与*GNAS* 3个基因的共同转录因子(图5A)。

基于IMEx数据库的蛋白互作网络分析显示, UBC(ubiquitin C)是唯一同时与*ERCC1*、*SYK*和*GNAS*均存在互作关系的节点蛋白, CALM1(calmodulin 1)同时与*SYK*和*GNAS*存在互作关系(图5B)。

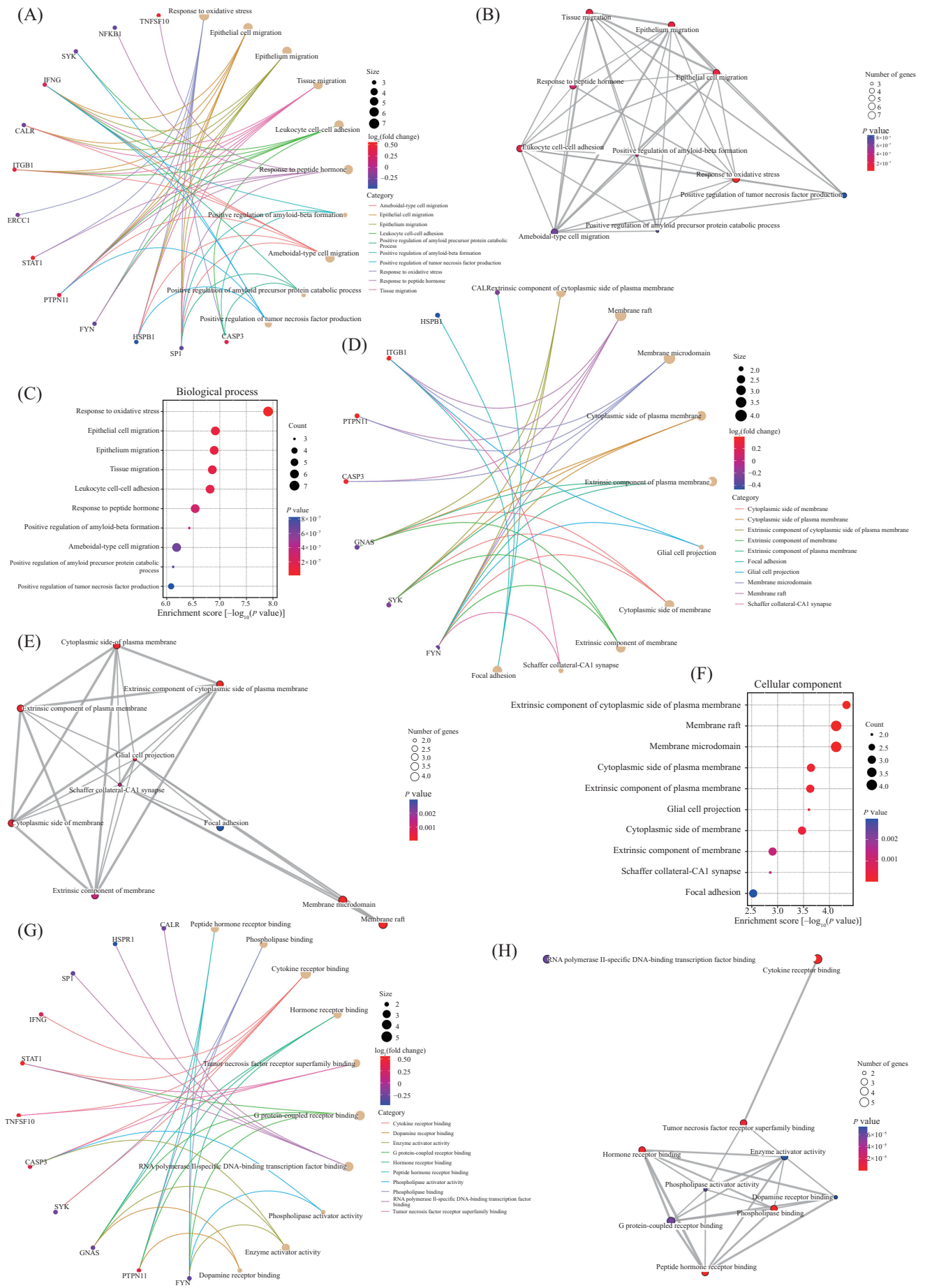
基于miRNet数据库的miRNA互作网络分析显示, 可同时靶向*ERCC1*、*SYK*和*GNAS*的miRNA包括hsa-miR-7-5p、hsa-miR-15a-5p、hsa-miR-18a-5p、hsa-miR-218-5p、hsa-let-7a-5p、hsa-let-7b-5p, 可同时靶向*SYK*和*GNAS*的miRNA包括hsa-miR-16-5p、

hsa-miR-17-5p、hsa-miR-93-5p、hsa-miR-99b-3p、hsa-miR-361-5p, 可同时靶向*ERCC1*和*SYK*的miRNA包括hsa-miR-1-3p、hsa-miR-23a-3p、hsa-miR-24-3p、hsa-miR-30e-3p、hsa-miR92b-3p、hsa-miR139-5p、hsa-miR-143-3p、hsa-miR-155-5p、hsa-let-7e-5p(图5C)。上述结果提示, *SYK*同时与*ERCC1*和*GNAS*存在多个共享miRNA, 且是三基因唯一共同的互作蛋白UBC的关键连接节点之一, 提示*SYK*可能处于该多层次调控网络的核心位置。

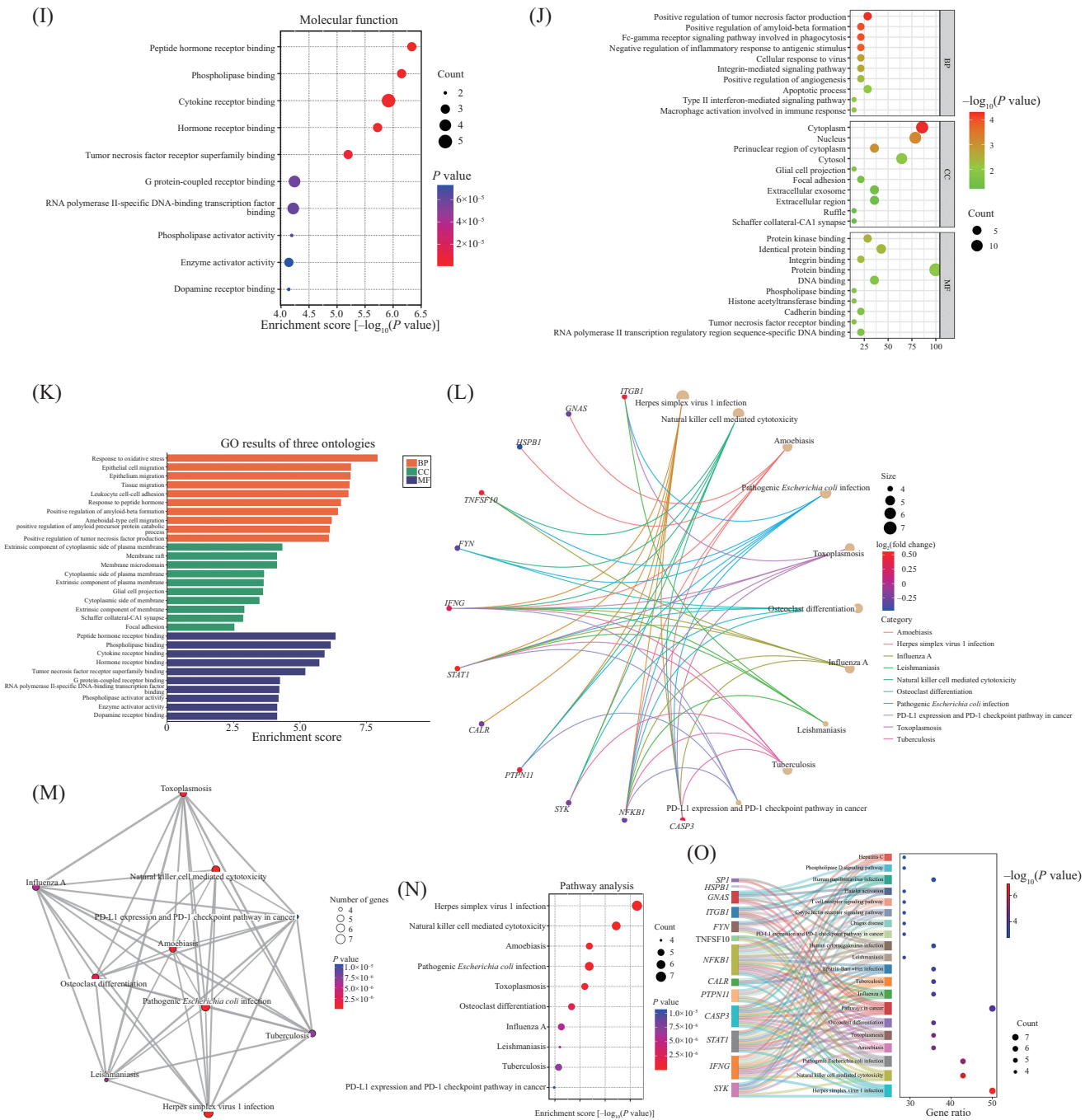
2.6 动物模型验证

MCAO模型组Longa评分显著升高(模型组vs对照组, $P < 0.0001$), TTC染色显示梗死体积占比增加(模型组vs对照组, $P < 0.0001$), HE染色证实神经元缺血性损伤(图6)。

为了验证生信分析的结果, 进行了动物实验验证, 并建立了缺血性脑卒中大鼠模型, 通过Longa评分、TTC染色和HE染色验证模型建立是否成功。



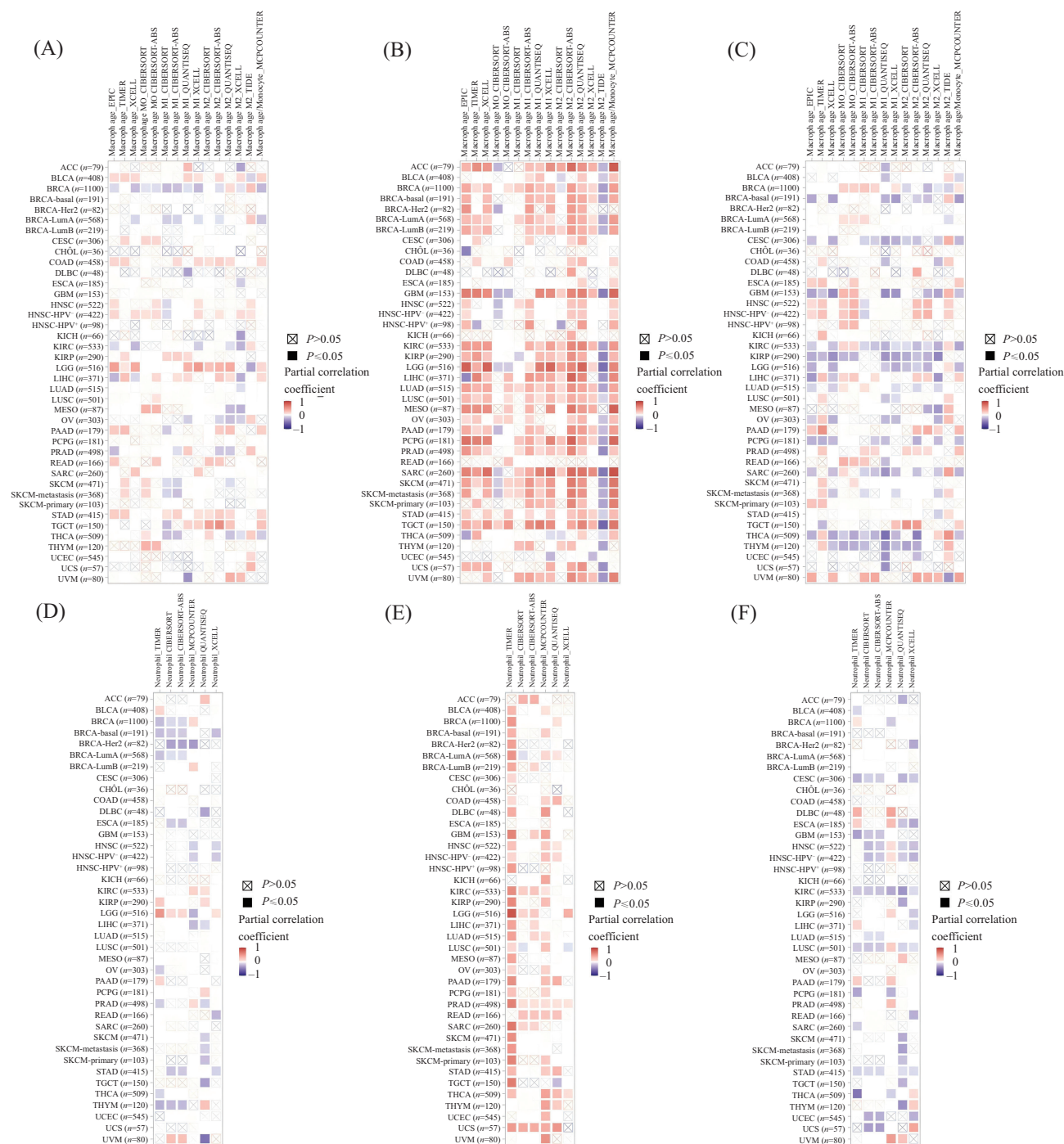
续图2



A: BP-通路网络图(cnetplot); B: BP富集结果的关系图(emapplot); C: 生物过程(BP)富集得分气泡图(dotplot); D: CC-cnetplot图; E: CC-emapplot图; F: CC-dotplot图; G: MF-cnetplot图; H: MF-emapplot图; I: MF-dotplot图; J: GO三大类(BP、CC、MF)功能富集分析结果的综合气泡图; K: GO三大类(BP、CC、MF)功能注释柱状图; L: 显著KEGG通路-基因cnetplot图; M: KEGG通路富集-emapplot图; N: KEGG通路富集-dotplot图; O: 差异表达基因与富集KEGG通路关系的桑基图(Sankey plot)。

A: cnetplot of BP-pathway network; B: emapplot of BP enrichment results; C: dotplot of BP enrichment scores; D: cnetplot of CC annotations; E: emapplot of CC enrichment results; F: dotplot of CC annotations; G: cnetplot of MF annotations; H: emapplot of MF enrichment results; I: dotplot of MF annotations; J: combined bubble plot of GO functional enrichment analysis across three categories (BP, CC, MF); K: bar plot of GO functional annotations across three categories (BP, CC, MF); L: cnetplot of significant KEGG pathway-gene network; M: emapplot of KEGG pathway enrichment; N: dotplot of KEGG pathway enrichment; O: Sankey plot illustrating the relationships between DEGs and enriched KEGG pathways.

图2 DEGs功能富集分析图
Fig.2 Functional enrichment analysis of DEGs



A: *ERCC1*与巨噬细胞的相关性; B: *SYK*与巨噬细胞的相关性; C: *GNAS*与巨噬细胞的相关性; D: *ERCC1*与中性粒细胞的相关性; E: *SYK*与中性粒细胞的相关性; F: *GNAS*与中性粒细胞的相关性。红色代表正相关, 紫色代表负相关; 颜色越深, 相关性越强。

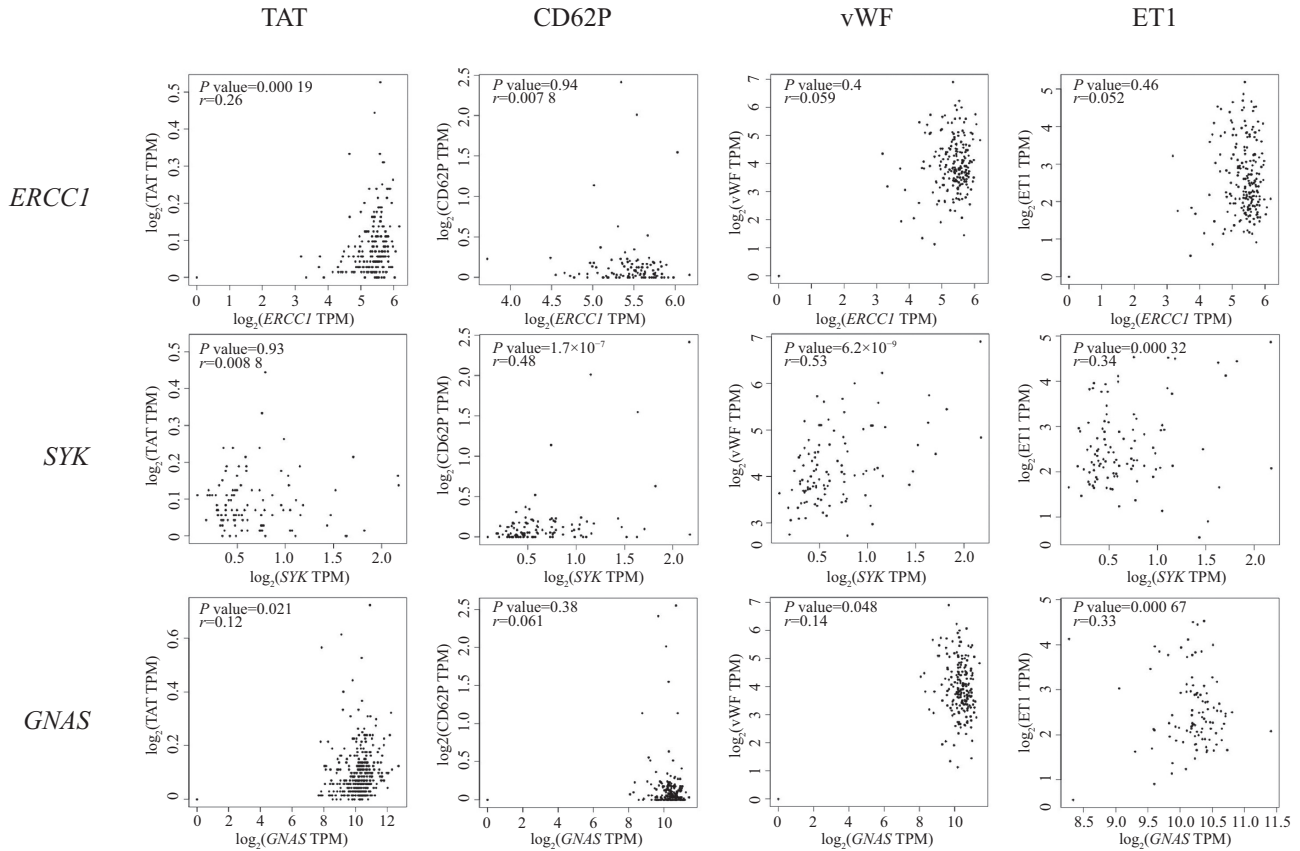
A: correlation between *ERCC1* and macrophages; B: correlation between *SYK* and macrophages; C: correlation between *GNAS* and macrophages; D: correlation between *ERCC1* and neutrophils; E: correlation between *SYK* and neutrophils; F: correlation between *GNAS* and neutrophils. Red represents positive correlation, and purple represents negative correlation. Darker color indicates stronger correlation.

图3 基因-免疫细胞相关性图

Fig.3 Correlation between target genes and immune cell infiltration

对照组评分为0分, 模型组评分集中于2~3分, 与对照组相比, 模型组大鼠在手术后24 h神经功能缺损评分明显升高, 提示MCAO模型成功建立, 诱导了

神经功能缺损(图6A)。TTC染色结果显示, 模型组大鼠的脑梗死面积明显增大, 梗死体积占比显著高于对照组(图6B)。HE染色结果显示, 对照组大鼠脑



r: 相关性系数。

r: the correlation coefficient.

图4 *ERCC1*, *SYK*, *GNAS*分别与TAT、CD62P、vWF、ET1血栓标志分子相关性

Fig.4 Correlations of *ERCC1*, *SYK*, and *GNAS* with thrombotic markers TAT, CD62P, vWF, and ET1

皮层及海马区神经元排列整齐, 胞体形态规则, 胞核圆形、染色均匀, 无明显炎症细胞浸润及组织水肿。而MCAO模型组可见脑皮层神经元排列紊乱, 部分神经元胞体缩小、核固缩或溶解, 染色加深, 形态不规则, 局部可见空泡变性、胶质细胞增生及血管周围水肿, 提示脑组织发生明显缺血性损伤。以上结果均表明, MCAO模型成功建立, 且能有效诱导局部脑梗死。

2.7 关键DEGs在AIS中大鼠脑组织的表达

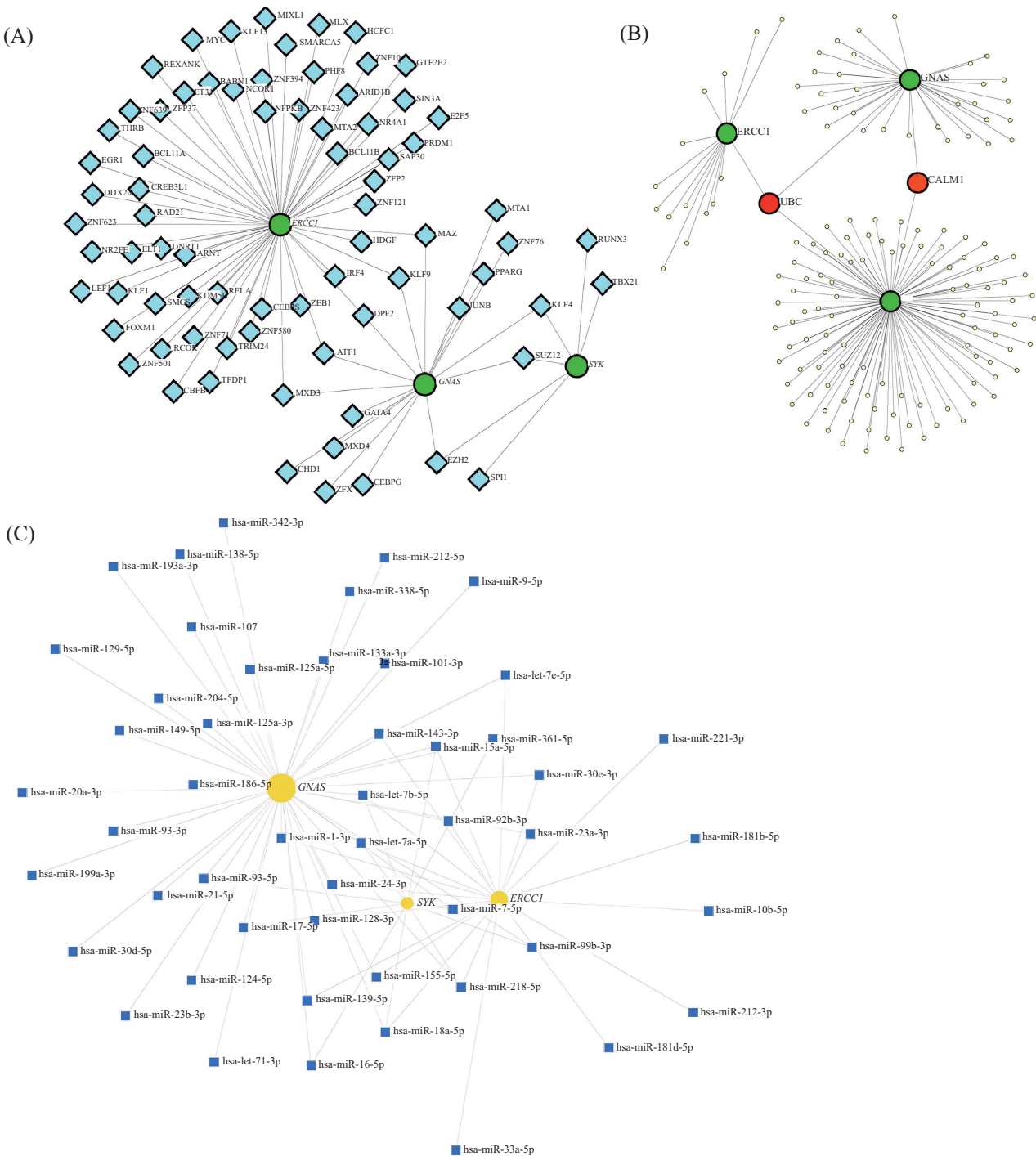
Western blot结果如图7A所示, 以GAPDH作为内参蛋白进行灰度值标准化定量, 结果显示, 与对照组比较, 模型组的*ERCC1*、*SYK*、*GNAS*的相对表达量分别为对照组的2.03倍、1.60倍和1.74倍, 差异均具有统计学意义(图7B~图7D, $P < 0.000 1$)。

3 讨论

本研究经过GEO数据库差异表达分析与GeneCards数据库联合筛选, 共筛选得到14个AIS相关的关

键DEGs。通过对现有文献的系统回顾, 发现其中*ERCC1*在缺血性中风患者中的蛋白表达水平高于健康对照^[9], *SYK*在小鼠缺血性中风后通过Dectin-1/Syk信号触发神经炎症^[13-14], 而*GNAS*则被报道与血压调节及心血管疾病风险相关^[12-15], 提示这3个基因可能在缺血性中风中独立参与疾病进展的不同环节。基于上述文献证据, 本研究进一步选取*ERCC1*、*SYK*和*GNAS*作为目标基因进行深入验证与分析。通过TIMER数据库评估三者与免疫浸润的相关性后发现, 3个目标基因与免疫细胞浸润程度具有不同程度的相关关系, 提示其可能通过免疫调控途径参与AIS的进展。

本研究通过整合生物信息学分析与动物实验验证, 系统性地揭示了*ERCC1*、*SYK*和*GNAS*在AIS中的差异表达特征。数据分析结果表明, *SYK*在卒中模型中表达显著上调, *ERCC1*与*GNAS*亦呈升高趋势。此外, 三者与血栓形成相关标志物(TAT、CD62P、vWF、ET1)呈现一定相关性, 进一步支持



A: 转录因子网络图; B: 蛋白互作网络图; C: miRNA网络图。

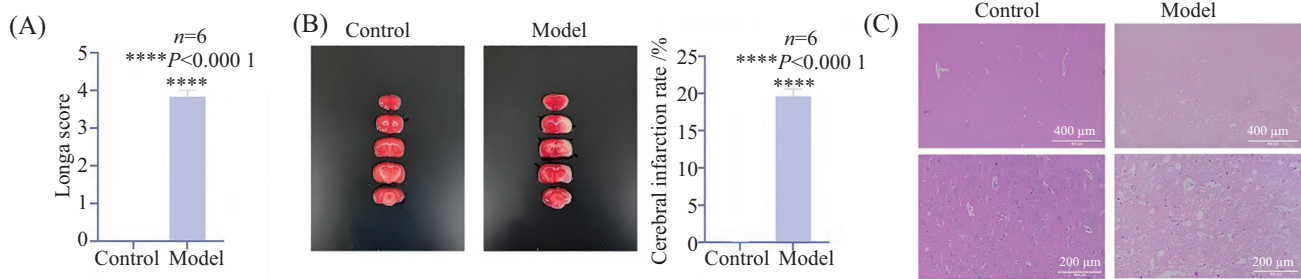
A: transcription factor network; B: protein-protein interaction network; C: miRNA network.

图5 ERCC1、SYK与GNAS的多级调控网络图

Fig.5 Multi-level regulatory network of ERCC1, SYK, and GNAS

其在AIS病理机制中的潜在作用^[16-17]。尽管已有文献分别报道了SYK在卒中后神经炎症中的作用^[13-14]以及GNAS与心血管疾病风险的相关性^[12-15]，但既往研究均聚焦于单一分子，尚未将这三种功能各异的分子纳入统一的分析框架。本研究首次同时关注这

3个分别代表DNA修复(*ERCC1*)、免疫激酶(*SYK*)和G蛋白信号(*GNAS*)的分子在AIS中的协同上调现象，并提出“损伤-免疫-信号轴”的多通路整合假说。此外，*ERCC1*在AIS脑组织中的表达变化此前研究较少，本研究通过动物模型证实其在MCAO后表达显

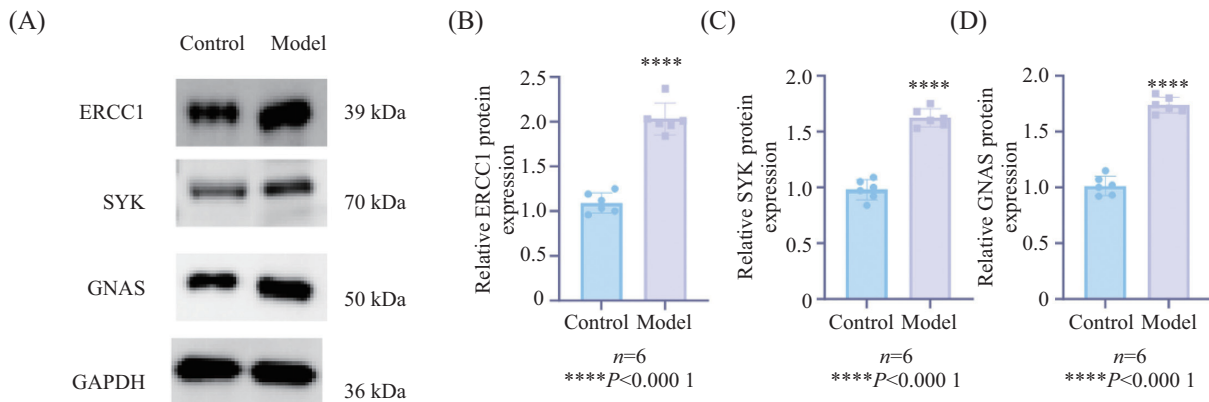


A: 术后24 h Longa评分比较; B: TTC染色, 测量梗死体积与全脑体积的比值, 对照组大鼠脑组织正常, 呈鲜红色, 未见梗死灶, 模型组大鼠缺血区呈白色, 正常脑组织呈红色, 梗死灶明显, 且大多数梗死区域位于大脑半球的中脑动脉供血区域; C: HE染色, 对照组大鼠脑皮层及海马区神经元排列整齐, 胞体形态规则, 胞核圆形、染色均匀, 无明显炎性细胞浸润及组织水肿; 而MCAO模型组可见脑皮层神经元排列紊乱, 形态不规则, 局部可见空泡变性、胶质细胞增生及血管周围水肿。

A: comparison of Longa scores at 24 h post-surgery; B: TTC staining showing the ratio of infarct volume to total brain volume. In the control group, brain tissue appeared normal and uniformly red without any infarct lesions. In the model group, ischemic areas appeared white while normal brain tissue remained red, with obvious infarct lesions predominantly localized to the middle cerebral artery territory of the cerebral hemisphere; C: HE staining. In the control group, neurons in the cerebral cortex and hippocampus were well-arranged, with regular cell bodies, round and uniformly stained nuclei, and no significant inflammatory cell infiltration or tissue edema; in contrast, the MCAO model group exhibited disorganized neuronal arrangement in the cerebral cortex, and irregular morphology, as well as localized vacuolar degeneration, gliosis, and perivascular edema.

图6 大鼠MCAO模型构建及验证

Fig.6 Construction and validation of the rat MCAO model



A: Western blot条带结果; B: ERCC1蛋白表达归一化量化图; C: SYK蛋白表达归一化量化图; D: GNAS蛋白表达归一化量化图。

A: Western blot bands; B: quantification of normalized ERCC1 protein expression; C: quantification of normalized SYK protein expression; D: quantification of normalized GNAS protein expression.

图7 大鼠脑组织中ERCC1、SYK、GNAS蛋白表达水平

Fig.7 Protein expression levels of ERCC1, SYK, and GNAS in rat brain tissues

著上调, 这与部分临床研究观察到的血清 *ERCC1* 下降趋势^[9]形成对比, 提示组织特异性调控的存在。

ERCC1 作为核苷酸切除修复 (nucleotide excision repair, NER) 通路中的核心成员^[18], 其与血栓及免疫调控的关联近年来受到关注^[19]。Deng等^[9]在大样本 (513例缺血性脑卒中患者和550例对照) 研究中发现, *ERCC1* rs3212986多态性与中国汉族人群缺血性脑卒中易感性显著相关, A等位基因可增加缺血性脑卒中的发病风险 (OR=1.287, $P=0.006$)。该研究进一步显示, 缺血性脑卒中患者外周血单个核细胞中

ERCC1 mRNA水平低于对照组, 而血浆 *ERCC1* 蛋白水平却高于对照组 ($P<0.05$), 提示 *ERCC1* 在缺血性脑卒中中的表达调控可能存在转录后修饰机制。此外, 内皮细胞特异性 *ERCC1* DNA修复缺陷可诱发血管屏障功能障碍, 提示 *ERCC1* 不仅通过DNA修复发挥神经保护作用, 还可能通过维持脑血管内皮完整性参与缺血后血管稳态的调控^[20]。本研究中 *ERCC1* 在MCAO模型大鼠脑组织中的表达显著上调, 可能反映了缺血应激下神经元和胶质细胞对DNA损伤的代偿性修复反应。然而, 部分临床研究显示AIS患

者血清 *ERCC1* 水平随病情进展呈进行性下降^[9]。这种组织特异性差异(中枢神经系统 vs 外周循环)可能与血脑屏障通透性改变、疾病不同阶段的动态调控或检测样本类型(全血 vs 脑组织)有关,需通过纵向研究进一步阐明。

SYK 是一种非受体型酪氨酸激酶,在免疫细胞信号转导中发挥核心作用,尤其参与调控 B 细胞受体激活、T 细胞活化和巨噬细胞介导的炎症反应^[21-22]。在卒中早期阶段,炎症反应对继发性脑损伤的发生具有重要影响。*SYK* 是连接血栓形成与神经炎症的关键信号节点。在血小板中,*SYK* 是胶原受体 *GPVI* 信号通路的核心信号分子,*GPVI* 偶联 *FcγR* 链及其免疫受体酪氨酸活化基序(immunoreceptor tyrosine-based activation motif, ITAM)后启动血小板活化;*SYK* 同时也是血小板 *FcγRIIa*、*CLEC-2* 信号通路以及整合素 $\alpha IIb\beta 3$ 外向内信号转导所必需的^[23]。*van Eeuwijk* 等^[24]的研究证明,血小板特异性 *SYK* 敲除在小鼠动脉血栓形成和缺血性脑卒中模型中均表现出显著的保护作用,且该敲除不影响正常止血功能;口服 *SYK* 抑制剂 *BI1002494* 可减小梗死体积并改善神经功能预后。在免疫细胞中,*SYK* 介导 *Dectin-1* 受体信号,触发缺血性脑卒中后的神经炎症反应^[14];*Mincle*/*SYK* 信号通路也在缺血再灌注后的固有免疫应答中发挥关键作用^[25]。因此,*SYK* 通过同时调控血小板活化(促血栓)和小胶质细胞/巨噬细胞炎症应答(促神经炎症),成为连接“血栓-炎症”轴的核心分子。

GNAS 基因编码的 *G α* 蛋白是异三聚体 G 蛋白的刺激型 α 亚基,参与调控腺苷酸环化酶活性及下游 *cAMP*/*PKA* 信号通路^[26]。该通路已被证实神经保护、血管舒张和血管内皮屏障维持中发挥关键作用。现有证据表明,*cAMP* 通路在脑缺血再灌注过程中具有抗氧化、抗炎和抑制细胞凋亡等多重保护效应^[27-28]。*He* 等^[29]的研究发现,内皮特异性 *G α* 缺失会损害缺血后血管生成,*G α* 通过 *cAMP*/*CREB* 通路调节促血管生成因子 *AGGF1* 的表达,从而影响缺血后血流恢复。此外,*G α* 作为 *S1PR1* 信号的中介分子,通过稳定内皮细胞连接处的 *VE-cadherin* 调控血管完整性^[30]。在慢性脑缺血白质病变患者中,血清 *GNAS* 水平与 *Fazekas* 评分呈正相关,提示其在脑缺血相关白质损伤中可能发挥代偿性保护功能^[31]。*GNAS* 的表达异常可能导致信号转导障碍,影响血管功能稳定性及神经修复过程,从而在 AIS 中发挥病理作用。

为进一步挖掘 *ERCC1*、*SYK* 与 *GNAS* 之间的潜在调控关系,本研究基于 *NetworkAnalyst* 平台的转录因子预测分析识别出 *MXD3*、*KLF9*、*DPF2*、*MAZ* 及 *ATF1* 共 5 个转录因子,它们可同时靶向 *ERCC1* 和 *GNAS*; *KLF4*、*SUZ12* 及 *EZH2* 共 3 个转录因子可同时靶向 *GNAS* 和 *SYK*,但未检测到三者共同的转录因子,提示三个基因在 AIS 中的同步上调可能源于多条上游信号通路的平行激活而非单一转录因子的驱动。上述转录因子在缺血性卒中病理过程中具有明确的生物学功能。*KLF9* 是缺血后神经元损伤的关键中介因子^[32];*DPF2* 已被鉴定为基于染色质调节因子的缺血性卒中候选免疫生物标志物^[33];*KLF4* 在内皮细胞中表达上调,可通过促进 NO 合成、增强内皮管形成、减轻氧化应激及改善平滑肌细胞功能,共同促进缺血区域血流恢复,还可通过调节内皮细胞黏附分子、核因子 κB 及紧密连接蛋白的表达减轻脑缺血诱导的血管损伤^[34];*EZH2* 作为多梳抑制复合物 2(*PRC2*)的核心催化亚基,在缺血性脑卒中后可通过与 *lncRNA Peg13* 协同作用,保护脑血管内皮细胞功能,减轻缺血再灌注损伤^[35];*SUZ12* 作为 *PRC2* 的另一核心组分,在局灶性脑缺血后室管膜下区神经干细胞中富集,与长链非编码 RNA *H19* 协同通过染色质重塑调控卒中诱导的神经发生^[36]。上述转录因子分别通过调控神经元损伤(*KLF9*)、免疫炎症(*DPF2*)、血管修复(*KLF4*、*EZH2*)及神经发生(*SUZ12*)等不同途径参与 AIS 病理过程,其同时靶向 *ERCC1*/*GNAS* 或 *GNAS*/*SYK*,提示 *GNAS* 可能作为连接 DNA 修复、免疫炎症与血管修复的转录调控枢纽。

本研究的 miRNA 互作网络分析显示, *hsa-miR-7-5p*、*hsa-miR-15a-5p*、*hsa-miR-18a-5p*、*hsa-miR-218-5p*、*hsa-let-7a-5p* 及 *hsa-let-7b-5p* 可同时靶向三个基因,且这些 miRNA 均被报道在缺血性脑卒中患者中差异表达,进一步支持三者存在共同的转录后调控机制^[37-39]。这些 miRNA 广泛参与缺血性卒中后的神经元凋亡、血管内皮损伤、神经炎症及小胶质细胞极化等关键病理过程,其同时靶向 *ERCC1*、*SYK* 与 *GNAS*,提示三者可能通过共同的 miRNA 调控网络在转录后水平实现协同表达调控。

基于 *IMEx* 数据库的 PPI 分析发现 *UBC* 是唯一同时与 *ERCC1*、*SYK* 和 *GNAS* 均存在互作关系的节点蛋白,*CALM1* 同时与 *SYK* 和 *GNAS* 存在互作关系。*Wong* 等^[40]曾发现,包括 *UBC* 在内的基因在卒中后不

同时差异表达,可作为缺血性卒中诊断和预后的生物标志物之一。UBC编码的多聚泛素前体蛋白,是泛素-蛋白酶体系统(ubiquitin-proteasome system, UPS)的核心组分,UBC作为唯一同时与*ERCC1*、*SYK*和*GNAS*均存在互作的节点蛋白,提示泛素-蛋白酶体系统可能通过调控这三个蛋白的稳定性或降解速率,在AIS病理过程中发挥多靶点调控作用。*CALM1*编码钙调蛋白,是一种高度保守的钙离子传感器。在脑缺血研究中,缺血10 min即可引起钙-钙调蛋白结合及不可逆的神经元损伤^[41]。急性缺血性脑卒中患者血清miR-335表达水平明显下降,*CALM1*是其直接靶点^[42]。*CALM1*同时与*SYK*和*GNAS*存在互作,提示钙信号通路可能通过钙调蛋白介导免疫信号与G蛋白信号之间的交叉调控。

值得注意的是,*SYK*同时与*ERCC1*和*GNAS*存在多个共享miRNA,且是三基因唯一共同的互作蛋白UBC的关键连接节点之一,提示*SYK*可能处于该多层次调控网络的核心位置。综合转录因子、miRNA与蛋白互作三个层面的分析结果,本研究提出了一个“转录因子-miRNA-靶基因-互作蛋白”的多层级整合调控模型:在转录层面,*KLF9*/*DPF2*等因子靶向*ERCC1*/*GNAS*,*KLF4*/*EZH2*/*SUZ12*等因子靶向*GNAS*/*SYK*,形成以*GNAS*为交汇点的差异化转录调控;在转录后层面,*hsa-miR-7-5p*、*hsa-miR-15a-5p*等多个miRNA同时靶向三个基因,实现协同表达调控;在蛋白层面,UBC通过泛素-蛋白酶体途径调控三个蛋白的稳定性,*CALM1*通过钙信号通路连接*SYK*与*GNAS*。上述三个层面的调控机制可能相互协同,共同参与AIS中DNA损伤修复(*ERCC1*)、免疫炎症应答(*SYK*)与G蛋白信号转导(*GNAS*)的整合调控。上述多层次网络分析结果,为后续深入探究*ERCC1*、*SYK*与*GNAS*在AIS中的协同调控机制提供了重要的理论线索与实验方向。

本研究的创新点在于首次综合评估了*ERCC1*、*SYK*与*GNAS*三者在AIS中的表达特征、潜在机制及组织定位特征,结合生物信息学与动物实验双重验证,提升了研究的可信度与转化价值。尤其值得一提的是,近年来多组学整合分析已成为揭示缺血性卒中复杂分子机制的前沿范式,本研究紧跟该研究趋势,构建了“转录因子-miRNA-靶基因-互作蛋白”的多层级调控网络。此外,本研究中三个基因的联合表达特征为多靶点诊断panel的构建提供了理论

基础,这与近期缺血性卒中多基因联合诊断策略的研究方向一致。

然而,本研究亦存在一定局限性。首先,所用生物信息学数据集样本量有限,不同平台之间的批次效应虽经ComBat校正,但仍可能影响分析的稳定性。其次,本研究缺乏独立临床队列验证,动物实验虽证实目标基因的蛋白表达变化,但生信结果与AIS患者临床实际情况的关联仍需进一步证实,后续应收集AIS患者外周血样本进行表达验证及临床相关性分析。再次,本研究主要通过生物信息学预测和蛋白表达检测揭示差异表达及调控网络,尚未通过过表达/敲低、ChIP-qPCR、双荧光素酶报告基因及免疫共沉淀等实验验证其调控关系,后续需在细胞和动物模型中开展功能实验深入探究其分子机制及因果效应。最后,SD大鼠MCAO模型难以完全模拟人类卒中的复杂病理过程,且本研究仅观察术后24 h单一时间点,后续应设置多时间点动态监测并结合共病模型以提高临床转化价值。

综上所述,本研究为AIS相关分子标志物的筛选与功能研究提供了新线索,提示*SYK*、*ERCC1*及*GNAS*可能成为卒中早期诊断及靶向治疗的新靶点。未来可结合大规模人类样本队列、单细胞测序等多组学技术,深入揭示其在卒中发生发展中的动态调控网络,并探索其在临床应用中的可行性与转化潜力。

作者贡献

郑建彪负责研究设计、受试者评分、数据收集、数据分析、论文撰写和修改;张金彪负责受试者评分、数据收集、论文指导和修改;冯娜娜负责论文指导、修改、审校和项目资助。

参考文献 (References)

- [1] Moreno-Gomez V, Wold J J. Therapeutic options for disabling acute ischemic stroke [J]. Medical Clinics of North America, 2025, 109(2): 343-356.
- [2] Feigin V L, Brainin M, Norrving B, et al. World stroke organization: global stroke fact sheet 2025 [J]. International Journal of Stroke, 2025, 20(2): 132-144.
- [3] Bakola E, Palaiodimou L, Kargiotis O, et al. Microembolic signal detection in acute ischemic stroke: clinical relevance and impact on treatment individualization: a narrative review [J]. European Journal of Neurology, 2025, 32(1): e16584.
- [4] Wang Y, Mulder I A, Westendorp W F, et al. Immunothrombosis in acute ischemic stroke [J]. Stroke, 2025, 56(2): 553-563.

- [5] 徐敬尧, 王小璐, 侯帅, 等. 单细胞转录组学结合生物信息学综合分析缺血性脑卒中巨噬细胞亚群及枢纽基因[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2025, 41(6): 505-513.
- Xu J Y, Wang X L, Hou S, et al. Single-cell transcriptomics combined with bioinformatics for comprehensive analysis of macrophage subpopulations and hub genes in ischemic stroke [J]. Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology, 2025, 41(6): 505-513.
- [6] 左春月, 李猛, 靳晓飞, 等. 黄芩甲苷干预的神经干细胞外泌体通过抑制经典细胞焦亡途径减轻缺血性脑卒中大鼠脑损伤[J]. 中国病理生理杂志, 2025, 41(2): 277-286.
- Zuo C Y, Li M, Jin X F, et al. Astragaloside IV-pretreated neural stem cell-derived exosomes attenuate brain injury in ischemic stroke rats by inhibiting classical pyroptosis pathway [J]. Chinese Journal of Pathophysiology, 2025, 41(2): 277-286.
- [7] Cao Z J, Wang Q X, Sun Y, et al. Inflammatory markers in acute ischemic stroke [J]. Clinica Chimica Acta, 2025, 569: 120185.
- [8] Gundersen J K, Gonzalez-Ortiz F, Karikari T, et al. Neuronal plasma biomarkers in acute ischemic stroke [J]. Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism, 2025, 45(1): 77-84.
- [9] Deng X D, Ke J L, Chen T Y, et al. ERCC1 polymorphism and its expression associated with ischemic stroke in Chinese population [J]. Frontiers in Neurology, 2022, 13: 998428.
- [10] Tian L L, Cao G Z, Zhu X T, et al. Transcriptomics and metabolomics unveil the neuroprotection mechanism of Angong Niuhuang (AGNH) pill against ischaemic stroke injury [J]. Molecular Neurobiology, 2024, 61(10): 7500-7516.
- [11] Vetter A, Zimpfer A, Schneider B, et al. Circumscribed choroidal hemangioma in Sturge-Weber syndrome [J]. Pathologie, 2025, 46(1): 51-55.
- [12] Freson K, Izzi B, van Geet C. From genetics to epigenetics in platelet research [J]. Thrombosis Research, 2012, 129(3): 325-329.
- [13] Zhou C L, Li J, Wu X C, et al. Activation of spleen tyrosine kinase (SYK) contributes to neuronal pyroptosis and cognitive impairment in diabetic mice via the NLRP3/Caspase-1/GSDMD signaling pathway [J]. Experimental Gerontology, 2024, 198: 112626.
- [14] Ye X C, Hao Q, Ma W J, et al. Dectin-1/Syk signaling triggers neuroinflammation after ischemic stroke in mice [J]. Journal of Neuroinflammation, 2020, 17(1): 17.
- [15] Ehret G B, Munroe P B, Rice K M, et al. Genetic variants in novel pathways influence blood pressure and cardiovascular disease risk [J]. Nature, 2011, 478(7367): 103-109.
- [16] Marta-Enguita J, Machado F J D, Orbe J, et al. Thrombus composition and its implication in ischemic stroke assessment and revascularization treatments [J]. Neurología, 2025, 40(1): 77-88.
- [17] Staessens S, Vandelanotte S, Francois O, et al. Association between thrombus composition and etiology in patients with acute ischemic stroke treated by thrombectomy [J]. Stroke, 2025, 56(4): 1026-1035.
- [18] Faridounnia M, Folkers G E, Boelens R. Function and interactions of ERCC1-XPF in DNA damage response [J]. Molecules, 2018, 23(12): 3205.
- [19] Kaur K, Kaur R. Polymorphisms in ERCC1, ERCC4 and ERCC5 genes as biomarkers of susceptibility for pesticide-induced DNA damage in North-West Indian agricultural workers [J]. Biomarkers, 2023, 28(7): 672-679.
- [20] Obermann R, Yemane B, Jarvis C, et al. Small molecule antagonists of the DNA repair ERCC1/XPA protein-protein interaction [J]. ChemMedChem, 2024, 19(8): e202300648.
- [21] Zhang S, Wang L, Lu Y, et al. Targeting spleen tyrosine kinase (SYK): structure, mechanisms and drug discovery [J]. Drug Discovery Today, 2025, 30(1): 104257.
- [22] Sae-Khow K, Charoensappakit A, Udompornpitak K, et al. Syk inhibitor attenuates lupus in FcgammaRIIb^{-/-} mice through the inhibition of DNA extracellular traps from macrophages and neutrophils via p38MAPK-dependent pathway [J]. Cell Death Discovery, 2025, 11(1): 63.
- [23] McKenzie S E. Syk inhibition in ischemic stroke [J]. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2016, 36(6): 1054-1055.
- [24] van Eeuwijk J M, Stegner D, Lamb D J, et al. The novel oral syk inhibitor, BI1002494, protects mice from arterial thrombosis and thromboinflammatory brain infarction [J]. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2016, 36(6): 1247-1253.
- [25] Suzuki Y, Nakano Y, Mishiho K, et al. Involvement of Mincle and Syk in the changes to innate immunity after ischemic stroke [J]. Scientific Reports, 2013, 3: 3177.
- [26] Ma C, Li Y H, Tian M, et al. Gsalpha Regulates macrophage foam cell formation during atherosclerosis [J]. Circulation Research, 2024, 134(7): e34-e51.
- [27] Rojas D B, Vizuete A F K, de Andrade V S, et al. Lipopolysaccharide impairs neurodevelopment and induces changes in astroglial reactivity, antioxidant defenses and bioenergetics in the cerebral cortex of neonatal rats [J]. International Journal of Developmental Neuroscience, 2023, 83(7): 600-614.
- [28] Xiao R M, Pan J M, Yang M Y, et al. Regulating astrocyte phenotype by Lcn2 inhibition toward ischemic stroke therapy [J]. Biomaterials, 2025, 317: 123102.
- [29] He L F, Lu H L, Chu J Y, et al. Endothelial G protein stimulatory alpha-subunit is a critical regulator of post-ischemic angiogenesis [J]. Frontiers in Cardiovascular Medicine, 2022, 9: 941946.
- [30] Shao X M, Liu K, Fan Y, et al. Galphas relays sphingosine-1-phosphate receptor 1 signaling to stabilize vascular endothelial-cadherin at endothelial junctions to control mouse embryonic vascular integrity [J]. Journal of Genetics and Genomics, 2015, 42(11): 613-624.
- [31] Yu N, Ma S, Wu Z K, et al. Predictive value of cerebral perfusion and guanine nucleotide-binding protein, alpha-stimulating activity polypeptide in ischemic white matter lesions: a machine learning approach [J]. Frontiers in Neurology, 2025, 16: 1612379.
- [32] Hou Z X, Chen J, Yang H, et al. microRNA-26a shuttled by extracellular vesicles secreted from adipose-derived mesenchymal stem cells reduce neuronal damage through KLF9-mediated regulation of TRAF2/KLF2 axis [J]. Adipocyte, 2021, 10(1): 378-393.
- [33] Yu B B, Tian Y Z, Zhang Y F, et al. Experimental verification and validation of immune biomarkers based on chromatin regulators in ischemic stroke [J]. Frontiers in Genetics, 2022, 13: 992847.
- [34] Li K, Zhang C S, Wang L X, et al. KLF4's role in regulating nitric oxide production and promoting microvascular formation following ischemic stroke [J]. Nitric Oxide, 2025, 154: 86-104.
- [35] Li Y L, Liu C T, Fan H, et al. Gli2-induced lncRNA Peg13 al-

- leviates cerebral ischemia-reperfusion injury by suppressing Yy1 transcription in a PRC2 complex-dependent manner [J]. *Metabolic Brain Disease*, 2023;38(4): 1389-1404.
- [36] Fan B Y, Pan W L, Wang X L, et al. Long noncoding RNA mediates stroke-induced neurogenesis [J]. *Stem Cells*, 2020, 38(8): 973-985.
- [37] 杨小英, 阿拉帕特·阿布都古力, 徐军伟. 大动脉粥样硬化性缺血性脑卒中血清miR-7-5p和miR-200b-3p表达水平及其临床意义[J]. *临床研究*, 2025, 33(3): 1-6.
- Yang X Y, Alapat Abuduguli, Xu J W. Expression levels of serum miR-7-5p and miR-200b-3p in large artery atherosclerotic ischemic stroke and their clinical significance [J]. *Clinical Research*, 2025, 33(3): 1-6.
- [38] 胡瑞婷, 欧世宁, 覃东华, 等. 缺血性脑卒中患者外周血miRNA生物信息学分析研究[J]. *广西医学*, 2016, 38(6): 759-761,765.
- Hu R T, Ou S N, Qin D H, et al. Bioinformatics study of microRNA in peripheral blood of patients with ischemic stroke [J]. *Guangxi Medical Journal*, 2016, 38(6): 759-761,765.
- [39] 亓超, 李慧, 吴永亚, 等. 青年缺血性脑卒中病人血清miR-218-5p、LASP1水平及其应用价值[J]. *安徽医药*, 2025, 29(1): 156-159.
- Qi C, Li H, Wu Y Y, et al. Serum levels of miR-218-5p and LASP1 in young patients with ischemic stroke and their application value [J]. *Anhui Medical and Pharmaceutical Journal*, 2025, 29(1): 156-159.
- [40] Wong Y H, Wu C C, Lai H Y, et al. Identification of network-based biomarkers of cardioembolic stroke using a systems biology approach with time series data [J]. *BMC Systems Biology*, 2015, 9(S6): S4.
- [41] 李传朋, 高颖, 高永红, 等. 脑缺血再灌注损伤中钙超载相关通路研究进展[J]. *中国医药导报*, 2022, 19(12): 46-50.
- Li C P, Gao Y, Gao Y H, et al. Research progress on calcium overload related pathway in cerebral ischemia-reperfusion injury [J]. *China Medical Herald*, 2022, 19(12): 46-50.
- [42] Mei Y, Haijun Y, Chengfang Z, et al. The significance of low plasma miR-335 level in patients with acute cerebral infarction may be associated with the loss of control of CALM1 expression [J]. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 2016, 9(10): 19595-19601.