

DOI: 10.16781/j.CN31-2187/R.20240149

· 论 著 ·

寨卡病毒感染人神经母细胞瘤细胞的转录组分析

姚秋凤, 张力健, 高雅琪, 任 浩, 秦照玲*, 戚中田*

海军军医大学(第二军医大学)海军医学系生物医学防护教研室, 上海市医学生物防护重点实验室, 上海 200433

[摘要] **目的** 通过生物信息学技术分析寨卡病毒(ZIKV)感染人神经母细胞瘤细胞 SH-SY5Y 后的转录组数据, 拟找出参与 ZIKV 致病机制的潜在基因。**方法** 用 ZIKV 感染 SH-SY5Y 细胞, 提取细胞总 RNA 后用转录组测序技术分析筛选出差异常表达基因(DEG)。对 DEG 进行基因本体(GO)和京都基因与基因组百科全书(KEGG)富集分析, 预测 DEG 主要参与的生物学过程、分子功能和信号通路, 最后通过 qPCR 进行验证。**结果** 共鉴定出 259 个 DEG, 包括 172 个上调基因和 87 个下调基因。GO 功能富集分析显示, DEG 主要与细胞外基质、刺激应答、抗微生物体液反应、发育过程相关; KEGG 通路富集分析显示, DEG 主要与炎症反应、免疫反应有关。DEG 的 qPCR 验证结果与转录组测序结果基本一致。**结论** ZIKV 感染 SH-SY5Y 细胞后参与细胞外基质、刺激应答、调控炎症反应的基因表达显著改变, 说明 ZIKV 可能通过重塑细胞外基质及调控炎症反应引起神经系统病变。

[关键词] 寨卡病毒; 神经病变; 高通量测序; 转录组分析

[引用本文] 姚秋凤, 张力健, 高雅琪, 等. 寨卡病毒感染人神经母细胞瘤细胞的转录组分析[J]. 海军军医大学学报, 2024, 45(12): 1508-1520. DOI: 10.16781/j.CN31-2187/R.20240149.

Transcriptome analysis of human neuroblastoma cells infected with Zika virus

YAO Qiufeng, ZHANG Lijian, GAO Yaqi, REN Hao, QIN Zhaoling*, QI Zhongtian*

Department of Biomedical Defense, Faculty of Naval Medicine, Naval Medical University (Second Military Medical University); Shanghai Key Laboratory of Medical Bioprotection, Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To analyze the transcriptome data of Zika virus (ZIKV)-infected human neuroblastoma cells SH-SY5Y by bioinformatics method, and to identify the potential genes involved in the pathogenic mechanism of ZIKV. **Methods** SH-SY5Y cells were infected with ZIKV. The total RNA was extracted and the differentially expressed genes (DEGs) were screened by transcriptome sequencing. Gene Ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) enrichment analyses were performed to predict the biological processes, molecular functions, and signaling pathways mainly involved in the DEGs, and the results were verified by quantitative polymerase chain reaction (qPCR). **Results** A total of 259 DEGs were identified, including 172 up-regulated genes and 87 down-regulated genes. GO functional enrichment analysis showed that the DEGs were mainly related to extracellular matrix, response to stimulus, antimicrobial humoral response, and developmental process. KEGG pathway enrichment analysis revealed that the DEGs were predominantly associated to inflammatory reaction and immune response. The qPCR validation results of DEGs were basically consistent with the transcriptome sequencing results. **Conclusion** The expression of genes involved in extracellular matrix, response to stimulus, and regulation of inflammatory reaction is significantly altered in SH-SY5Y cells after ZIKV infection, suggesting that ZIKV may cause neurological lesions by remodeling the extracellular matrix and regulating inflammatory reaction.

[Key words] Zika virus; neuropathy; high-throughput sequencing; transcriptome analysis

[Citation] YAO Q, ZHANG L, GAO Y, et al. Transcriptome analysis of human neuroblastoma cells infected with Zika virus[J]. Acad J Naval Med Univ, 2024, 45(12): 1508-1520. DOI: 10.16781/j.CN31-2187/R.20240149.

寨卡病毒(Zika virus, ZIKV)是引起寨卡病毒病的病原体, 主要通过伊蚊叮咬、母婴垂直途径、性接触、血液或血液制品等进行传播, 感染后常见的临床症状包括发热、头痛、皮疹、关节痛和结膜炎等。此外, ZIKV 感染还与多种神经系统并

发症有关, 如新生儿小头畸形、吉兰-巴雷综合征及脑膜脑炎等^[1]。目前, 对 ZIKV 感染尚无有效的治疗药物和疫苗, 只能采取对症支持治疗。深入探索 ZIKV 的致病机制可为抗病毒药物研发和临床治疗提供科学依据。

[收稿日期] 2024-03-05 **[接受日期]** 2024-05-07

[作者简介] 姚秋凤, 硕士生. E-mail: yqf_999@163.com

*通信作者(Corresponding authors). Tel: 021-81870990, E-mail: zhlingqin@smmu.edu.cn; Tel: 021-81870988, E-mail: qizt@smmu.edu.cn

转录组测序技术又称 RNA-seq 技术, 是近年来发展较为成熟的一种高通量测序技术, 也是研究病毒与宿主细胞相互作用的重要手段。已有学者利用转录组测序技术在 ZIKV 感染的不同细胞和动物模型中开展了基因转录水平分析及相关机制研究, 如有研究发现 ZIKV 感染非洲绿猴肾细胞 Vero 后能诱导细胞凋亡, 差异表达基因 (differentially expressed gene, DEG) 主要富集于凋亡相关信号通路^[2]; 而 ZIKV 感染人神经母细胞瘤细胞 SH-SY5Y 后, 参与线粒体损伤和细胞凋亡的基因显著上调, 并观察到 ZIKV 包膜蛋白 E 与线粒体共定位的现象^[3]; 利用 ZIKV 感染小鼠胚胎脑组织进行的转录组分析数据显示, ZIKV 感染诱导的 DEG 主要与免疫反应有关^[4]。然而, 关于 ZIKV 感染诱导神经细胞损伤的机制尚未阐明, 有必要进一步对 ZIKV 感染的神经细胞开展转录组学研究。

本研究应用转录组测序技术对 ZIKV 感染的 SH-SY5Y 细胞进行转录组分析, 以未感染病毒的细胞作为对照, 筛选出 ZIKV 感染诱导的 DEG, 并进一步分析 DEG 的功能及它们在 ZIKV 感染过程中可能参与的生物学过程和信号途径, 以期从分子水平了解 ZIKV 感染人神经细胞后的宿主反应特点, 为后续深入研究 ZIKV 感染引起宿主神经系统病变的分子机制奠定基础。

1 材料和方法

1.1 实验材料与仪器 人神经母细胞瘤细胞 SH-SY5Y、人脐静脉内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cell, HUVEC)、人肺癌肺泡基底上皮细胞 A549、人肝癌细胞 Huh7 均为本教研室保存。SH-SY5Y、HUVEC、A549、Huh7 采用 DMEM 完全培养基培养。ZIKV (GZ01 菌株) 由北京微生物与流行病学研究所秦成峰教授提供。DMEM 和 FBS 购于美国 ThermoFisher Scientific 公司; 裂解液 RNAiso、PrimeScript 反转录试剂盒、TB Green qPCR 检测试剂盒购于日本 TaKaRa 公司; 裂解缓冲液、带有 Oligo (dT) 的磁珠、Agilent 2100 生物分析仪、Illumina HiSeq 平台均由上海中科新生命生物科技有限公司提供; 7300 Plus qPCR 仪、96 孔或 8 连排 qPCR 反应板购于美国 Applied Biosystems 公司。

1.2 转录组样品提取与检测 首先将 SH-SY5Y 细

胞种于 6 个 10 cm² 平皿, 每 3 个平皿为 1 组, 共分为 2 组 (感染组和对照组)。待第 2 天细胞密度达到 80%~90% 时, 用 ZIKV 以感染复数 (multiplicity of infection, MOI) 为 1 感染 SH-SY5Y 细胞, 对照组加入等体积的 DMEM, 于 37 °C 用含 5% CO₂ 培养箱培养 2 h 后, 弃去病毒液和对照培养基, 换成新鲜培养基。根据前期预实验结果及 ZIKV 感染 SH-SY5Y 细胞后不同时间点的细胞状态和关键细胞途径 (如信号转导、自噬、脂代谢等) 活化情况, 将两组细胞继续培养至 24 h, 弃去培养基, 加入 PBS 洗涤细胞 2 次, 用 1 mL RNAiso 裂解细胞, 提取细胞总 RNA。对照组细胞样品命名为 SY-1、SY-2、SY-3, 感染组样品命名为 SY-4、SY-5、SY-6。用 Agilent 2100 生物分析仪检测 RNA 样品的纯度、浓度及 RNA 的完整性, RNA 完整性指数 > 8 可进行后续分析。

1.3 文库构建与转录组测序 样品经检测合格后, 用带有 Oligo (dT) 的磁珠富集真核生物的 mRNA。随后加入裂解缓冲液将 mRNA 进行随机打断。以 mRNA 为模板反转录合成 cDNA, 将双链 cDNA 纯化后再进行末端修复、加 A 尾并连接测序接头, 最后进行体外 PCR 扩增得到 cDNA 文库。文库构建完成后, 对文库的插入片段长度和有效浓度进行检测, 以保证文库质量。质检合格后, 采用 Illumina HiSeq 平台对 cDNA 文库进行转录组测序。

1.4 测序数据质量评估 为确保后续分析的质量和可靠性, 需对测序结果进行质检, 主要包括去除接头序列及过滤掉低质量 (碱基平均质量值 < 20) 和无法确定的碱基数量 > 5 的读数。同时对净读数进行碱基质量值和 GC 含量计算。

1.5 DEG 的筛选 采用 DESeq2 软件进行两组之间基因的差异表达分析。将 $P < 0.05$ 、 $|\log_2(\text{差异倍数})| > 1$ 作为 DEG 的筛选标准。

1.6 DEG 的功能注释及富集分析 对筛选出的 DEG 进行基因本体 (Gene Ontology, GO) 功能注释分析和分类。然后将所有 DEG 与参考基因的 GO 功能注释结果进行对比, 通过 Fisher 确切概率法分析选出所有 DEG 富集的功能类别 (筛选标准为 $P < 0.05$)。通过京都基因与基因组百科全书 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) 数据库预测 DEG 参与的信号通路和细胞途径。最后用分子相互作用分析工具 STRING (<https://cn.string->

db.org/) 预测 DEG 编码的蛋白质之间的相互作用。

1.7 qPCR 验证 根据 DEG 分析结果, 挑选 6 个上调基因、5 个下调基因进行 qPCR 验证。用 ZIKV 以 MOI 为 1 感染 SH-SY5Y、HUVEC、A549、Huh7 细胞 24 h, 提取 ZIKV 感染及未感染细胞的总 RNA, 用反转录试剂盒进行反转录获得 cDNA, 然后使用 TB Green qPCR 检测试剂盒进行 qPCR 扩增。扩增反应体系为上下游引物各 0.4 μL、cDNA 2 μL、TB Green Premix Ex Taq DNA 聚合酶 10 μL、

ROX 参 考 染 料 (ROX Reference Dye) 0.4 μL、ddH₂O 6.8 μL。引物序列见表 1。qPCR 反应程序: 95 °C 预变性 30 s; 95 °C 5 s, 60 °C 30 s, 反应 40 个循环; 溶解反应 95 °C 15 s, 60 °C 1 min, 95 °C 15 s。以 *GAPDH* 为内参, 目的基因的相对表达水平采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算, 其中 $\Delta\Delta C_t = (C_{t_{\text{目的基因}}} - C_{t_{\text{内参基因}}})_{\text{感染组}} - (C_{t_{\text{目的基因}}} - C_{t_{\text{内参基因}}})_{\text{空白对照组}}$ 。通过双侧独立样本 *t* 检验进行组间分析, 检验水准 (α) 为 0.05。

表 1 基因引物序列 (5'-3')

Tab 1 Gene primer sequences (5'-3')

Gene	Forward primer	Reverse primer
<i>GAPDH</i>	TGGGCTACACTGAGCACCAG	AAGTGGTCGTTGAGGGCAAT
<i>KLF15</i>	GCTTGCCCGAGTTTCCTTTG	ATGGAGGTGGCTCTTGTGTG
<i>CHAC1</i>	ATACCAAGTGCAAGGGGAGC	CAGTGGTTGGTCAGGAGCAT
<i>INHBE</i>	TCTTGGACACAGCAGGACAC	CAGTATCCAGTCCCGCCATC
<i>GADD45G</i>	GGACACAGTTCGGGAAAGCA	TTTGGCTGACTCGTAGACGC
<i>NR1D1</i>	GTGACAACCTCCAATGGCAGC	CTGGGTGGAATGCTCCCAAA
<i>BGN</i>	GACCTGCTTCGCTACTCCAA	GCTCCCGTTCTCGATCATCC
<i>MAGED4B</i>	GACGGAGATTTTGGCGATGC	AGCATTCTGGTCCGGATGG
<i>NAP1L5</i>	GAGGAGGTAATGGCGGAAGG	CATTTTTCGGCTTTGGGGCA
<i>TMEM35A</i>	TCGGTGATCCTCTCAAACGC	AGGGTTGCTCCTCAGCATTC
<i>STAT5A</i>	GGAACCTTTACGCCGACCAA	AGAGGTGAAAAGACCGGCAG
<i>NCAM2</i>	ATCACAACAGGCAAGGTCTCT	GTCTCTGGTTGCCCTTCTTCA

GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; KLF15: Kruppel like factor 15; CHAC1: ChaC glutathione specific γ -glutamylcyclotransferase 1; INHBE: Inhibin subunit β E; GADD45G: Growth arrest and DNA damage inducible γ ; NR1D1: Nuclear receptor subfamily 1 group D member 1; BGN: Biglycan; MAGED4B: Melanoma antigen family member D4B; NAP1L5: Nucleosome assembly protein 1 like 5; TMEM35A: Transmembrane protein 35A; STAT5A: Signal transducer and activator of transcription 5A; NCAM2: Neural cell adhesion molecule 2.

2 结 果

2.1 测序数据及其质量分析 利用 Illumina HiSeq 平台共检测了 2 组样品 (ZIKV 感染组和对照组, 每组样品各有 3 个重复), 每组样品平均有 11.84 Gb

的数据。如表 2 所示, ZIKV 感染组和对照组的原始测序数据经过滤后, 碱基质量值 Q20 均 > 98%, Q30 均 > 95%, GC 含量约为 50%, 表明经质控后获得了高质量的测序数据, 可用于后续分析。

表 2 测序数据质量分析结果

Tab 2 Quality analysis results of sequencing data

Sample	Raw_reads	Clean_reads	Clean_bases/Gb	Error/%	Q20/%	Q30/%	GC/%
SY-1	89 897 222	88 756 300	13.26	0.04	98.21	95.17	50.68
SY-2	83 510 106	82 549 198	12.33	0.04	98.33	95.46	50.51
SY-3	73 265 274	72 367 524	10.80	0.04	98.37	95.57	50.69
SY-4	80 738 530	79 809 852	11.90	0.04	98.39	95.64	50.55
SY-5	84 189 520	83 148 156	12.41	0.04	98.35	95.54	51.11
SY-6	70 087 366	69 296 404	10.32	0.04	98.43	95.75	50.08

SY-1, -2, and -3 were control cell samples and SY-4, -5, and -6 were Zika virus-infected cell samples. Q20: Phred quality score 20; Q30: Phred quality score 30; GC: Guanine and cytosine.

2.2 ZIKV 感染组与对照组 DEG 的筛选 本次转录组测序共检测了 38 196 个基因, 其中 27 455 个

为已知基因, 10 741 个是新基因。在 ZIKV 感染组和对照组中均能检测到的基因共有 32 162 个, 非共

有基因为 6 034 个 (ZIKV 感染组和对照组分别为 3 044 和 2 990 个)。差异表达分析结果显示, ZIKV 感染 SH-SY5Y 细胞后, 共检测到 259 个 DEG, 其中 172 个基因表达上调, 87 个基因表达下调。DEG 在 6 个不同样品中的表达情况见图 1A。与对照组相比, ZIKV 感染后表达上调的前 10 个基因为纤维调节蛋白 (fibromodulin, *FMOD*)、骨膜蛋白 (periostin, *POSTN*)、Kruppel 样因子 15 (Kruppel like factor 15, *KLF15*)、ChaC 谷胱甘肽特异性 γ -谷氨酰转移酶 1 (ChaC glutathione specific γ -glutamylcyclotransferase 1, *CHAC1*)、抑制素亚基 β E (inhibin subunit β E, *INHBE*)、生长停滞和 DNA 损伤诱导 γ (growth arrest and DNA damage inducible γ , *GADD45G*)、核受体亚家族 1 D 组成员 1 (nuclear receptor subfamily 1 group D member 1, *NR1D1*)、中胚层特异性转录本 (mesoderm specific transcript, *MEST*)、转运 RNA-yW 合成蛋白 1 同源物 B (transfer RNA-yW synthesizing protein 1 homolog B, *TYW1B*)、睾丸表达 14 细胞间桥形成因子 (testis expressed 14,

intercellular bridge forming factor; *TEX14*) , 表达下调的前 10 个基因为肌球蛋白重链 6 (myosin heavy chain 6, *MYH6*)、富含脯氨酸的蛋白 33 (proline rich 33, *PRR33*)、角蛋白 75 (keratin 75, *KRT75*)、跨膜蛋白 35A (transmembrane protein 35A, *TMEM35A*)、肽酶抑制因子 3 (peptidase inhibitor 3, *PI3*)、母系表达基因 9 (maternally expressed 9, *MEG9*)、基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase, *MMP*) 12、信号转导及转录激活因子 5A (signal transducer and activator of transcription 5A, *STAT5A*)、细胞色素 P450 家族 24 亚家族 A 成员 1 (cytochrome P450 family 24 subfamily A member 1, *CYP24A1*)、Kelch 样家族成员 4 (Kelch-like family member 4, *KLHL4*) , 见表 3。对 DEG 进行聚类分析, 结果显示, ZIKV 感染后的 DEG 可以划分成 12 个功能组别, 其中主要功能组别与细胞过程、生物调节、细胞代谢过程及刺激应答有关, 分别占总数的 28.07%、21.93%、14.91% 和 11.40% (图 1B)。

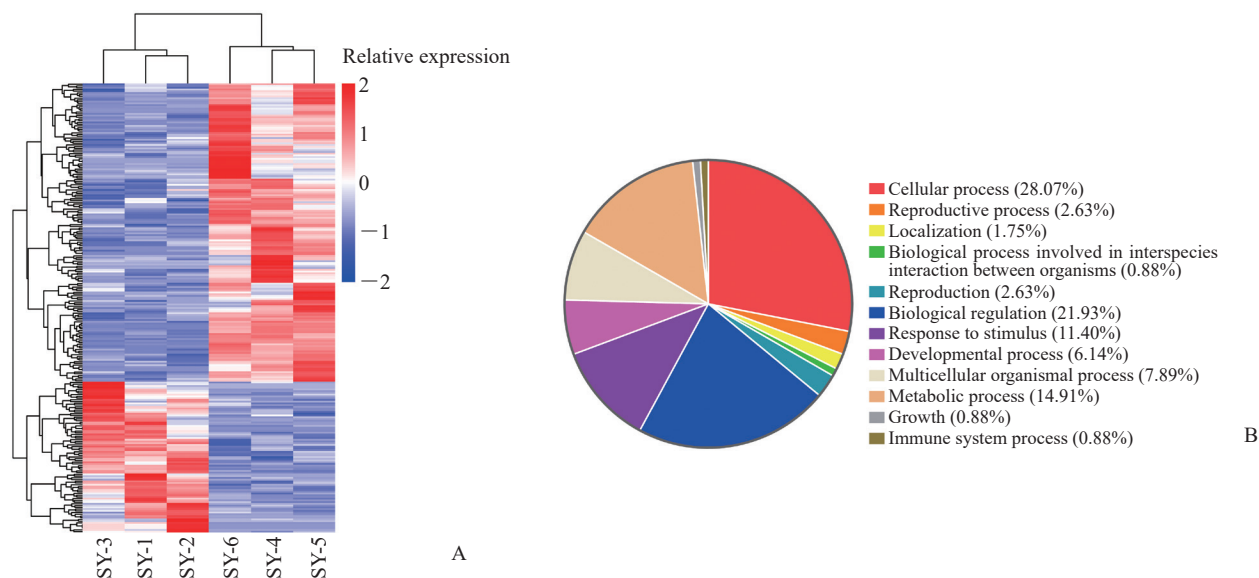


图 1 ZIKV 感染组与对照组 SH-SY5Y 细胞的差异表达基因分析

Fig 1 Differentially expressed genes between control and ZIKV-infected SH-SY5Y cells

A: Cluster map of the differentially expressed genes (highly expressed genes were indicated in red and lowly expressed genes were indicated in blue); B: Categories of biological process of the differentially expressed genes. SY-1, -2, and -3 were control cell samples and SY-4, -5, and -6 were ZIKV-infected cell samples. ZIKV: Zika virus.

2.3 ZIKV 感染细胞中 DEG 的 GO 功能注释及富集分析 ZIKV 感染后出现的 DEG 共涉及 2 730 个 GO 条目, 显著富集的 GO 条目有 552 个, 其中涉

及生物学过程的注释量最多, 高达 451 个条目, 主要集中在刺激应答、多细胞有机体过程、发育过程等方面, 分别包括 48、42 和 41 个 DEG; 涉及

分子功能的 GO 条目有 66 个, 涉及细胞组分的 GO 条目有 35 个。GO 功能富集分析显示, ZIKV 感染后出现的 DEG 主要与细胞外基质 (extracellular

matrix, ECM)、细胞外包裹性结构、细胞外结构组织、细胞外间隙、抗微生物体液免疫反应等有关 (图 2A)。

表 3 ZIKV 感染 SH-SY5Y 细胞后表达上调和下调的前 10 个基因

Tab 3 Top 10 up- and down-regulated genes in SH-SY5Y cells after ZIKV infection				
Trend	Gene	Description	log ₂ (FC)	P value
Up	<i>FMOD</i>	Fibromodulin	4.11	5.63×10^{-39}
	<i>POSTN</i>	Periostin	3.87	2.14×10^{-37}
	<i>KLF15</i>	Kruppel like factor 15	1.35	2.54×10^{-24}
	<i>CHAC1</i>	ChaC glutathione specific γ -glutamylcyclotransferase 1	1.77	1.30×10^{-22}
	<i>INHBE</i>	Inhibin subunit β E	1.26	1.03×10^{-19}
	<i>GADD45G</i>	Growth arrest and DNA damage inducible γ	1.38	5.39×10^{-19}
	<i>NR1D1</i>	Nuclear receptor subfamily 1 group D member 1	1.05	9.27×10^{-18}
	<i>MEST</i>	Mesoderm specific transcript	2.17	5.10×10^{-13}
	<i>TYW1B</i>	tRNA-yW synthesizing protein 1 homolog B	1.13	1.53×10^{-8}
	<i>TEX14</i>	Testis expressed 14, intercellular bridge forming factor	1.07	2.27×10^{-8}
Down	<i>MYH6</i>	Myosin heavy chain 6	-3.13	9.24×10^{-4}
	<i>PRR33</i>	Proline rich 33	-2.01	2.05×10^{-3}
	<i>KRT75</i>	Keratin 75	-5.11	2.60×10^{-3}
	<i>TMEM35A</i>	Transmembrane protein 35A	-1.92	3.24×10^{-3}
	<i>PI3</i>	Peptidase inhibitor 3	-1.23	4.49×10^{-3}
	<i>MEG9</i>	Maternally expressed 9	-3.94	4.64×10^{-3}
	<i>MMP12</i>	Matrix metalloproteinase 12	-1.44	9.56×10^{-3}
	<i>STAT5A</i>	Signal transducer and activator of transcription 5A	-1.46	1.06×10^{-2}
	<i>CYP24A1</i>	Cytochrome P450 family 24 subfamily A member 1	-1.90	1.23×10^{-2}
	<i>KLHL4</i>	Kelch like family member 4	-4.72	1.24×10^{-2}

ZIKV: Zika virus; FC: Fold change.

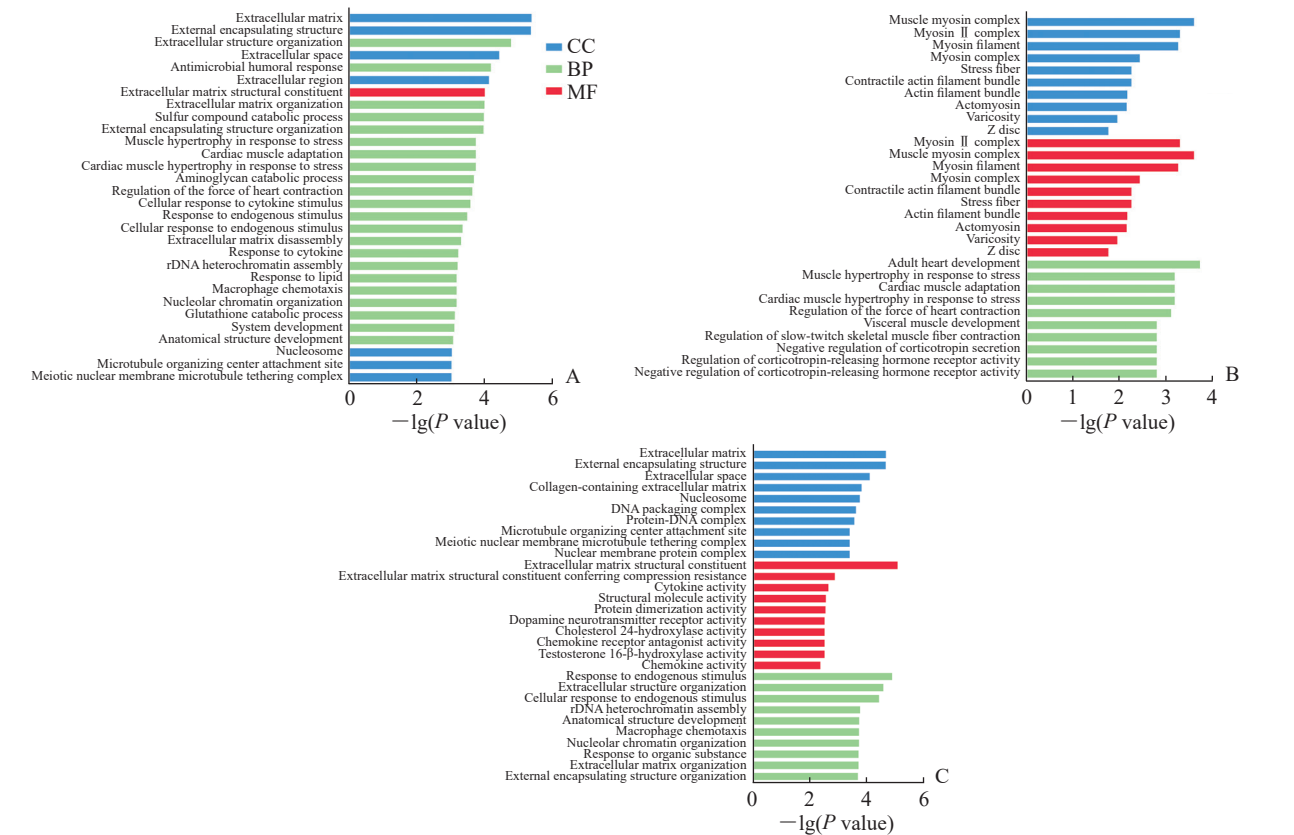


图 2 DEG 的 GO 功能富集分析

Fig 2 GO functional enrichment analysis of DEGs

A: GO enrichment analysis of total DEGs; B: GO enrichment analysis of down-regulated genes; C: GO enrichment analysis of up-regulated genes. DEG: Differentially expressed gene; GO: Gene Ontology; CC: Cellular component; BP: Biological process; MF: Molecular function.

对上调与下调的 DEG 分别进行 GO 富集分析, 结果如图 2B、2C 所示。下调 DEG 涉及的细胞组分主要与肌球蛋白复合物、肌球蛋白丝、应力纤维有关; 分子功能涉及较广, 主要与微丝运动活动、转移酶活性、酶结合、蛋白质结合、蛋白质活性有关; 主要参与心脏发育、应激导致的心肌肥大、心肌适应、心脏收缩力调节等生物学过程。上调 DEG 涉及的细胞组分主要与细胞外结构有关, 包括 ECM、细胞外包裹性结构、细胞外间隙、含胶原蛋白的 ECM 等; 分子功能主要与 ECM 结构成分及其赋予的抗压性、细胞因子活性、结构分子活性、蛋白质二聚体化活性有关; 生物学过程主要与细胞对内源性刺激的反应、细胞外结构组织、核糖体 DNA 异染色质组装、巨噬细胞趋化性等有关。以上结果提示 ZIKV 感染神经细胞后, 可能通过抑制宿主细胞骨架重排、增加细胞外具有免疫调节活性成分、重塑 ECM 结构来调节病毒感染活性。

2.4 ZIKV 感染细胞中 DEG 的 KEGG 通路富集分析 KEGG 通路富集分析发现 DEG 注释到具体的代谢途径共有 122 条。按 *P* 值从小到大排序, 对 DEG 富集的途径及富集程度进行制图, 结果如图 3 所示。富集的代谢途径包括类风湿关节炎、酒精中毒、系统性红斑狼疮、环磷酸鸟苷 (cyclic

guanosine monophosphate, cGMP) - 蛋白激酶 G (protein kinase G, PKG) 信号通路、中性粒细胞外陷阱形成、甲型流感、脂质和动脉粥样硬化、神经活性配体-受体相互作用、癌症通路、代谢途径、IL-17 信号通路等。本实验数据中显著富集的通路主要与炎症反应和自身免疫相关, 如与类风湿关节炎有关的 DEG 有 Fos 原癌基因 AP-1 转录因子亚基 (Fos proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit; *FOS*)、*MMP1*、C-X-C 基序趋化因子配体 2 (C-X-C motif chemokine ligand 2, *CXCL2*)、C-C 基序趋化因子配体 5 (C-C motif chemokine ligand 5, *CCL5*)、与系统性红斑狼疮有关的 DEG 有 H4 簇状组蛋白 11 (H4 clustered histone 11, *H4C11*)、H3 簇状组蛋白 13 (H3 clustered histone 13, *H3C13*)、H2A 簇状组蛋白 18 (H2A clustered histone 18, *H2AC18*)、H4 簇状组蛋白 15 (H4 clustered histone 15, *H4C15*)、参与 IL-17 信号通路的 DEG 有 *FOS*、*CXCL2*、*MMP1*、与甲型流感病毒感染有关的 DEG 包括丝氨酸蛋白酶 1 (serine protease 1, *PRSSI*)、多聚腺苷酸结合蛋白核 1 样蛋白 (PABPN1 like, cytoplasmic; *PABPNIL*)、丝氨酸蛋白酶 2 (serine protease 2, *PRSS2*)、*CCL5* (表 4)。

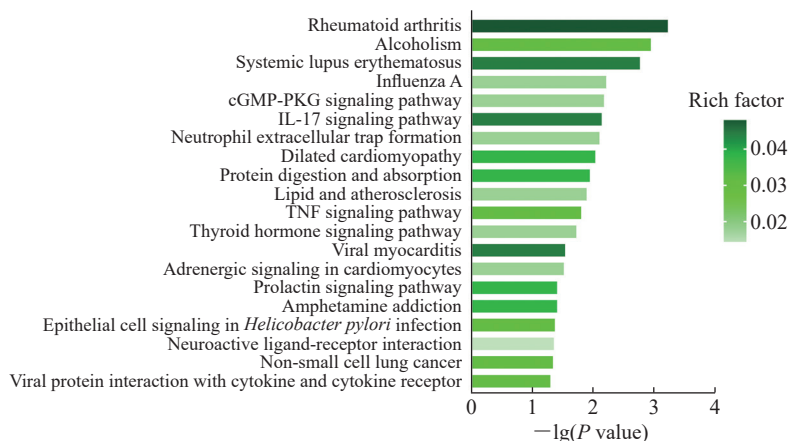


图 3 差异表达基因的 KEGG 通路富集分析

Fig 3 KEGG pathway enrichment analysis of differentially expressed genes

KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes; cGMP: Cyclic guanosine monophosphate; PKG: Protein kinase G; IL-17: Interleukin-17; TNF: Tumor necrosis factor.

2.5 DEG 的蛋白质-蛋白质相互作用网络分析 利用 STRING 分析部分 DEG 之间存在的潜在相互作用, 结果显示, 有 32 个 DEG 编码的蛋白质存在相互作用, 包括 24 个上调基因和 8 个下调基因编码的蛋白质。根据 K-means 聚类将相互作用网络

分为三部分, 如图 4 所示, 其中红色部分主要与 ECM 和细胞外区域有关, 包括 FMOD、富含亮氨酸小蛋白 (biglycan, BGN)、基质重塑相关蛋白 5 (matrix remodeling associated 5, MXRA5)、POSTN、XI 型胶原蛋白 $\alpha 1$ 链 (collagen type XI

α 1 chain, COL11A1)、MMP1、MMP12、壳多糖酶 3 样蛋白 1 (chitinase 3 like 1, CHI3L1)、表面活性蛋白 D (surfactant protein D, SFTPD)、PRSS2、PRSS1、HtrA 丝氨酸蛋白酶 4 (HtrA serine peptidase 4, HTRA4)、CCL5、趋化素趋化因子样受体 1 (chemerin chemokine-like receptor 1, CMKLR1) 共 14 个候选蛋白质; 绿色部分主要与细胞对内源性刺激的反应及炎症反应有关, 包括 FOS、CXCL2、WAP 四二硫键核心结构域 12 (WAP four-disulfide

core domain 12, WFDC12)、PI3、STAT5A、CHAC1、GADD45G、INHBE、KLF15、多巴胺受体 D1 (dopamine receptor D1, DRD1)、H4C11、H4C15、H3C13、H2AC18 共 14 个候选蛋白质; 蓝色部分为肌球蛋白重链 7 (myosin heavy chain 7, MYH7)、利尿钠肽 B (natriuretic peptide B, NPPB)、MYH6、受磷蛋白 (phospholamban, PLN) 共 4 个候选蛋白组成的相互作用网络, 主要与组织发育、cGMP-PKG 信号通路有关。

表 4 KEGG 显著富集信号通路及其差异表达基因

Tab 4 Significant enrichment of KEGG pathways and their corresponding differentially expressed genes		
KEGG ID	Pathway description	Gene
hsa05323	Rheumatoid arthritis	FOS, MMP1, CXCL2, CCL5
hsa05034	Alcoholism	H4C11, DRD1, H3C13, H2AC18, H4C15
hsa05322	Systemic lupus erythematosus	H4C11, H3C13, H2AC18, H4C15
hsa05164	Influenza A	PRSS1, PABPN1L, PRSS2, CCL5
hsa04022	cGMP-PKG signaling pathway	MYH7, PLN, MYH6, NPPB
hsa04657	IL-17 signaling pathway	FOS, MMP1, CXCL2
hsa04613	Neutrophil extracellular trap formation	H4C11, H3C13, H2AC18, H4C15
hsa05414	Dilated cardiomyopathy	MYH7, PLN, MYH6
hsa04974	Protein digestion and absorption	PRSS1, COL11A1, PRSS2
hsa05417	Lipid and atherosclerosis	FOS, MMP1, CXCL2, CCL5

KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes; cGMP: Cyclic guanosine monophosphate; PKG: Protein kinase G; IL-17: Interleukin-17; FOS: Fos proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit; MMP1: Matrix metalloproteinase 1; CXCL2: C-X-C motif chemokine ligand 2; CCL5: C-C motif chemokine ligand 5; H4C11: H4 clustered histone 11; DRD1: Dopamine receptor D1; H3C13: H3 clustered histone 13; H2AC18: H2A clustered histone 18; H4C15: H4 clustered histone 15; PRSS1: Serine protease 1; PABPN1L: PABPN1 like, cytoplasmic; PRSS2: Serine protease 2; MYH7: Myosin heavy chain 7; PLN: Phospholamban; MYH6: Myosin heavy chain 6; NPPB: Natriuretic peptide B; COL11A1: Collagen type XI α 1 chain.

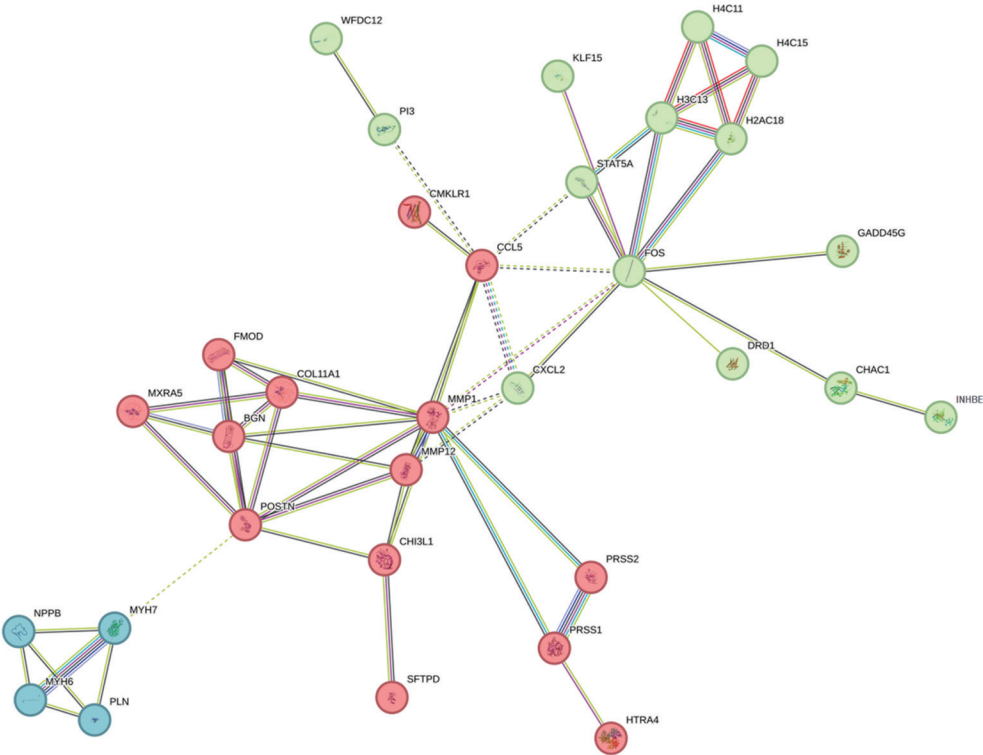


图 4 差异表达基因的 STRING 蛋白质 - 蛋白质相互作用网络分析

Fig 4 STRING protein-protein interaction network analysis of differentially expressed genes

2.6 ZIKV 感染细胞中 DEG 的 qPCR 验证 选择 6 个上调基因 (*KLF15*、*CHAC1*、*INHBE*、*GADD45G*、*NR1D1*、*BGN*) 和 5 个下调基因 [神经细胞黏附分子 2 (neural cell adhesion molecule 2, *NCAM2*)、黑色素瘤抗原家族成员 D4B (melanoma antigen family member D4B, *MAGED4B*)、核小体组装蛋

白 1 样蛋白 5 (nucleosome assembly protein 1 like 5, *NAP1L5*)、*TMEM35A*、*STAT5A*] 进行 qPCR 检测, 结果如图 5A 所示。通过将 qPCR 结果与转录组测序结果进行比对, 发现除了 *BGN*, 其他基因在两组实验结果中的变化趋势基本一致, 表明本次测序结果可靠。

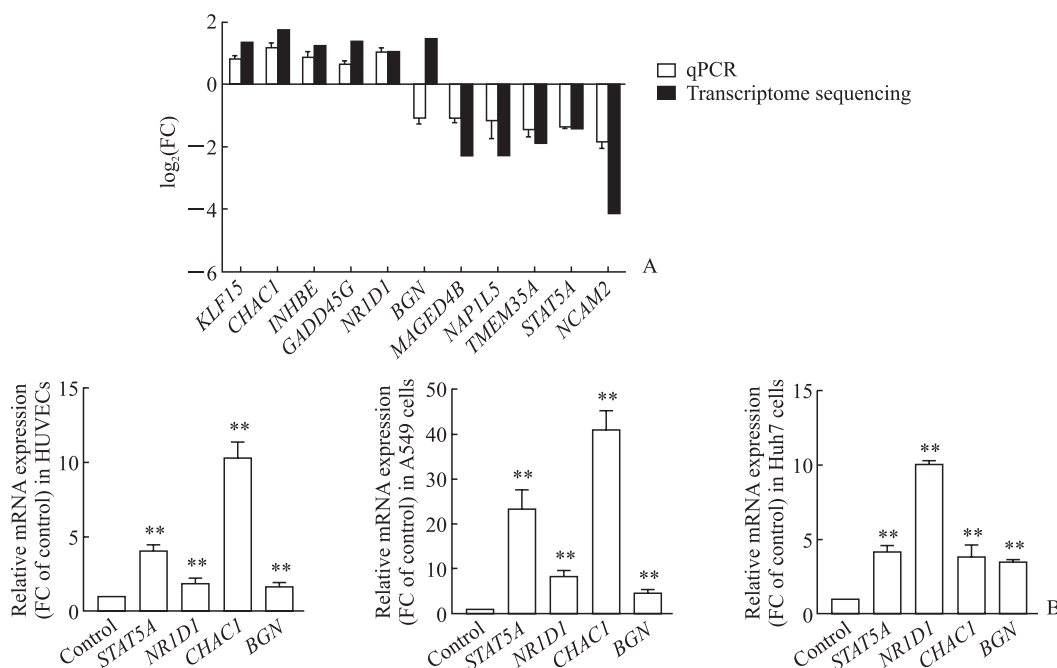


图 5 qPCR 对转录组测序结果的验证

Fig 5 qPCR validation for transcriptome sequencing results

A: Comparison of qPCR and transcriptome sequencing results; B: qPCR results of DEGs in different cells. ** $P < 0.01$ vs control. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. qPCR: Quantitative polymerase chain reaction; FC: Fold change; *KLF15*: Kruppel like factor 15; *CHAC1*: ChaC glutathione specific γ -glutamylcyclotransferase 1; *INHBE*: Inhibin subunit β E; *GADD45G*: Growth arrest and DNA damage inducible γ ; *NR1D1*: Nuclear receptor subfamily 1 group D member 1; *BGN*: Biglycan; *MAGED4B*: Melanoma antigen family member D4B; *NAP1L5*: Nucleosome assembly protein 1 like 5; *TMEM35A*: Transmembrane protein 35A; *STAT5A*: Signal transducer and activator of transcription 5A; *NCAM2*: Neural cell adhesion molecule 2; HUVEC: Human umbilical vein endothelial cell.

为确认 DEG 在 ZIKV 感染不同人源细胞样品中是否具有相同的变化趋势, 挑选 4 个 DEG (*NR1D1*、*STAT5A*、*CHAC1*、*BGN*, 分别与炎症反应、信号转导、刺激应答和 ECM 相关), 检测它们在不同细胞感染 ZIKV 后的表达水平。结果 (图 5B) 显示, 这 4 个基因在 ZIKV 感染不同细胞中呈现出不同的变化规律。例如, 与对照组相比, *STAT5A* 转录水平在 ZIKV 感染的 SH-SY5Y 细胞中下降了 2.60 倍, 但在 ZIKV 感染的 HUVEC、A549、Huh7 细胞中其转录水平均升高, 尤其是在 A549 细胞中, *STAT5A* 转录水平在 ZIKV 感染后上升了 23.35 倍; *NR1D1* 和 *CHAC1* 在 ZIKV 感染不同细胞后基因表达水平均升高; 尽管 *BGN* 在转录

组测序结果中显示上调了 2.77 倍, 在 qPCR 检测的 ZIKV 感染的 HUVEC、A549、Huh7 细胞中其转录水平也分别升高了 1.68 倍、4.57 倍和 3.46 倍, 但 qPCR 检测的该基因转录水平在 ZIKV 感染的 SH-SY5Y 细胞中下降了 2.11 倍。

3 讨论

大多数成年人感染 ZIKV 后无明显症状, 20%~25% 的患者出现自限性发热性疾病、关节痛、皮疹和结膜炎, 并可能出现神经系统并发症, 如吉兰-巴雷综合征、脊髓炎及脑膜脑炎^[5]。先天性感染 ZIKV 可引起胎儿发育迟缓或新生儿小头畸形等^[6]。目前关于 ZIKV 感染导致神经病变的分

子机制尚不完全清楚。本研究选用 SH-SY5Y 细胞作为转录组分析对象,以期为研究 ZIKV 感染致神经病变机制提供候选基因。

本研究通过转录组测序技术分析发现, ZIKV 感染神经细胞后有 259 个基因存在差异表达,包括 172 个上调基因和 87 个下调基因。通过 GO 富集分析得知, DEG 主要与 ECM、抗微生物免疫反应相关。ECM 是存在于细胞间隙中的非细胞成分,它不仅能为细胞存活提供必要的物理支架,还与细胞再生、修复及免疫密切相关^[7]。ECM 中的蛋白质种类较多,包括胶原蛋白、纤连蛋白、层粘连蛋白、糖胺聚糖、蛋白聚糖和重塑酶等,其中胶原蛋白是 ECM 的主要成分,约占总蛋白质的 30%。分析本次转录组测序数据,与 ECM 相关的 DEG 包括 *COL11A1*、*BGN*、*CHI3L1*、*POSTN*、*FMOD*、*SFTPD*、*CXCL2*、*MMP12*、*PI3*、*PRSS1*、*PRSS2* 等,从蛋白质-蛋白质相互作用网络分析结果可看出这些基因编码的蛋白质之间存在明显的相互作用。

COL11A1 基因编码的是一种纤维状胶原蛋白,是结缔组织尤其是角膜和巩膜组织重要的结构蛋白,该基因突变可导致多种与眼球有关的疾病,如 Stickler 综合征 II 型和 Marshall 综合征等^[8]。*FMOD* 基因编码的蛋白质是 II 类富含亮氨酸的小蛋白多糖家族成员,它可以直接与 ECM 结构成分(如胶原蛋白和赖氨酰氧化酶)结合,通过多价相互作用调节胶原交联、堆积和组装^[9]。*POSTN* 基因编码的是一种分泌型 ECM 蛋白,该蛋白质在组织发育和再生中发挥作用^[10]。研究发现 *COL11A1*、*FMOD*、*POSTN* 在多种肿瘤组织中异常表达,可作为肿瘤诊断和预后的标志物^[11-12]。

CHI3L1 基因编码的是一种分泌型糖蛋白,属于糖基水解酶 18 家族成员,参与调节炎症细胞凋亡、树突状细胞累积和 M2 巨噬细胞分化等多种过程,在组织重塑、细胞响应及环境变化应对中发挥作用^[13]。尽管关于 *CHI3L1* 基因在大脑中的研究有限,但越来越多的证据表明, *CHI3L1* 主要是由活跃的星形胶质细胞产生,并与神经炎症状态有关^[14]。Lananna 等^[15]发现 *CHI3L1* 基因还参与调节神经炎症和阿尔茨海默病的发病机制。Jiang 等^[16]发现 *CHI3L1* 表达与神经脊髓炎患者的认知障碍相关,敲低星形胶质细胞中的 *CHI3L1* 表达可以挽救 C57BL/6 小鼠模型中海马神经发生减少和学习行

为受损。ZIKV 感染 SH-SY5Y 细胞后 *COL11A1*、*CHI3L1*、*FMOD*、*POSTN* 转录水平升高,提示 ZIKV 感染可能通过重塑神经细胞胞外环境导致神经系统发生病变。

ECM 是一种普遍存在的结构,也是具有潜在免疫调节活性分子的主要来源,这些分子包括细胞分泌并贮存在 ECM 中的细胞因子和生长因子,以及由基质蛋白酶分解产生的生物活性分子。本次转录组测序数据中,参与抗微生物体液免疫反应的 DEG 有 *PI3*、*WFDC12*、*SFTPD*、*CXCL2*、*PRSS2*,这些基因均与 ECM 相关。例如, *SFTPD* 基因编码的是一类含有胶原蛋白的亲水性钙依赖性(C 型)凝集素,广泛表达于脑、肺、胰腺和脂肪组织^[17]。*SFTPD* 属于 ECM 中具有免疫调节活性的分子。有文献报道,表面活性蛋白 A 和 *SFTPD* 两种寡聚蛋白不仅参与肺先天免疫防御^[18],而且在抑制革兰氏阴性菌生长^[19]、增强吞噬细胞对微生物摄取^[20]、抑制寄生虫感染^[21-22]等方面均发挥重要作用。另外, *SFTPD* 还可以与多种 RNA 病毒结合发挥抗病毒作用,包括甲型流感病毒^[23]、呼吸道合胞病毒^[24]、HIV^[25]、严重急性呼吸综合征冠状病毒 2^[26]等。ZIKV 感染 SH-SY5Y 细胞后 *SFTPD* 转录水平升高,提示宿主细胞可能通过增加细胞外环境中具有免疫调节活性的蛋白质来发挥抗病毒效应。

DEG 的 KEGG 通路富集分析筛选出的显著富集的信号通路主要与炎症、免疫反应相关,这些基因有 *CXCL2*、*CCL5*、*FOS*、*MMP1*、*H4C11*、*DRD1* 等。*CXCL2* 和 *CCL5* 编码的蛋白质都是趋化因子超家族成员。趋化因子是一种能参与免疫调节和炎症过程的分泌蛋白,具有免疫调节、组织修复、调控肿瘤发生等作用^[27]。Tsutsui 等^[28]发现 *CXCL2* 会加重自身免疫性脑脊髓炎实验小鼠的中枢神经系统炎症。另一项研究则表明 *CCL5* 可促进受损视神经及中枢和周围神经系统的轴突再生^[29]。ZIKV 感染 SH-SY5Y 细胞后 *CXCL2*、*CCL5* 转录水平均升高,提示 ZIKV 可通过促进趋化因子的表达来加重细胞炎症,也可能是宿主细胞为了修复神经损伤而上调上述趋化因子的表达。

Fos 基因家族主要由 4 个成员即 *FOS*、*FOSB*、*FOSL1* 和 *FOSL2* 组成,这些基因编码亮氨酸拉链蛋白,可以与 JUN 家族蛋白结合形成异二聚体转录因子复合物——激活蛋白 1 (activator protein-1,

AP-1), AP-1 在信号转导、细胞增殖和分化中具有重要作用^[30]。有研究报道 HIV 感染人体后可调控 AP-1 活性, 从而损害机体免疫功能, 增加患者患肿瘤和机会性感染 (如 Burkitt 淋巴瘤、隐球菌感染) 的风险。HIV 的 Tat 蛋白通过与 AP-1 相互作用激活致癌因子的表达, 从而加重肿瘤疾病进程^[31]。另有研究通过对多发性硬化症 (一种中枢神经系统炎症性脱髓鞘疾病) 和 ZIKV 感染转录本进行分析, 发现 AP-1 组成成员 JUN 和 FOS 在两组中均上调, 提出 ZIKV 感染可能通过激活 AP-1 调节机制, 导致个体出现多发性硬化症样表现^[32]。ZIKV 感染是否通过调节 FOS 基因的表达影响神经细胞炎症有待进一步研究。

qPCR 验证实验结果显示 *MAGED4B*、*TMEM35A*、*STAT5A*、*NAPIL5*、*NCAM2*、*BGN* 的转录水平在 ZIKV 感染 SH-SY5Y 细胞后下降, 而 *KLF15*、*CHAC1*、*INHBE*、*GADD45G*、*NR1D1* 在 ZIKV 感染后上调。除了 *BGN*, 其他基因的 qPCR 验证结果均与转录组测序结果一致。其中 ZIKV 感染 SH-SY5Y 细胞后, *NCAM2* 基因转录水平下降最显著, 该基因主要在大脑组织中表达。*NCAM2* 在神经系统发育中具有重要作用, 它不仅参与调控神经元形态和轴突结构, 还影响神经元分化、突触形成和记忆形成^[33-34]。已有研究报道 *NCAM2* 缺失与多种神经系统疾病有关, 包括唐氏综合征、自闭症谱系障碍和阿尔茨海默病^[35-36]。这提示 ZIKV 感染可能通过下调 *NCAM2* 的表达而影响神经系统发育。

BGN 编码的蛋白质是富含亮氨酸的小蛋白聚糖家族成员, 该蛋白质在胶原纤维组装和细胞信号传递过程中有重要作用。*BGN* 表达异常与多种疾病相关, 如代谢紊乱、炎症性疾病、肌肉骨骼发育异常和恶性肿瘤^[37]。有研究发现, *BGN* 还与多种神经退行性事件和疾病有关, 如阿尔茨海默病病理过程中的淀粉样蛋白代谢^[38]、感觉神经元轴突生长的抑制^[39]和新皮质神经元存活^[40]等。通过对野生型和 *BGN* 基因敲除型小鼠的下丘脑、海马组织进行转录组测序分析, 发现 *BGN* 在代谢、免疫应答和神经元可塑性方面具有调节作用^[41]。另外, *BGN* 在妊娠和病理性妊娠过程中变化显著。从妊娠女性子宫颈获得的成纤维细胞中的 *BGN* 水平较非妊娠女性来源细胞减少了 50%^[42]。在胎儿生长受限病例的胎盘中 *BGN* 蛋白水平降低, 而低 *BGN*

表达可能会导致胎盘血栓形成, 是特发性胎儿生长受限的发病机制之一^[43]。虽然本实验中对 *BGN* 的 qPCR 验证结果与转录组测序结果不一致, 但由于 qPCR 实验重复 3 次并显示 *BGN* 在 ZIKV 感染后转录水平下调, 与上述研究结果相符, 说明 ZIKV 感染可能通过减少基质蛋白 *BGN* 的表达引起神经病变及在孕妇中引起胎儿发育不良。

进一步对 DEG (*NR1D1*、*STAT5A*、*CHAC1*、*BGN*) 在不同细胞感染 ZIKV 后的转录水平进行 qPCR 检测, 发现其变化规律有所不同, 提示 ZIKV 感染不同细胞引起的基因表达变化存在差异, 这可能与细胞类型及这些基因在不同细胞代谢活动中行使的功能不同有关, 对其进行全面且个性化的研究将有利于阐明 ZIKV 的致病机制。与 *BGN* 相似, *STAT5A* 转录水平在 ZIKV 感染的 SH-SY5Y 细胞中下调, 而在其他 3 种细胞中则上升。信号转导及转录激活因子 5 (signal transducer and activator of transcription 5, *STAT5*) 通过与特定的细胞因子受体结合参与多种生物学过程, 包括细胞增殖、分化、凋亡和免疫调节等, 在细胞信号转导中起着重要作用^[44]。研究发现, 尼帕病毒 (Nipah virus) 的 V 蛋白可以与 *STAT5* 相互作用, 抑制 *STAT5* 功能, 进而逃避宿主细胞的免疫反应^[45]。这提示 ZIKV 可能通过抑制 SH-SY5Y 细胞内 *STAT5* 信号通路来逃避宿主免疫防御。

本研究还观察到 *CHAC1*、*NR1D1* 基因在 ZIKV 感染的 4 种细胞模型中转录水平均上调, 表明两者可能是 ZIKV 感染宿主细胞的普遍响应靶点。*CHAC1* 是 γ -谷氨酰转移酶蛋白家族成员, 具有 γ -谷氨酰转移酶活性, 特异作用于细胞内主要的抗氧化剂谷胱甘肽^[46]。*CHAC1* 过表达会耗尽谷胱甘肽。同时, *CHAC1* 还是内质网应激蛋白, 参与细胞应激信号转导与氧化反应, 在氧化应激和细胞凋亡中起着重要作用^[47]。此外, *CHAC1* 也是参与胚胎神经发生的 Notch 信号通路的负调节因子, 通过抑制弗林蛋白酶切割 Notch 并将 Notch 维持在不成熟的非活性状态, 最终促进胚胎的神经发生^[48]。ZIKV 感染后 *CHAC1* 表达上调, 说明 ZIKV 可能通过上调 *CHAC1* 介导细胞凋亡或经 Notch 信号通路的抑制促进神经细胞分化。

NR1D1 基因编码的蛋白质是一种转录因子, 为核受体亚家族 1 中 D 组成员, 可调控多种基因 (包

括昼夜节律、炎症和代谢相关基因)的表达^[49]。研究发现使用NR1D1激动剂GSK411增强NR1D1活性可以抑制由脂多糖介导的神经小胶质细胞过度激活,保护神经元免受脂多糖介导的损伤^[50];激活NR1D1可抑制Toll样受体4介导的NF- κ B活化,最终减弱脂多糖诱导的人子宫内质细胞炎症反应^[51];NR1D1的药理激活可抑制脂多糖诱导的巨噬细胞M1极化,有助于预防流产^[52]。另外,有研究报道NR1D1拮抗剂SR8278具有作为癫痫、帕金森病和阿尔茨海默病等神经退行性疾病治疗剂的巨大潜力,其特异性药理作用似乎与神经元末梢释放的神经递质有关^[53]。这提示ZIKV可能通过上调NR1D1表达来促进神经细胞病变,或者宿主细胞在感染ZIKV后通过上调NR1D1来减轻细胞炎症反应。

综上所述,通过转录组测序分析,ZIKV感染SH-SY5Y细胞后有259个基因发生差异性表达,这些DEG主要与ECM、刺激应答、炎症反应、免疫反应相关。qPCR验证结果表明ZIKV感染后SH-SY5Y细胞中的*NCAM2*、*BGN*基因表达下调,*CHAC1*、*NR1D1*基因表达上调。这4种基因均已被证明与神经系统疾病密切相关,提示ZIKV感染SH-SY5Y细胞后通过重塑ECM及上调*CHAC1*、*NR1D1*转录水平导致神经细胞受损。本研究丰富了ZIKV感染的转录组学信息,并且为ZIKV致病机制研究提供了线索。

【参考文献】

- [1] ARMSTRONG N, HOU W, TANG Q. Biological and historical overview of Zika virus[J]. World J Virol, 2017, 6(1): 1-8. DOI: 10.5501/wjv.v6.i1.1.
- [2] 陈雨露,冯燕,张哲雯,等.牛蒡苷元通过调控宿主基因表达和细胞凋亡抑制寨卡病毒复制的研究[J]. 中药药理与临床, 2023, 39(4): 40-46. DOI: 10.13412/j.cnki.zyy.20230411.001.
- [3] MENDONÇA-VIEIRA L R, ANÍBAL-SILVA C E, MENEZES-NETO A, et al. Reactive oxygen species (ROS) are not a key determinant for Zika virus-induced apoptosis in SH-SY5Y neuroblastoma cells[J]. Viruses, 2021, 13(11): 2111. DOI: 10.3390/v13112111.
- [4] FUJIMURA K, GUISE A J, NAKAYAMA T, et al. Integrative systems biology characterizes immune-mediated neurodevelopmental changes in murine Zika virus microcephaly[J]. iScience, 2023, 26(7): 106909. DOI: 10.1016/j.isci.2023.106909.
- [5] SONG B H, YUN S I, WOOLLEY M, et al. Zika virus: history, epidemiology, transmission, and clinical presentation[J]. J Neuroimmunol, 2017, 308: 50-64. DOI: 10.1016/j.jneuroim.2017.03.001.
- [6] HUSSAIN A, ALI F, LATIWESH O B, et al. A comprehensive review of the manifestations and pathogenesis of Zika virus in neonates and adults[J]. Cureus, 2018, 10(9): e3290. DOI: 10.7759/cureus.3290.
- [7] BOYD D F, THOMAS P G. Towards integrating extracellular matrix and immunological pathways[J]. Cytokine, 2017, 98: 79-86. DOI: 10.1016/j.cyt.2017.03.004.
- [8] BOYSEN K B, TÜMER Z, BACH-HOLM D, et al. Microphthalmia and congenital cataract in two patients with stickler syndrome type II: a case report[J]. Ophthalmic Genet, 2024, 45(3): 313-318. DOI: 10.1080/13816810.2024.2309700.
- [9] ZHENG Z, GRANADO H S, LI C. Fibromodulin, a multifunctional matricellular modulator[J]. J Dent Res, 2023, 102(2): 125-134. DOI: 10.1177/00220345221138525.
- [10] ACKERMAN J E, MUSCAT S N, ADJEI-SOWAH E, et al. Identification of periostin as a critical niche for myofibroblast dynamics and fibrosis during tendon healing[J]. Matrix Biol, 2024, 125: 59-72. DOI: 10.1016/j.matbio.2023.12.004.
- [11] CHEN X, YUAN Q, LIU J, et al. Comprehensive characterization of extracellular matrix-related genes in PAAD identified a novel prognostic panel related to clinical outcomes and immune microenvironment: a silico analysis with *in vivo* and *in vitro* validation[J]. Front Immunol, 2022, 13: 985911. DOI: 10.3389/fimmu.2022.985911.
- [12] HUANG Z, BYRD O, TAN S, et al. Periostin facilitates ovarian cancer recurrence by enhancing cancer stemness[J]. Sci Rep, 2023, 13(1): 21382. DOI: 10.1038/s41598-023-48485-8.
- [13] YU J E, YEO I J, HAN S B, et al. Significance of chitinase-3-like protein 1 in the pathogenesis of inflammatory diseases and cancer[J]. Exp Mol Med, 2024, 56(1): 1-18. DOI: 10.1038/s12276-023-01131-9.
- [14] WURM J, BEHRINGER S P, RAVI V M, et al. Astroglial releases pro-oncogenic chitinase 3-like 1 causing MAPK signaling in glioblastoma[J]. Cancers (Basel), 2019, 11(10): 1437. DOI: 10.3390/cancers11101437.
- [15] LANANNA B V, MCKEE C A, KING M W, et al. *Chi3l1*/YKL-40 is controlled by the astrocyte circadian clock and regulates neuroinflammation and Alzheimer's disease pathogenesis[J]. Sci Transl Med, 2020, 12(574): eaax3519. DOI: 10.1126/scitranslmed.aax3519.
- [16] JIANG W, ZHU F, XU H, et al. CHI3L1 signaling

- impairs hippocampal neurogenesis and cognitive function in autoimmune-mediated neuroinflammation[J]. Sci Adv, 2023, 9(39): eadg8148. DOI: 10.1126/sciadv.adg8148.
- [17] ORTEGA F J, PUEYO N, MORENO-NAVARRETE J M, et al. The lung innate immune gene surfactant protein-D is expressed in adipose tissue and linked to obesity status[J]. Int J Obes (Lond), 2013, 37(12): 1532-1538. DOI: 10.1038/ijo.2013.23.
- [18] WRIGHT J R. Immunomodulatory functions of surfactant[J]. Physiol Rev, 1997, 77(4): 931-962. DOI: 10.1152/physrev.1997.77.4.931.
- [19] WU H, KUZMENKO A, WAN S, et al. Surfactant proteins A and D inhibit the growth of Gram-negative bacteria by increasing membrane permeability[J]. J Clin Invest, 2003, 111(10): 1589-1602. DOI: 10.1172/JCI16889.
- [20] WONG S S W, DELLIÈRE S, SCHIEFERMEIER-MACH N, et al. Surfactant protein D inhibits growth, alters cell surface polysaccharide exposure and immune activation potential of *Aspergillus fumigatus*[J]. Cell Surf, 2022, 8: 100072. DOI: 10.1016/j.tesw.2022.100072.
- [21] VAN DE WETERING J K, VAN REMOORTERE A, VAANDRAGER A B, et al. Surfactant protein D binding to terminal α -3-linked fucose residues and to *Schistosoma mansoni*[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2004, 31(5): 565-572. DOI: 10.1165/rcmb.2004-0105OC.
- [22] THAWER S, AURET J, SCHNOELLER C, et al. Surfactant protein-D is essential for immunity to helminth infection[J]. PLoS Pathog, 2016, 12(2): e1005461. DOI: 10.1371/journal.ppat.1005461.
- [23] LI D, MINKARA M S. Elucidating the enhanced binding affinity of a double mutant SP-D with trimannose on the influenza A virus using molecular dynamics[J]. Comput Struct Biotechnol J, 2022, 20: 4984-5000. DOI: 10.1016/j.csbj.2022.08.045.
- [24] DEPICOLZUANE L C, ROBERTS C M, THOMAS N J, et al. Hydrophilic but not hydrophobic surfactant protein genetic variants are associated with severe acute respiratory syncytial virus infection in children[J]. Front Immunol, 2022, 13: 922956. DOI: 10.3389/fimmu.2022.922956.
- [25] DODAGATTA-MARRI E, MITCHELL D A, PANDIT H, et al. Protein-protein interaction between surfactant protein D and DC-SIGN via C-type lectin domain can suppress HIV-1 transfer[J]. Front Immunol, 2017, 8: 834. DOI: 10.3389/fimmu.2017.00834.
- [26] MADAN T, BISWAS B, VARGHESE P M, et al. A recombinant fragment of human surfactant protein D binds spike protein and inhibits infectivity and replication of SARS-CoV-2 in clinical samples[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2021, 65(1): 41-53. DOI: 10.1165/rcmb.2021-0005OC.
- [27] WU T, YANG W, SUN A, et al. The role of CXCL chemokines in cancer progression[J]. Cancers (Basel), 2022, 15(1): 167. DOI: 10.3390/cancers15010167.
- [28] TSUTSUI M, HIRASE R, MIYAMURA S, et al. TRPM2 exacerbates central nervous system inflammation in experimental autoimmune encephalomyelitis by increasing production of CXCL2 chemokines[J]. J Neurosci, 2018, 38(39): 8484-8495. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2203-17.2018.
- [29] BENOWITZ L I, XIE L, YIN Y. Inflammatory mediators of axon regeneration in the central and peripheral nervous systems[J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(20): 15359. DOI: 10.3390/ijms242015359.
- [30] RODRÍGUEZ-BERDINI L, FERRERO G O, BUSTOS PLONKA F, et al. The moonlighting protein c-Fos activates lipid synthesis in neurons, an activity that is critical for cellular differentiation and cortical development[J]. J Biol Chem, 2020, 295(26): 8808-8818. DOI: 10.1074/jbc.RA119.010129.
- [31] ALVES DE SOUZA RIOS L, MAPEKULA L, MDLETSHI N, et al. HIV-1 transactivator of transcription (Tat) co-operates with AP-1 factors to enhance *c-MYC* transcription[J]. Front Cell Dev Biol, 2021, 9: 693706. DOI: 10.3389/fcell.2021.693706.
- [32] DA SILVA E V, FONTES-DANTAS F L, DANTAS T V, et al. Shared molecular signatures across Zika virus infection and multiple sclerosis highlight AP-1 transcription factor as a potential player in post-ZIKV MS-like phenotypes[J]. Mol Neurobiol, 2023, 60(8): 4184-4205. DOI: 10.1007/s12035-023-03305-y.
- [33] PARCERISAS A, ORTEGA-GASCÓ A, HERNALZ-LLORENS M, et al. New partners identified by mass spectrometry assay reveal functions of NCAM2 in neural cytoskeleton organization[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(14): 7404. DOI: 10.3390/ijms22147404.
- [34] ORTEGA-GASCÓ A, PARCERISAS A, HINO K, et al. Regulation of young-adult neurogenesis and neuronal differentiation by neural cell adhesion molecule 2 (NCAM2)[J]. Cereb Cortex, 2023, 33(21): 10931-10948. DOI: 10.1093/cercor/bhad340.
- [35] SCHOLZ C, STEINEMANN D, MÄLZER M, et al. NCAM2 deletion in a boy with macrocephaly and autism: cause, association or predisposition?[J]. Eur J Med Genet, 2016, 59(10): 493-498. DOI: 10.1016/j.ejmg.2016.08.006.
- [36] LESHCHYNS'KA I, LIEW H T, SHEPHERD C, et al. A β -dependent reduction of NCAM2-mediated synaptic

- adhesion contributes to synapse loss in Alzheimer's disease[J]. *Nat Commun*, 2015, 6: 8836. DOI: 10.1038/ncomms9836.
- [37] APPUNNI S, RUBENS M, RAMAMOORTHY V, et al. Biglycan: an emerging small leucine-rich proteoglycan (SLRP) marker and its clinicopathological significance[J]. *Mol Cell Biochem*, 2021, 476(11): 3935-3950. DOI: 10.1007/s11010-021-04216-z.
- [38] LAM V, TAKECHI R, PALLEBAGE-GAMARALLAGE M M, et al. Colocalisation of plasma derived apo B lipoproteins with cerebral proteoglycans in a transgenic-amyloid model of Alzheimer's disease[J]. *Neurosci Lett*, 2011, 492(3): 160-164. DOI: 10.1016/j.neulet.2011.02.001.
- [39] LEMONS M L, BARUA S, ABANTO M L, et al. Adaptation of sensory neurons to hyaluronin and decorin proteoglycans[J]. *J Neurosci*, 2005, 25(20): 4964-4973. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0773-05.2005.
- [40] KOOPS A, KAPPLER J, JUNGHANS U, et al. Cultured astrocytes express biglycan, a chondroitin/dermatan sulfate proteoglycan supporting the survival of neocortical neurons[J]. *Brain Res Mol Brain Res*, 1996, 41(1/2): 65-73. DOI: 10.1016/0169-328x(96)00067-8.
- [41] YING Z, BYUN H R, MENG Q, et al. Biglycan gene connects metabolic dysfunction with brain disorder[J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2018, 1864(12): 3679-3687. DOI: 10.1016/j.bbadis.2018.10.002.
- [42] AKERUD A, DUBICKE A, SENNSTROM M, et al. Differences in heparan sulfate production in cervical fibroblast cultures from women undergoing term and preterm delivery[J]. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 2008, 87(11): 1220-1228. DOI: 10.1080/00016340802460313.
- [43] MURTHI P, FAISAL F A, RAJARAMAN G, et al. Placental biglycan expression is decreased in human idiopathic fetal growth restriction[J]. *Placenta*, 2010, 31(8): 712-717. DOI: 10.1016/j.placenta.2010.05.009.
- [44] KIM U, SHIN H Y. Genomic mutations of the STAT5 transcription factor are associated with human cancer and immune diseases[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(19): 11297. DOI: 10.3390/ijms231911297.
- [45] KEIFFER T R, CIANCANELLI M J, EDWARDS M R, et al. Interactions of the Nipah virus P, V, and W proteins across the STAT family of transcription factors[J]. *mSphere*, 2020, 5(6): e00449-20. DOI: 10.1128/mSphere.00449-20.
- [46] KAUR A, GAUTAM R, SRIVASTAVA R, et al. ChaC2, an enzyme for slow turnover of cytosolic glutathione[J]. *J Biol Chem*, 2017, 292(2): 638-651. DOI: 10.1074/jbc.M116.727479.
- [47] CRAWFORD R R, PRESCOTT E T, SYLVESTER C F, et al. Human CHAC1 protein degrades glutathione, and mRNA induction is regulated by the transcription factors ATF4 and ATF3 and a bipartite ATF/CRE regulatory element[J]. *J Biol Chem*, 2015, 290(25): 15878-15891. DOI: 10.1074/jbc.M114.635144.
- [48] CHI Z, BYRNE S T, DOLINKO A, et al. Botch is a γ -glutamyl cyclotransferase that deglycinates and antagonizes Notch[J]. *Cell Rep*, 2014, 7(3): 681-688. DOI: 10.1016/j.celrep.2014.03.048.
- [49] IKEDA R, TSUCHIYA Y, KOIKE N, et al. REV-ERB α and REV-ERB β function as key factors regulating mammalian circadian output[J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 10171. DOI: 10.1038/s41598-019-46656-0.
- [50] GUO D K, ZHU Y, SUN H Y, et al. Pharmacological activation of REV-ERB α represses LPS-induced microglial activation through the NF- κ B pathway[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2019, 40(1): 26-34. DOI: 10.1038/s41401-018-0064-0.
- [51] ZHAO W, CUI L, HUANG X, et al. Activation of Rev-erb α attenuates lipopolysaccharide-induced inflammatory reactions in human endometrial stroma cells via suppressing TLR4-regulated NF- κ B activation[J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2019, 51(9): 908-914. DOI: 10.1093/abbs/gmz078.
- [52] CUI L, XU F, WANG S, et al. Pharmacological activation of rev-erb α suppresses LPS-induced macrophage M1 polarization and prevents pregnancy loss[J]. *BMC Immunol*, 2021, 22(1): 57. DOI: 10.1186/s12865-021-00438-4.
- [53] KIM J, PARK I, JANG S, et al. Pharmacological rescue with SR8278, a circadian nuclear receptor REV-ERB α antagonist as a therapy for mood disorders in Parkinson's disease[J]. *Neurotherapeutics*, 2022, 19(2): 592-607. DOI: 10.1007/s13311-022-01215-w.

[本文编辑] 尹 茶