

• 论 著 •

缺血性脑卒中患者外周血中 SORBS1 表达水平与炎症标志物的相关性分析*

梁雅茹, 肖 斌, 李林海, 李齐光[△]

广州医科大学附属第六医院/清远市人民医院检验医学部检验科, 广东清远 511518

摘 要:目的 探讨缺血性脑卒中患者外周血中含 Sorbin 和 SH3 结构域的蛋白 1(SORBS1)表达水平与炎症标志物的相关性。方法 选取 2020 年 5 月至 2021 年 2 月在广州医科大学附属第六医院脑血管病科住院的缺血性脑卒中患者 64 例作为观察组,另选取同期本院 64 例健康体检者作为对照组。罗氏全自动生化分析仪检测血清 C 反应蛋白(CRP)、白细胞介素-6(IL-6)、血清淀粉样蛋白(SAA)和同型半胱氨酸(Hcy)水平。酶联免疫吸附试验(ELISA)检测血清 SORBS1 水平。亚硫酸氢盐处理后测序(BSP)法检测 SORBS1 启动子的甲基化水平,实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)和蛋白质印迹(Western blot)检测 SORBS1 表达水平。采用 Spearman 法分析 SORBS1 表达水平与各种炎症标志物水平的相关性。结果 观察组外周血 CRP、IL-6、SAA 和 Hcy 水平均高于对照组($P<0.05$)。与对照组比较,观察组 SORBS1 mRNA 相对表达水平降低($P<0.05$)。观察组 SORBS1 蛋白表达水平与对照组比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。外周血中 SORBS1 mRNA 相对表达水平与 CRP、IL-6、SAA 水平均呈负相关($r=-0.763, -0.814, -0.735, P<0.05$)。结论 缺血性脑卒中患者外周血中炎症标志物水平升高, SORBS1 mRNA 表达下降, SORBS1 mRNA 水平与炎症标志物水平呈负相关。SORBS1 基因可能是抑制缺血性脑卒中患者炎症反应的一种潜在生物指标。

关键词:缺血性脑卒中; 含 Sorbin 和 SH3 结构域的蛋白 1; 炎症标志物; 相关性分析

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2023.07.005

中图法分类号:R446.1

文章编号:1673-4130(2023)07-0793-05

文献标志码:A

Correlation between SORBS1 expression level and inflammation markers in peripheral blood of patients with ischemic stroke*

LIANG Yaru, XIAO Bin, LI Linhai, LI Qiguang[△]

Department of Laboratory Medicine, the Sixth Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University/Qingyuan People's Hospital, Qingyuan, Guangdong 511518, China

Abstract: Objective To investigate the correlation between Sorbin and SH3 domain-containing protein 1 (SORBS1) expression levels and inflammatory markers in peripheral blood of patients with ischemic stroke. **Methods** A total of 64 patients with ischemic stroke admitted to the Department of Cerebrovascular Disease of the Sixth Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University from May 2020 to February 2021 were selected as the case group, another 64 healthy people undergoing physical examination during the same period in the hospital were selected as the control group. C-reactive protein (CRP), interleukin-6 (IL-6), serum amyloid A (SAA), and homocysteine (Hcy) were measured by using Roche automatic biochemical analyzer. Serum SORBS1 levels were determined by enzymic linked immunosorbent assay (ELISA). The SORBS1 promoter methylation level was measured by bisulfite sequencing PCR (BSP). The expression level of SORBS1 was detected by qRT-PCR and Western blot. The correlation between SORBS1 expression level and inflammatory markers was determined through Spearman correlation analysis. **Results** CRP, IL-6, SAA and Hcy levels were significantly higher in the case group than those in the healthy control group ($P<0.05$). The mRNA level of SORBS1 was significantly decreased in the case group compared with that in the healthy control group ($P<0.05$). There was no statistically significant difference in the expression of SORBS1 protein between the case group and the control group ($P>0.05$). The relative expression level of SORBS1 mRNA in peripheral blood was negatively correlated with the levels of CRP, IL-6 and SAA ($r=-0.763, -0.814, -0.735, P<0.05$). **Conclusion** The levels of inflammatory markers in peripheral blood of patients with ischemic stroke increase,

* 基金项目:广东省医学科研基金项目(A2020454);清远市科技计划项目(2019A015)。

作者简介:梁雅茹,女,副主任技师,主要从事临床血液检验及研究。 [△] 通信作者, E-mail:liqiguang321@126.com。

and the expression of SORBS1 mRNA decreases. SORBS1 mRNA level is negatively correlated with the level of inflammatory markers. SORBS1 gene may be a potential biomarker for inhibiting inflammatory response in patients with ischemic stroke.

Key words: ischemic stroke; Sorbin and SH3 domain-containing protein 1; inflammation markers; correlation analysis

缺血性脑卒中具有高发病率、高致死率、高复发率的特点,随着人口老龄化,该病已成为我国成年人致死和致残的主要原因,针对缺血性脑卒中的深入研究十分必要^[1-2]。炎症反应作为一种以损伤诱导机体保护、修复能力增强为主要功能的免疫机制,在缺血性脑卒中发生后,脑中血管功能出现障碍,使得炎症反应进一步恶化,加速神经细胞的死亡过程。脑缺血后的炎症损伤备受国内外学者关注,其中炎症细胞浸润和相应细胞因子分泌在缺血性脑损伤中发挥着极为重要的作用^[3-4]。

Sorbin 和 SH3 结构域的蛋白 1(SORBS1)属于 SOHO 家族,是胰岛素信号通路的重要调节因子,主要参与胰岛素信号传导^[5-6]。研究表明,SORBS1 基因多态性与血压调节和高血压发病年龄有关^[7]。SORBS1(CAP)通过抑制核因子- κ B 通路而抑制促炎细胞因子的表达^[8]。应用表观遗传学,可以深入研究和了解各种疾病的发病机制,可以发现疾病发生的预警分子和防治靶分子,在心脑血管病的发病和防治中,占有重要地位。DNA 甲基化是最常见的表观遗传修饰之一,在控制基因表达方面起着关键作用,高甲基化可抑制基因转录,低甲基化可促进基因转录^[9-10]。研究表明,多个基因的异常甲基化与脑卒中相关,如亚甲基四氢叶酸脱氢酶 1(MTHFD1)^[11]、长点缀核苷酸元-1(LINE-1)^[12]、基质金属蛋白酶-2(MMP-2)^[13]和 ATP 结合盒亚家族 B 运载体 1(ABCB1)^[14]。本课题组前期的研究表明,同型半胱氨酸(Hcy)能够通过调节 SORBS1 基因的甲基化诱导人脐静脉内皮细胞的氧化应激反应^[15]。然而,SORBS1 在缺血性脑卒中的作用机制尚不清楚。因此,本研究拟探讨缺血性脑卒中患者外周血中炎症标志物的水平,以及其炎症标志物与 SORBS1 表达水平之间的相关性,初步探究 SORBS1 基因在缺血性脑卒中的作用机制。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2020 年 5 月至 2021 年 2 月在广州医科大学附属第六医院脑血管病科住院的缺血性脑卒中患者 64 例作为观察组,其中男 33 例,女 31 例;平均年龄(62.3±9.9)岁。另选取同期本院 64 例健康体检者作为对照组,其中男 35 例,女 29 例;平均年龄(60.8±7.5)岁。纳入标准:所有缺血性脑卒中患者均在脑卒中发作后 2.5~72.0 h 入院,并经历了新的整体或局灶性神经系统事件;所有缺血性脑卒中患者均根据《中国急性缺血性脑卒中诊治指南 2010》的诊断标准^[16],根据临床评估和神经影像学(CT 或

MRI)进行重新诊断,入院时,根据美国国立卫生研究院卒中量表(NIHSS)对所有受试者的神经功能缺损进行量化。符合以下任一排除标准的患者被排除:(1)从症状识别到入院已超过 72 h;(2)无法进行 MRI 检查;(3)存在脑动脉硬化、脑出血、癫痫发作活动、昏迷、恶性肿瘤、急性或慢性炎症性疾病。本项研究方案经广州医科大学附属第六医院伦理委员会审核通过,且患者或其家属签署了诊疗知情同意书。

1.2 仪器与试剂 血清 C 反应蛋白(CRP)、白细胞介素-6(IL-6)、血清淀粉样蛋白(SAA)和 Hcy 使用全自动生化分析仪(罗氏 Cobas c702/c602/c502)进行检测,其中 CRP 和 IL-6 采用罗氏生化仪配套试剂,SAA 采用重庆中元汇吉生物技术股份有限公司试剂,Hcy 采用美康生物科技股份有限公司试剂。血清人含 SORBS1 采用江苏酶免实业有限公司试剂。

1.3 方法 入院后第 2 天早晨(或禁食至少 8 h 后)采集血样,室温 3 800 r/min 离心 10 min 分离血清。CRP、IL-6、SAA 和 Hcy 的检测方法分别为免疫比浊法、电化学发光法、胶乳增强免疫比浊法、酶循环法,所用标本均在 2 h 内完成检测,检测前确认仪器测试状态良好,并且质量控制数据均在靶值±2s 范围内。SORBS1 的检测方法为酶联免疫吸附试验(ELISA),严格按照试剂盒说明书进行操作。

1.4 SORBS1 基因启动子区甲基化状态检测 从 NCBI(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)网站下载 SORBS1 基因启动子区(从转录起始位点上游到转录起始位点下游)序列,使用 MethPrimer 程序在线分析 SORBS1 基因启动子区的 CpG 岛。

采用 Ezup 柱式血液基因组 DNA 抽提试剂盒提取 DNA,使用 EZ DNA Methylation-Gold™ 对 DNA 样品进行亚硫酸氢盐修饰。使用表 1 中的 SORBS1-1Fm/1Rm 和 SORBS1-2Fm/2Rm 引物扩增 SORBS1 的启动子区域。聚合酶链反应(PCR)反应体系由 1~2 μ L 20~50 ng/ μ L DNA、1 μ L 10 μ mol/L Fm 引物、1 μ L 10 μ mol/L Rm 引物、1 μ L 10 μ mol/L dNTP、5 μ L 10×Taq 缓冲液(含 MgCl₂)、0.4 μ L 5 U/ μ L Taq 酶,加水至终体积为 50 μ L 组成。PCR 产物用 1%琼脂糖凝胶电泳(150 V,100 mA,10~20 min)检测。采用 ABI3730 自动 DNA 测序仪对至少 10 个单独的克隆进行亚硫酸氢盐测序。BSP 结果采用亚硫酸氢盐测序 DNA 甲基化分析(BISMA)软件进行 FASTA 格式在线分析(<http://services.ibc.uni-stuttgart.de/BDPC/BISMA/index.php>)。

1.5 SORBS1 mRNA 和蛋白表达水平的检测 使用 TRIzol 试剂从血液中提取 RNA,提取的总 RNA 的质量和数量通过 NanoDrop® ND-1000 分光光度计进行评估;使用反转录试剂盒合成 cDNA,37 ℃ 15 min,85 ℃ 5 s;合成双链 cDNA,使用 Roche LC96 荧光定量 PCR 仪进行实时荧光定量 PCR(qRT-PCR),反应体系为如下,SYBR Premix Ex Taq 8 μL、cDNA 2 μL、10 μM 正向引物 2 μL、10 μM 反向引物 2 μL 和无 RNase 的水 6 μL;反应条件为:95 ℃ 30 s;95 ℃ 5 s 和 60 ℃ 30 s,运行 40 个循环;计算 SORBS1 mRNA 的相对表达水平。使用蛋白质印迹(Western blot)检测 SORBS1 蛋白表达水平。

表 1 亚硫酸氢盐测序和 RT-qPCR 引物

基因	引物	序列(5'-3')	长度(bp)
SORBS1	1Fm	GGTAAATTGAGGTTTAGGAGTTAAA	336
	1Rm	CCCTCATTAACATACCTCTAAAACC	
	2Fm	GGTTTTAGAGGTATGTTAATGAGGG	
	2Rm	TAACCCTTTAAATACGCCTCCTC	296
	RT-F	ATTCCCAAGCCTTTCATCAG	
	RT-R	TTTTGCTGTTCTCGATTGTGTTG	
GAPDH	RT-F	GGGAGCCAAAAGGGTCATCATCT	168
	RT-R	GACGCCTGCTTCACCACCTTCTTG	

表 2 观察组和对照组 CRP、IL-6、SAA、Hcy、SORBS1 水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	CRP (mg/L)	IL-6 (pg/mL)	SAA (mmol/L)	Hcy (μmol/L)	SORBS1 (pg/mL)
观察组	64	24.17±3.85	14.60±1.17	63.07±8.77	13.97±0.68	100.09±7.91
对照组	64	1.38±0.15	2.12±0.18	5.94±0.52	10.75±0.44	112.70±6.87
<i>t</i>		5.911	10.537	6.501	3.976	1.335
<i>P</i>		<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	>0.05

2.2 SORBS1 基因启动子区 CpG 岛的预测 基因启动子区通常位于转录起始位点(TSS)上游 2 000 bp 至下游 200 bp,使用 MethPrimer 软件进行 SORBS1 基因的 CpG 岛预测,显示有一个典型的 CpG 岛,位于 TSS 上游 613 bp 至 1 086 bp 之间。

2.3 亚硫酸氢盐处理后测序(BSP)结果 经亚硫酸氢盐处理后,目标 DNA 片段被成功扩增,大小约为 96 bp。SORBS1 基因共有 74 个 CpG 位点,其中第 1 段有 34 个 CpG 位点,第 2 段有 40 个 CpG 位点。在缺血性脑卒中患者血液中,CpG 22 位点的 10 个克隆中有 2 个克隆发生甲基化,CpG 62 位点和 CpG 132 位点的 10 个克隆中均各有 1 个克隆发生甲基化;缺血性脑卒中患者血液 SORBS1 基因启动子发生甲基化的百分比为 1.1%。在健康对照者血液中,仅 CpG135 位点的 10 个克隆中有 1 个克隆发生甲基化,其甲基化的百分比为 0.3%。经统计分析,观察组血

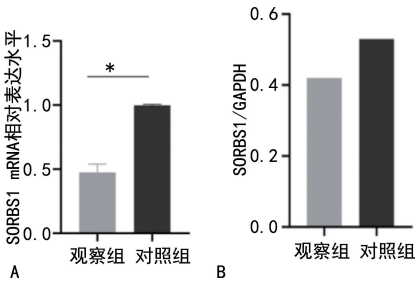
1.6 统计学处理 采用 SPSS22.0 软件进行统计学分析。K-S 正态检验用于计量资料的正态性检验,符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用独立样本 *t* 检验;采用 Spearman 相关分析法分析 SORBS1 与各种炎症标志物之间的相关性。*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 两组 CRP、IL-6、SAA、Hcy、SORBS1 水平比较 观察组血清 CRP、IL-6、SAA、Hcy 水平均高于对照组(*P*<0.05)。观察组血清 SORBS1 水平与对照组比较,差异无统计学意义(*P*>0.05),见表 2。

液 SORBS1 启动子甲基化水平与对照组比较,差异无统计学意义(*P*>0.05)。

2.4 qRT-PCR 和 Western blot 结果 与对照组比较,观察组 SORBS1 mRNA 相对表达水平降低(*P*<0.05)。观察组 SORBS1 蛋白表达水平与对照组比较,差异无统计学意义(*P*>0.05),见图 1。

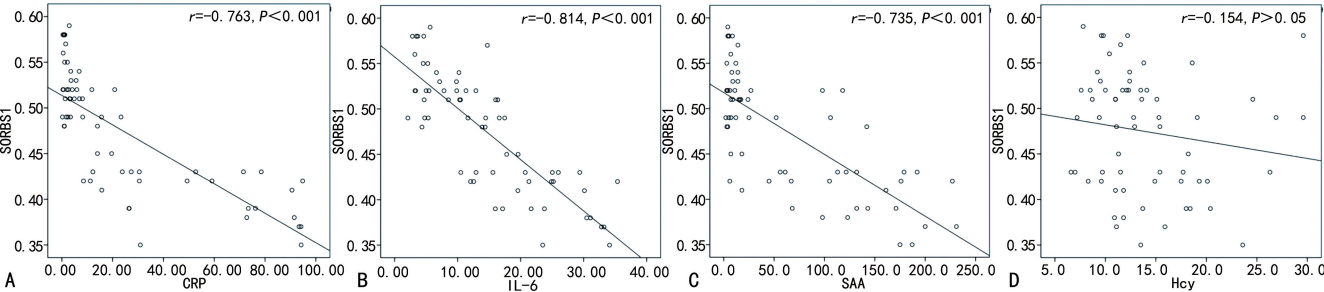


注:A 为两组患者血液 SORBS1 的 mRNA 相对表达水平;B 为两组患者血液 SORBS1 蛋白表达水平;与对照组比较,* *P*<0.05。

图 1 qRT-PCR 和 Western blot 结果

2.5 Spearman 相关性结果 缺血性脑卒中患者血液中的 CRP、IL-6 和 SAA 均与 SORBS1 mRNA 相

对表达水平呈负相关($r = -0.763$ 、 -0.814 和 -0.735 , $P < 0.001$)。见图 2。



注:A~D 分别为 CRP、IL-6、SAA、Hcy 与 SORBS1 mRNA 水平的相关性散点图。

图 2 CRP、IL-6、SAA、Hcy 与 SORBS1 mRNA 水平的相关性结果

3 讨 论

本研究探讨了缺血性脑卒中患者 SORBS1 表达水平与炎症标志物的相关性。结果显示,缺血性脑卒中患者外周血中 CRP、IL-6、SAA、Hcy 水平均高于健康对照者,而 SORBS1 mRNA 相对表达水平低于健康对照者($P < 0.05$)。SORBS1 mRNA 表达水平与炎症标志物(CRP、IL-6、SAA)水平均呈负相关($r = -0.763$ 、 -0.814 、 -0.735 , $P < 0.001$),表明 SORBS1 基因可能是抑制缺血性脑卒中患者炎症反应的一种潜在生物指标。

炎症反应在急性缺血性脑卒中的病程发展、脑损伤及修复过程中均发挥重要作用^[17-18]。CRP 是经典的非特异性炎症标志物,与心血管、卒中事件的发病风险相关,根据 CRP 结果对可能发生心血管事件的患者进行分类,以进行一级预防干预^[19]。白细胞介素是指在白细胞或免疫细胞间相互作用的细胞因子,研究表明各种白细胞介素均可参与炎症反应^[18]。IL-6 是一种由单核-巨噬细胞分泌的具有多种炎症作用的细胞因子,能促进单核细胞释放化学趋化因子,提高黏附分子的表达,在动脉粥样硬化、脑血管疾病的形成和进展中发挥着很重要的作用^[20]。SAA 是一种急性时相反应蛋白,在肝细胞中合成,可以改变高密度脂蛋白胆固醇的结构,导致逆转运胆固醇功能受损,使吞噬细胞清除胆固醇的作用下降,促进动脉粥样硬化的形成与发展^[21-23]。血浆高同型半胱氨酸血症是缺血性脑卒中的常见独立危险因素,笔者前期研究表明,高水平的 Hcy 与急性缺血性脑卒中的不良预后相关^[24]。本研究结果表明,缺血性脑卒中患者血液中的炎症相关指标(CRP、IL-6、SAA 和 Hcy)水平均显著高于健康对照者,证实了炎症反应在缺血性脑卒中病程中发挥重要作用。

表观遗传学,尤其是 DNA 甲基化,与基因表达的调控密切相关^[25],多项研究报道,基因启动子异常甲基化与脑卒中的发病机制和康复相关^[26-28]。本研究通过对 SORBS1 基因启动子区 CpG 岛的生物信息学预测,发现 SORBS1 基因的 CpG 二核苷酸位于转录

起始点(TSS)附近,推测该区域的甲基化修饰可能会影响 SORBS1 基因的表达。本研究的 BSP 结果显示,缺血性脑卒中患者外周血中的 SORBS1 启动子甲基化水平与健康对照者比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。ELISA 结果显示,缺血性脑卒中患者血清中 SORBS1 水平与健康对照者比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。RT-qPCR 和 Western blot 结果显示,缺血性脑卒中患者外周血中的 SORBS1 mRNA 相对表达水平低于健康对照者($P < 0.05$),缺血性脑卒中患者外周血中 SORBS1 蛋白表达水平与对照组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。另外,本研究结果表明,缺血性脑卒中患者外周血中的 SORBS1 mRNA 相对表达水平与炎症标志物(CRP、IL-6 和 SAA)呈负相关。因此,本研究提示缺血性脑卒中患者外周血中 SORBS1 基因启动子的高甲基化可能抑制了 SORBS1 mRNA 的表达,进而促进了缺血性脑卒中患者体内的炎症反应,即 SORBS1 基因可能是抑制缺血性脑卒中患者炎症反应的一种潜在生物指标,与其他学者报道的 SORBS1 可通过抑制 NF- κ B 通路抑制促炎细胞因子表达的结论相呼应^[8]。

本研究还存在一定的局限性:(1)本研究为回顾性研究,收集的数据来源于单中心,可能会产生偏移;(2)本研究得出观察组与对照组 SORBS1 甲基化水平、SORBS1 蛋白表达水平和血清 SORBS1 水平之间差异均无统计学意义可能与收集的样本量较小有关。下一步,课题组需要收集多中心数据,扩大研究的样本量,采用甲基化特异性 PCR 进一步验证 SORBS1 基因在缺血性脑卒中外周血中的甲基化情况,并深入探讨 SORBS1 基因甲基化在缺血性脑卒中的具体机制。

参考文献

[1] WU S M, WU B, LIU M, et al. Stroke in China: advances and challenges in epidemiology, prevention, and management[J]. Lancet Neurol, 2019, 18(4): 394-405.
[2] BARTHEL D, DAS H. Current advances in ischemic

- stroke research and therapies[J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2020, 1866(4):165260.
- [3] YAN T, CHOPP M, CHEN J L. Experimental animal models and inflammatory cellular changes in cerebral ischemic and hemorrhagic stroke[J]. *Neurosci Bull*, 2015, 31(6):717-734.
- [4] JAYARAJ R L, AZIMULLAH S, BEIRAM R, et al. Neuroinflammation: friend and foe for ischemic stroke[J]. *J Neuroinflammation*, 2019, 16(1):142.
- [5] KIOKA N, UEDA K, AMACHI T. Vinexin, CAP/pon-sin, ArgBP2: a novel adaptor protein family regulating cytoskeletal organization and signal transduction[J]. *Cell Struct Funct*, 2002, 27(1):1-7.
- [6] LIN W H, HUANG C J, LIU M W, et al. Cloning, mapping, and characterization of the human sorbin and SH3 domain containing 1 (SORBS1) gene: a protein associated with c-Abl during insulin signaling in the hepatoma cell line Hep3B[J]. *Genomics*, 2001, 74(1):12-20.
- [7] CHANG T J, WANG W C, HSIUNG C A, et al. Genetic variation in the human SORBS1 gene is associated with blood pressure regulation and age at onset of hypertension: a SAPHIRE cohort study[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2016, 95(10):e2970.
- [8] VDOVENKO D, BACHMANN M, WIJNEN W J, et al. The adaptor protein c-Cbl-associated protein (CAP) limits pro-inflammatory cytokine expression by inhibiting the NF- κ B pathway[J]. *Int Immunopharmacol*, 2020, 87:106822.
- [9] FEINBERG A P. Epigenomics reveals a functional genome anatomy and a new approach to common disease[J]. *Nat Biotechnol*, 2010, 28(10):1049-1052.
- [10] ZHONG J, AGHA G, BACCARELLI A A. The role of DNA methylation in cardiovascular risk and disease: methodological aspects, study design, and data analysis for epidemiological studies[J]. *Circ Res*, 2016, 118(1):119-131.
- [11] WANG C Y, XU G D, WEN Q, et al. Significant association of promoter hypomethylation with stroke in a Chinese population with primary hypertension[J]. *Ann Clin Lab Sci*, 2019, 49(1):112-118.
- [12] LIN R T, HSI E, LIN H F, et al. Line-1 methylation is associated with an increased risk of ischemic stroke in men[J]. *Curr Neurovasc Res*, 2014, 11(1):4-9.
- [13] LIN H F, HSI E, HUANG L C, et al. Methylation in the matrix metalloproteinase-2 gene is associated with cerebral ischemic stroke[J]. *J Investig Med*, 2017, 65(4):794-799.
- [14] YANG J, ZHOU J S, ZHAO Y X, et al. ABCB1 hypomethylation is associated with decreased antiplatelet effects of clopidogrel in Chinese ischemic stroke patients[J]. *Pharmazie*, 2015, 70(2):97-102.
- [15] FENG P N, LIANG Y R, LIN W B, et al. Homocysteine induced oxidative stress in human umbilical vein endothelial cells via regulating methylation of SORBS1[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 22(20):6948-6958.
- [16] 中华医学会神经病学分会脑血管病学组急性缺血性脑卒中诊治指南撰写组. 中国急性缺血性脑卒中诊治指南 2010[J]. *中华神经科杂志*, 2010, 43(2):146-153.
- [17] WANG G Y, JING J, LI J J, et al. Association of elevated hs-CRP and multiple infarctions with outcomes of minor stroke or TIA: subgroup analysis of CHANCE randomised clinical trial[J]. *Stroke Vasc Neurol*, 2021, 6(1):80-86.
- [18] 王少岩, 张淑芬, 王美琳, 等. 中性粒细胞在急性缺血性卒中病程中的作用及研究进展. *中国脑血管病杂志*[J]. 2021, 18(6):423-427.
- [19] EVANS C R, LONG D L, HOWARD G, et al. C-reactive protein and stroke risk in blacks and whites: the reasons for geographic and racial differences in stroke cohort[J]. *Am Heart J*, 2019, 217:94-100.
- [20] MOSARREZAI A, AMIRI-NIKPOUR M R, MEHR-YAR H R, et al. Investigating the relationship between interleukin-6 serum levels and outcome in acute ischemic CVA[J]. *Brain Behav*, 2020, 10(8):e01668.
- [21] KISILEVSKY R, MANLEY P N. Acute-phase serum amyloid A: perspectives on its physiological and pathological roles[J]. *Amyloid*, 2012, 19(1):5-14.
- [22] ARNON S, LITMANOVITZ I, REGEV R, et al. Serum amyloid A protein in the early detection of late-onset bacterial sepsis in preterm infants[J]. *J Perinat Med*, 2002, 30(4):329-332.
- [23] SCHWEIZER J, BUSTAMANTE A, FETAUD V L, et al. SAA (serum amyloid A): a novel predictor of stroke-associated infections[J]. *Stroke*, 2020, 51(12):3523-3530.
- [24] LIANG Y R, LI Q G, CHEN P S, et al. Comparative study of back propagation artificial neural networks and logistic regression model in predicting poor prognosis after acute ischemic stroke[J]. *Open Med (Wars)*, 2019, 14:324-330.
- [25] ROBERTSON K D. Epigenetics in health and disease[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2020, 1253:3-55.
- [26] ZHAO H P, HAN Z P, JI X M, et al. Epigenetic regulation of oxidative stress in ischemic stroke[J]. *Aging Dis*, 2016, 7(3):295-306.
- [27] KRUPINSKI J, CARRERA C, MUINO E, et al. DNA methylation in stroke. Update of latest advances[J]. *Comput Struct Biotechnol J*, 2017, 16:1-5.
- [28] SANLES A F, BAIXERAS S S, SUBIRANA I, et al. Association between DNA methylation and coronary heart disease or other atherosclerotic events: a systematic review[J]. *Atherosclerosis*, 2017, 263:325-333.