

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2015.01.031

· 生物信息学 ·

基于人类信号网络和表达谱数据研究静脉血栓复发机制*

张思雅 周艳艳 谢瑞强 曲晓莉 史宇晨 吕亚娜 贾 婧

冯陈晨 李 琬 何月涵 黄 昊 侯 敏 陈丽娜[△]

(哈尔滨医科大学生物信息科学与技术学院 黑龙江 哈尔滨 150081)

摘要 目的: 静脉血栓是一种高复发风险和高致死率的疾病,其形成和复发的分子机制尚不明确。基于人类信号网络和基因表达谱数据可针对静脉血栓经华法令抗凝治疗后的复发机制进行研究。**方法:** 结合表达谱数据和人类信号网络,设计差异模块筛选策略,通过功能分析、差异表达分析和已知血栓相关基因及药物靶基因的互作关联研究,获得与静脉血栓复发相关的显著差异模块。**结果:** 最终获得8个与静脉血栓复发密切相关的显著差异模块,评估了华法令治疗静脉血栓的效能,提出了联合用药的3种可能途径。**结论:** 应用本文提出的整合筛选策略,能识别与静脉血栓复发相关的模块,探究静脉血栓复发的分子机制和评估华法令的治疗效能。还提供了潜在的联合用药途径,这对治愈血栓、防治血栓复发及复发机制的研究具有重要意义。

关键词: 静脉血栓;华法令;基因表达谱;人类信号网络;模块

中图分类号: R619.2; Q-31; R-058 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2015)01-131-08

Researching Recurrence Mechanism of Venous Thromboembolism Based on Human Singaling Network and Gene Expression Profile Data*

ZHANG Si-ya, ZHOU Yan-yan, XIE Rui-qiang, QU Xiao-li, SHI Yu-chen, LV Ya-na, JIA Xu,

FENG Chen-chen, LI Wan, HE Yue-han, HUANG Hao, HOU Min, CHEN Li-na[△]

(College of Bioinformatics Scicence and Technology, Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang, 150081, China)

ABSTRACT Objective: Venous thromboembolism is a disease having high risk recurrence and mortality, and the molecular mechanism of formation and recurrence is not clear. Recurrence mechanism of venous thromboembolism after anticoagulation therapy with warfarin could be investigated based on human singaling network and gene expression profile date. **Methods:** We integrated gene expression profile data and human singaling network in order to design a screening significant differential module strategy. We obtained significant differential modules related to recurrence venous thromboembolism via functional analysis, differential expression analysis and interaction analysis of known genes and drug target genes associated with thromboembolism. **Results:** Finally eight significant differential modules closely related to recurrence venous thromboembolism were obtained, and then were used to assess the efficacy of warfarin. Three possible ways of drug combination were also presented. **Conclusion:** Our integrated screening strategy not only identified modules closely related to recurrence venous thromboembolism, but also investigated recurrence mechanism of venous thromboembolism and assessed the efficacy of warfarin. Our research provided potential route of administration of drug combination. It would be greatly significant for curing venous thromboembolism, the prevention and treatment of recurrence venous thromboembolism and recurrence mechanism study.

Key words: Venous thromboembolism; Warfarin; Gene expression profile; Human singaling network; Module

Chinese Library Classification(CLC): R619.2; Q-31; R-058 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2015)01-131-08

* 基金项目:黑龙江省教育厅基金项目(12511271);国家自然科学基金项目(61272388);黑龙江省自然科学基金项目(F201237);黑龙江省研究生创新科研资金项目(YJSCX2012-209HLJ);黑龙江省大学生创新创业训练基金项目(2012-011HYD);哈尔滨医科大学本科生创新创业基金项目(2012-071HBUYD)

作者简介:张思雅(1982-),女,硕士,主要研究方向:生物信息学,电话:0451-86674768,

E-mail: 13945124034@163.com

△ 通讯作者:陈丽娜, E-mail: chenlina@ems.hrbmu.edu.cn

(收稿日期:2014-04-30 接受日期:2014-05-23)

前言

静脉血栓(Venous thromboembolism, VTE)为常见的血栓性疾病,它已成为一个重要的且日益增长的公共健康问题,是可发生在所有种族、年龄组和男女中的一种疾病^[1],静脉血栓形成主要是由于血流滞缓、血液高凝及血管壁损伤,其遗传和获得性风险因素都会增加患静脉血栓的风险^[2-4]。静脉血栓已列于癌症患者死亡原因的第二位^[5]。由于血栓形成早期可能没有明显症状,致使静脉血栓容易被忽略,如若得不到很好的治疗,DVT发展最为严重的临床表征为肺栓塞,死亡率超过癌症及意外事故致死人数的总和^[6]。

静脉血栓存在很高的复发率,但其复发的分子机制尚不明确。近年来研究表明 FVIII 的高水平可以使静脉血栓复发的风险增加,这两者间存在着明显的转化关系^[7]。蛋白 C 缺乏和口服避孕药能增加静脉血栓复发风险^[7,8],凝血酶原 G20210A 在一定条件下突变,并且与获得性风险因子如口服避孕药相互作用,也会提高脑静脉血栓患者复发的风险^[9]。

抗血栓药物可分为三大类:抗血小板凝聚类药物、抗凝血药和溶血栓药。抗血小板凝聚药物有阿司匹林和氯吡格雷,溶血栓药有尿激酶和链激酶,抗凝血药物有华法令和低分子肝素。目前,通常采用维生素 K 拮抗剂 -- 华法令来预防静脉血栓复发^[10]。对于伴有复发性静脉血栓的癌症患者,在对标准剂量的低分子肝素或维生素 K 拮抗剂有抗药性的情况下,不断增加低分子肝素的剂量可有效治疗静脉血栓的复发^[11]。

多项研究显示静脉血栓患者使用华法令进行抗凝治疗后仍存在复发风险,但其复发的原因并不清晰^[12-15]。随着高通量技术的发展,基因表达数据愈来愈多地被用于研究疾病的药物治疗效果、药物作用途径、药物副作用和揭示潜在发生耐药性的分子途径迁移^[16,17]。对基因调控网络的识别和构建研究,是进行疾病治疗策略和药物设计的基础^[18]。将药物靶点、药物应答表达谱和功能蛋白质互作网络相结合,能够更有效的预测药物靶

点和鉴别药物的作用途径^[19,22]。Verschuren L et al.通过瑞舒伐他汀和依折麦布的联合用药对心血管疾病的危险因素、炎症和动脉粥样硬化的影响研究分析,表明结合基因表达和生物信息学通路分析有助于预测和确定药物组合的互补性和副作用^[23]。

鉴于网络和高通量数据相结合带来的诸多好处,本文借鉴此思路来研究静脉血栓复发机制。即在研究中选择具有三种分类特征的全血细胞表达谱数据,以人类信号网络的功能模块为研究对象,提出一个新的差异显著模块筛选策略,挖掘表达谱中不同分类样本之间存在的显著差异模块,探讨静脉血栓复发可能的分子机制和药物应答途径,希望能找到可用于联合用药的潜在药物靶点及其作用途径,以提高静脉血栓的治愈率,减少静脉血栓的复发率。

1 材料与方法

1.1 实验数据

1.1.1 人类信号网络和全血表达谱数据 人类信号网络是来自 Cui Q et al.^[24]所构建的,包含了 1634 个结点和 5089 个互作关系,这些互作关系可分为三种,分别为抑制、激活和物理互作。表达谱是从 GEO 数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)下载的经华法令处理的用于区分静脉血栓复发患者的全血基因表达谱 GSE19151,它包括健康对照组、单次静脉血栓用药组及用药后静脉血栓复发组这三组分类样本。GSE19151 共包含 133 个样本,其中 63 个正常对照样本,32 个未复发样本、38 个复发样本,分别记为 A、B、C 类样本。

1.1.2 已知血栓相关基因和相关药物靶基因 从 OMIM 数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>)和 GAD 数据库(<http://geneticassociationdb.nih.gov/>)查找并下载与血栓形成相关的基因,在这里不仅局限于单一静脉血栓相关基因,同时也要考虑多种可形成血栓的相关疾病的致病基因,经过整理后作为已知的血栓相关基因。通过文献检索和查询 DrugBank 数据库(<http://redpoll.pharmacy.ualberta.ca/drugbank/>)获得血栓相关治疗药物的

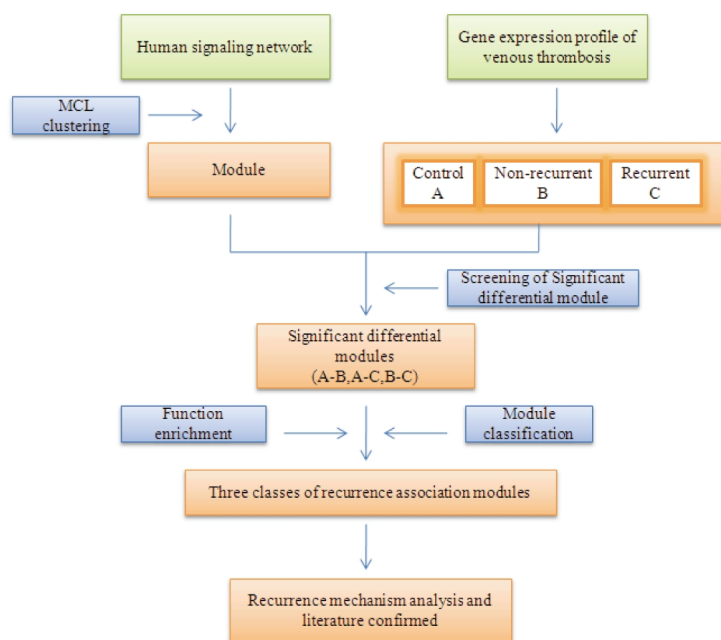


图 1 静脉血栓复发机制流程图

Fig.1 Flow diagram for recurrence mechanism of venous thromboembolism

药物靶基因。

1.2 实验方法

结合人类信号网络和表达谱数据研究静脉血栓复发机制的具体流程见图 1。

1.2.1 差异模块筛选方法 首先,针对人类信号网络,利用马尔可夫聚类方法,挖掘至少包含 4 个节点的模块。

然后,考虑不同分类样本下,针对每个模块,计算模块中每一个基因的平均表达差值,进而获得整个模块的平均表达差值,以此作为该模块的表达值。通过对每个模块进行 1000 次随机,每次随机都用人类信号网络中相同度的节点随机替换模块中的节点,计算每次随机模块在两种分类下的平均表达差值,最后计算每个模块随机出现的表达值大于真实情况下的表达值的频率 p 值,作为评定模块显著性的依据。计算平均表达差值的公式和 p 值公式如下:

$$D = \frac{\left| \sum_{i=1}^k (X_i - Y_i) \right|}{k} \quad (1)$$

$$D = \frac{\left| \sum_{j=1}^k (X_i - Y_i) \right|}{k} \quad (2)$$

$$P = \frac{m}{1000} \quad (3)$$

式中 i 表示真实情况下模块中基因, j 表示随机情况下模

块中基因, k 表示某一模块中基因的个数, X_i, Y_i, X_j, Y_j 分别表示真实和一次随机情况下两类样本被研究模块中基因的平均表达值, D, D_1 分别表示此模块在真实和随机情况下的表达值。对每一个模块都依照上述方法进行 1000 次随机, m 表示 $D_1 > D$ 在 1000 次随机中出现的累计次数, 设定阈值为 p , 将 p 小于等于 0.05 的模块定义为显著差异模块。

1.2.2 功能富集分析 利用累计超几何分布的统计方法对模块中基因进行功能富集分析, 公式如下:

$$P(X > q) = 1 - \sum_{x=1}^q \frac{C_n^x C_{N-n}^{M-x}}{C_N^M} \quad (4)$$

其中 N 表示注释系统中基因总数, n 表示将要考察的节点或通路本身注释的基因数, M 为模块中基因数, x 为模块中基因与节点或通路的交集数目。

2 结果

2.1 显著差异模块

我们进行了三次差异筛选: 正常对照组与未复发组 (A-B), 正常对照组与复发组 (A-C), 未复发组与复发组 (B-C)。共筛选出 22 个显著差异模块见附表 1。

研究的主要目的是寻找静脉血栓复发的分子机制, 所以这里我们将从 A-C 组以及 B-C 组获得的显著差异模块作为主要研究对象, 筛选获得的部分显著差异模块的详细信息列于表 1。

表 1 A-C 组和 B-C 组部分显著差异模块

Table 1 A-C group and B-C group part of significant difference modules

Module	Gene Name	A-C	B-C
m15	CCR5,FLT4,GSN,PIP5K1A,PELP1,INPP5J	√	-
m18	ETS1,ETS2,FOS,JUN	√	-
m19	HINT1,RAF1,RHEB,BAG2,CNKSR1	√	-
m25	IL2RG,IL6R,JAK1,JAK3,STAT1,STAT2,STAT4,STAT6,TYK2,PTPRU,IRF9	√	√
m33	ACTN1,CAPZB,EPB41,RDX,VASP,VCL,ZYX,ARPC1B,PPP1R9A,DLGAP1	√	-
m35	RHOA,ARHGAP4,ARHGAP6,LPAR1,GNA12,PKN1,PRKCSH,ARHGEF5,ARHGEF1,ARHGEF11,FARP1,GNA13,AKAP13	√	-
m38	CD3E,CD4,CD28,CTLA4,TRA@,CXCR4	√	-
m82	CLCA1,COL17A1,DAB2,DSP,ITGA6,ITGB4,EIF6,KRT18,RPSA,MMP7,PIK3CB,PIK3CD,PLEC1,PRKCD,VIM,PIK3R3,MTMR12,PTPN5	√	√
m86	AKT1,CDC42,INPP5A,MAP3K9,PAK1,PDK1,PDK2,PTEN,MAP4K2,TP53BP1,TNKS,ARHGEF2,ARHGEF6	√	-
m104	APLP1,CDC34,GFAP,MDM2,PSMB6,PSMD9,SNCA,U	√	-

注: '√' 表示显著差异, '-' 表示不显著差异。

Note: '√' denotes significant differential, '-' denotes not significant differential.

2.2 显著差异模块分析

2.2.1 功能分析 利用 David 数据库 (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>) 对每一个显著差异模块进行 GO 和 KEGG 功能富集, 设定 $p \leq 0.05$ 的功能类为显著功能类。以模块为研究对象, 每个模块除自身存在较重要的功能类与静脉血栓相关外, 多个显著差异模块其共享的相同功能类, 也与药物应答、静脉血栓形成及复发密切相关 (图 2)。我们发现 m19、m25、m35、m48、m86 和 m110 这 6 个显著差异模块同时富集到 intracellular signaling

cascade 功能类, 而外源性凝血是公认的“诱导型”信号级联, 如: 凝血酶原 FVII 在炎症或组织损伤部位时组织因子 (TF) 表达上调, 随着信号级联的实质性启动, 蛋白水解激活的阵列产生介导的信号 (活性丝氨酸蛋白酶: FVIIa, FXa 和 FIIa) 导致纤维蛋白生产过剩呈现高凝状态进而形成血栓^[2]。m38、m48、m82、m86 和 m110 这 5 个显著差异模块功能富集结果中都注释到 T cell receptor signaling pathway 功能类 (图 3)。在内皮细胞中, 受抗原刺激的 iNKT 细胞会导致 IL-8R CXCR2 的上调和

表皮生长因子受体和多种细胞内信号效应的磷酸化,包括 FAK、Src、和 STAT1 等,作用于动脉粥样硬化斑块、炎性细胞

与斑块内新生血管的区域,有助于斑块内新生血管和幼芽形成^[26]。

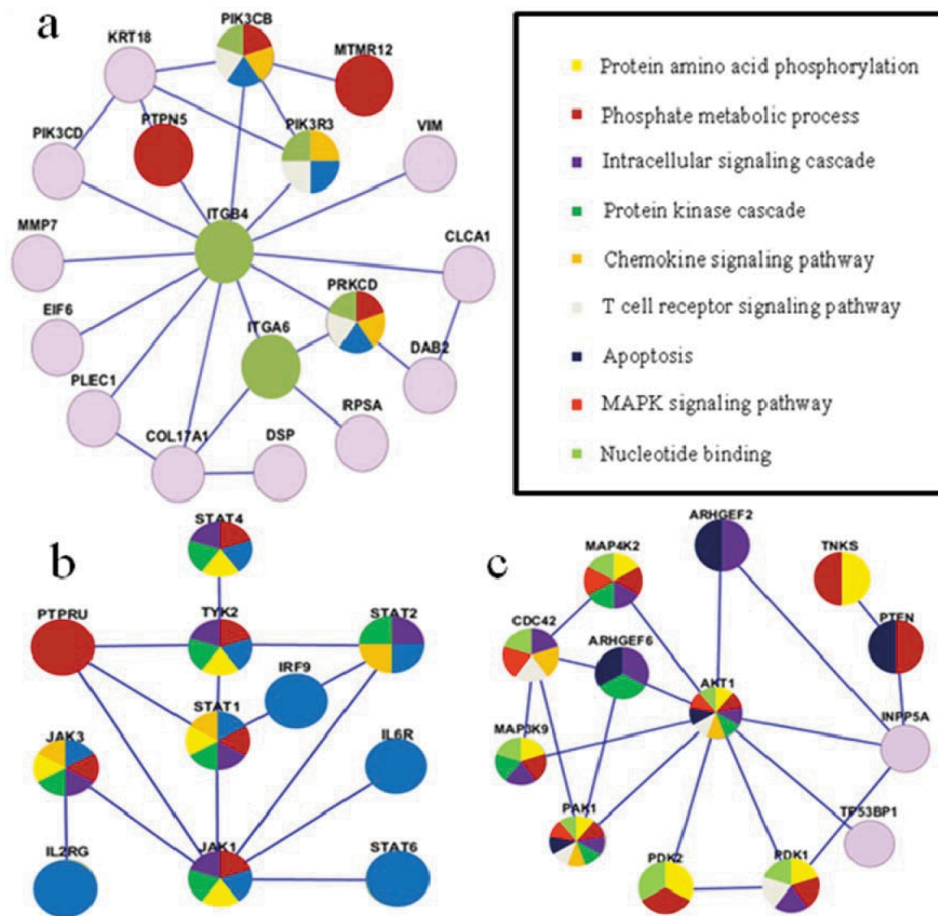


图2 部分模块的基因显著富集的功能类

Fig.2 Genes of part of modules significantly enriched functional classes

Note: a denotes m82's Enrichment, b denotes m25's Enrichment, c denotes m86's Enrichment.

2.2.1 与复发相关分析 为了分析显著差异模块对于静脉血栓的形成、复发产生的影响,通过考察其在三组中的表达差异改变的情况,将这些模块分成三类来研究。

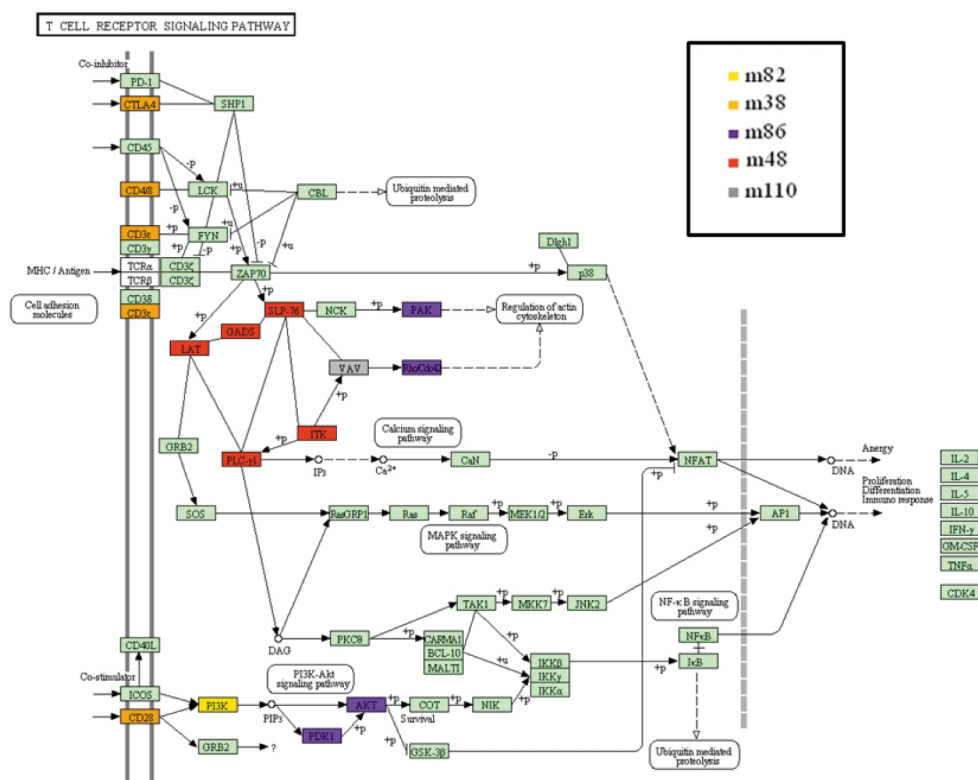
第一类:m82 是在 A-C 组和 B-C 组都显著差异的,而在 A-B 组不显著差异的模块,即在复发状态与正常和未复发状态相比,模块均呈现显著的表达差异性,而未复发与正常间无差异,说明该模块的表达差异改变不仅能够显示出与静脉血栓复发相关,同时还能够揭示出华法令治疗静脉血栓的有效性。如:ITGA6 是细胞外基质粘附受体之一,有证据表明,细胞外基质和细胞粘附分子在血栓形成和炎症中起到至关重要的作用^[27]。包含 ITGB4 的内皮细胞系可提供一种体外模型用于对心血管血栓形成和癌症进行药物和基因治疗的研究^[28]。m82 中基因 COL17A1 与已知血栓相关基因 AR 互作,同时又与基因 ITGB6 协同改变促进细胞黏连的增加,可能引起静脉血栓的复发。

功能分析表明,m82 主要富集到 phosphate metabolic process 和 cell adhesion 等 GO 功能类,以及 T cell receptor signaling pathway、Jak-STAT signaling pathway 和 Chemokine signaling pathway 等 KEGG 通路(图 2)。T 细胞通过直接损伤细胞的效应功能,破坏组织结构进而形成斑块^[29];T 细胞的活化过程是

功能性的,它不仅促进抗原提呈细胞结合 T 细胞受体,而且也提供必要的共刺激信号,T 细胞上表达的 CD28/B7 结合抗原提呈细胞上的 CD80 和 CD86 参与共刺激通路,且原发性 T 细胞的活化可呈现斑块内的功能性促炎症反应程序^[30]。趋化因子通过募集和活化白细胞亚群有效地介导炎症反应,而局部的炎症反应促进了不稳定斑块的形成与破溃,进而通过血小板活化及纤维蛋白原的介导形成血栓^[31]。炎症趋化因子 CXCL16 引发血小板活化和粘附,通过 CXC motif 受体 6- 依赖磷脂酰肌醇 3- 激酶 / Akt 信号和旁分泌活化,在血栓闭塞性疾病中起决定性作用^[32]。乙型肝炎病毒感染和活化的 TGF- β -miR-34a-CCL22 过程可作为诱发肝癌患者门脉血栓发展的有力致病因素^[33]。

为了考察华法令的药物作用效果,我们分析了模块 m82 真实表达值(D 值)的波动情况。m82 在 A-C 组的 D 值(0.154399959)远大于在 B-C 组的 D 值(0.065837319),表明此模块能够反映出华法令对静脉血栓具有很好的抑制效果。

第二类:m25 是在三组中都显著差异的模块,不仅揭示了该模块是引起复发的可能根源,还表明了华法令对静脉血栓的治疗效果不佳。m25 模块中大部分基因主要富集在 protein amino acid phosphorylation, intracellular signaling cascade, protein kinase cascade 和 phosphate metabolic process 等 GO 功能



JAK1、JAK3、STAT2、STAT6 和 TYK2, 它们的差异表达和协同作用也可能是通过此信号级联导致静脉血栓形成和复发。另外, m25 中的基因 JAK1 和 STAT1 与已知血栓相关基因 AR 的作用相似, 对有机物质刺激产生响应并经由细胞内信号级联影响血栓形成和药物的治疗效果。

第三类: 在 A-B 和 A-C 组都呈现显著差异, B-C 组不显著差异的模块, 能够揭示出华法令对静脉血栓疗效不够显著, 进而导致了复发。这类模块包括 m15、m18、m19、m33、m35、m59、m86、m104 和 m110。功能富集分析发现其中多个模块富集到 intracellular signaling cascade、phosphate metabolic process、Regulation of actin cytoskeleton 和 T cell receptor signaling pathway

等功能类, 其中 m86 的部分功能类见图 2。有研究发现, 酪氨酸磷酸化事件介导血小板活化可调节血管损伤部位血小板粘附和凝聚, 功能 CLP36 的缺乏会加速血栓形成和增强促凝活性^[38]。PI3K 活性升高可使 Akt 磷酸化增强, 进而通过 mTORs 与 VASP 来活化血小板表面的 Gp II b/III a 受体, 导致血小板形状改变, 最后促进血小板的粘附、聚集, 导致血小板血栓形成^[39]。

为了能够进一步了解这类模块在形成静脉血栓过程中所起的作用, 或对复发产生的影响。我们将此类模块在 A-B 与 A-C 两组差异筛选过程中分别得到的真实 D 值进行比较分析, 具体的结果见表 2。

表 2 真实 D 值比较结果

Table 2 Comparison of results of real D value

module	D12	D13	result
m15	0.229667622	0.266182599	$D_{12} < D_{13}$
m18	0.454817475	0.418023513	$D_{12} < D_{13}$
m19	0.208707722	0.25069317	$D_{12} < D_{13}$
m33	0.17372174	0.233983648	$D_{12} < D_{13}$
m35	0.225736346	0.27560081	$D_{12} < D_{13}$
m59	0.399123388	0.350961353	$D_{12} < D_{13}$
m86	0.158441046	0.204316732	$D_{12} < D_{13}$
m104	0.193052426	0.234545073	$D_{12} < D_{13}$
m110	0.10524163	0.103963277	$D_{12} < D_{13}$

Note: 'D12' denotes module's real D value at A-B group, 'D13' denotes module's real D value at A-C group.

依据表 2 中的结果, m15、m19、m33、m35、m86 和 m104 这六个模块是 $D_{12} < D_{13}$ 的, 即在静脉血栓形成的过程中其模块的表达改变量是持续增加的, 则提示这些模块对于静脉血栓的形成是重要的。m18、m59 和 m110, 虽然 $D_{12} > D_{13}$, 但在复发和未复发状态下表达也都发生了显著改变, 此类模块可能是对于华法令药物应答不显著, 在血栓形成过程中也起重要的作用。

在人类信号网络中, m15 中基因 PELP1 与已知血栓相关基因 ESR1 互作, 并和 INPP5J 共同激活已知的血栓相关基因 CCR5 的表达, 使得该基因在复发和未复发状态下表达下调, 可能导致血栓形成; m86 中基因 AKT1 在复发和未复发状态下表达下调, 且复发状态比未复发状态表达更低, AKT1 能够影响已知血栓相关基因 NR3C1、NOS3 和 TERT 的表达, 它们共同调节细胞凋亡功能及细胞内信号级联反应, 引起静脉血栓复发; m104 中基因 MDM2 像已知血栓相关基因 CDKN2A 一样可能是使细胞内蛋白质代谢过程调节紊乱, 引发血栓的形成或复发。

3 讨论

为研究静脉血栓患者经过华法令治疗后复发的分子机制, 我们采用具有三种对比数据的表达谱, 结合人类信号网络采用差异模块筛选策略获得不同状态间显著差异的模块, 从功能层面和互作分析其对静脉血栓形成和复发的影响, 且同时评估华

法令在静脉血栓治疗中的有效性。研究结果得到了三类与华法令治疗后静脉血栓复发相关的 8 个模块, 第一类: m82 的表达差异改变不仅能够显示出与静脉血栓复发相关, 同时还能够揭示出华法令治疗静脉血栓的有效性。第二类: m25 表明华法令对静脉血栓的治疗效果不佳, 也是引起复发的根源之一。第三类: m15、m19、m33、m35、m86 和 m104 能够揭示出华法令对静脉血栓疗效不够显著, 进而导致了复发。这些模块不仅与已知静脉血栓相关基因存在紧密的互作关系, 而且其模块中的基因显著富集到 phosphate metabolic process、Jak-STAT signaling pathway 和 T cell receptor signaling pathway 等被现有文献证实与血栓形成密切相关的生物学功能类。模块中的基因大部分也被证实与血栓形成有关, 如: AKT1 通过 cGMP 依赖的信号通路介导 GPIb-IX 信号, 进而介导血小板粘附^[40]。血小板内皮细胞粘附分子-1 (PECAM-1) 通过抑制 GPVI 受体 γ 链信号, 补充 SHP-2 进而磷酸化免疫受体酪氨酸抑制基序的一部分, 对血栓形成和血小板活性起负调节的作用^[41]。有研究表明, CDC42 影响血小板丝状伪足的形成、分泌及聚集, 因此在介导止血和血栓形成中起着重要的作用^[42]。

通过与静脉血栓复发相关模块的分类研究, 我们发现不同分类的模块所表征的华法令对于静脉血栓的治疗效果有一定的差异性, 但都是其静脉血栓复发的重要根源。因此我们试图从这些显著差异模块与已知血栓防治药物的靶基因在信号转导网络中的关联性入手, 来寻求新的治疗静脉血栓和防止静脉

血栓复发的用药途径。三氟柳是一种抗血小板凝聚药,在 m15 中我们发现了与三氟柳的靶基因 NFKB1 相互作用的基因 INPP5J,进行华法令抗凝治疗时,也同时使用三氟柳,则可能降低静脉血栓复发的几率。m18 包含那屈肝素的靶基因 FOS,如果将那屈肝素和华法令同时用作静脉血栓的治疗,则可能将 m18 的表达恢复到正常状态,从而起到抑制静脉血栓复发的作用。m38 是 A-C 特有的显著差异模块,也就是说 m38 发生差异改变,可导致复发的产生,在 m38 中有和亭扎肝素钠的靶基因 CXCL12 相互作用的基因 CXCR4,如果华法令和亭扎肝素钠联合用药,则会抑制 m38 表达的改变,可将引起静脉血栓复发的根源清除。

本文从人类信号网络出发,通过考察正常、未复发及复发三种状态表达数据,筛选出与复发显著相关的差异模块,结合功能层面和表达层面的分析,最终我们识别了三类与复发密切相关的 8 个模块,并显示了其对华法令治疗静脉血栓效能的评估性,进一步与已知血栓相关基因及其治疗药物靶基因的关联性分析,提出了联合用药的可能途径。我们推测获得的与静脉血栓复发密切相关的显著差异模块中的基因,可作为潜在的新的治疗静脉血栓复发的药物靶点,对其进行深入探索性研究将对治愈血栓、防止复发及研究复发机制具有重要的意义。

参考文献(References)

- [1] Beckman MG, Hooper WC, Critchley SE, et al. Venous thromboembolism: a public health concern [J]. *Am J Prev Med*, 2010, 38 (S4): S495-501
- [2] Jenkins PV, Rawley O, Smith OP, et al. Elevated factor VIII levels and risk of venous thrombosis[J]. *Br J Haematol*, 2012, 157(6): 653-663
- [3] Lopez JA, Kearon C, Lee AY. Deep venous thrombosis [J]. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2004: 439-456
- [4] Mackman N. New insights into the mechanisms of venous thrombosis [J]. *J Clin Invest*, 2012, 122(7): 2331-2336
- [5] Noble S, Pasi J. Epidemiology and pathophysiology of cancer-associated thrombosis[J]. *Br J Cancer*, 2010, 102(S1): S2-S9
- [6] Weberová D, Weber P, Kubesová H, et al. Occurrence of pulmonary embolism among 260 in-patients of acute geriatric department aged 65+ years in 2005-2010[J]. *Adv Gerontol*, 2012, 25(3): 506-512
- [7] Tjeldhorn L, Iversen N, Sandvig K, et al. Functional characterization of the protein C A267T mutation: evidence for impaired secretion due to defective intracellular transport[J]. *BMC Cell Biol*, 2010, 11: 67
- [8] Munteanu I, Munteanu I. Recurrent venous thromboembolic events--a prospective study[J]. *Pneumologia*, 2012, 61(4): 214-220
- [9] Tufano A, Guida A, Coppola A, et al. Risk factors and recurrent thrombotic episodes in patients with cerebral venous thrombosis[J]. *Blood Transfus*, 2013, 6: 1-6
- [10] Heit JA, Lahr BD, Petterson TM, et al. Heparin and warfarin anticoagulation intensity as predictors of recurrence after deep vein thrombosis or pulmonary embolism: a population-based cohort study[J]. *Blood*, 2011, 118(18): 4992-4999
- [11] Carrier M, Le Gal G, Cho R, et al. Dose escalation of low molecular weight heparin to manage recurrent venous thromboembolic events despite systemic anticoagulation in cancer patients [J]. *J Thromb Haemost*, 2009, 7(5): 760-765
- [12] Muslimani AA, Spiro TP, Chaudhry AA, et al. Venousthromboembolism in lymphoma: how effectively are we treating patients [J]. *Am J Clin Oncol*, 2009, 32(5): 521-523
- [13] Hindi N, Cordero N, Espinosa E. Thromboembolic disease in cancer patients[J]. *Support Care Cancer*, 2013, 21(5): 1481-1486
- [14] Combe S, Büller HR. New treatments for venous thromboembolic disease[J]. *J Mal Vasc*, 2011, 36 (S1): S16-S19
- [15] Koscielny J, Kiesewetter H, J rg I, et al. Ximelagatran for treatment and prophylaxis of recurrent events in deep vein thrombosis [J]. *Clin Appl Thromb Hemost*, 2007, 13(3): 299-307
- [16] Beyer SJ, Zhang X, Jimenez RE, et al. Microarray analysis of genes associated with cell surface NIS protein levels in breast cancer [J]. *BMC Res Notes*, 2011, 4: 397
- [17] Sirota M, Dudley JT, Kim J, et al. Discovery and preclinical validation of drug indications using compendia of public gene expression data[J]. *Sci Transl Med*, 2011, 3(102): 102er7
- [18] Lopes FM, Cesar RM, Costa Lda F. Gene expression complex networks: synthesis, identification, and analysis [J]. *J Comput Biol*, 2011, 18(10): 1353-1367
- [19] Silberberg Y, Gottlieb A, Kupiec M, et al. Large-scale elucidation of drug response pathways in humans [J]. *J Comput Biol*, 2012, 19(2): 163-174
- [20] Kotelnikova E, Shkrob MA, Pyatnitskiy MA, et al. Novel approach to meta-analysis of microarray datasets reveals muscle remodeling-related drug targets and biomarkers in Duchenne muscular dystrophy [J]. *PLoS Comput Biol*, 2012, 8(2): e1002365
- [21] Zhang A, Sun H, Yang B, et al. Predicting new molecular targets for rhein using network pharmacology[J]. *BMC Syst Biol*, 2012, 6: 20
- [22] Laenen G, Thorrez L, Börmigen D, et al. Finding the targets of a drug by integration of gene expression data with a protein interaction network[J]. *Mol Biosyst*, 2013, 9(7): 1676-1685
- [23] Verschuren L, Radonjic M, Wielinga PY, et al. Systems biology analysis unravels the complementary action of combined rosuvastatin and ezetimibe therapy [J]. *Pharmacogenet Genomics*, 2012, 22(12): 837-845
- [24] Cui Q, Ma Y, Jaramillo M, et al. A map of human cancer signaling [J]. *Mol Syst Biol*, 2007, 3: 152
- [25] Chu AJ. Tissue factor upregulation drives a thrombosis-inflammation circuit in relation to cardiovascular complications [J]. *Cell Biochem Funct*, 2006, 24(2): 173-192
- [26] Kyriakakis E, Cavallari M, Pfaff D, et al. IL-8-mediated angiogenic responses of endothelial cells to lipid antigen activation of iNKT cells depend on EGFR transactivation[J]. *J Leukoc Biol*, 2011, 90(5): 929-939
- [27] Park HK, Jo DJ. Polymorphisms of integrin, alpha 6 contribute to the development and neurologic symptoms of intracerebral hemorrhage in korean population [J]. *J Korean Neurosurg Soc*, 2011, 50 (4): 293-298
- [28] Rhim JS, Tsai WP, Chen ZQ, et al. A human vascular endothelial cell model to study angiogenesis and tumorigenesis [J]. *Carcinogenesis*, 1998, 19(4): 673-681
- [29] Pryshchep S, Goronzy JJ, Parashar S, et al. Insufficient deactivation of the protein tyrosine kinase lck amplifies T-cell responsiveness in

附表 1 显著差异模块

Supplementary table 1 significant differential modules

Module	A-B	A-C	B-C
m5	√		
m9			√
m15	√	√	
m18	√	√	
m19	√	√	
m25	√	√	√
m26			√
m27			√
m33	√	√	
m35	√	√	
m38		√	
m48		√	
m58			√
m59	√	√	
m70	√		√
m82		√	√
m86	√	√	
m90	√		
m98			√
m104	√	√	
m110	√	√	
m111		√	

Note: A-B Screening of differential module between samples of control group and samples of non-recurrent group, A-C Screening of differential module between samples of control group and samples of recurrent group, B-C Screening of differential module between samples of non-recurrent group and samples of non-recurrent group, '√' denotes significant differential.

acute coronary syndrome[J]. Circ Res, 2010, 106(4): 769-778

- [30] Afek A, Harats D, Roth A, et al. Evidence for the involvement of T cell costimulation through the B-7/CD28 pathway in atherosclerotic plaques from apolipoprotein E knockout mice [J]. Exp Mol Pathol, 2004, 76(3): 219-223

- [31] 黄尧尧, 汤成春. 趋化因子及其受体与冠心病关系研究进展[J]. 现代医学, 2010, 38(3): 312-316

Huang Yao-yao, Tang Cheng-chun. Research progress of chemokines and their receptors with coronary heart disease [J]. Modern Medical Journal, 2010, 38(3): 312-316

- [32] Borst O, Münzer P, Gatidis S, et al. The inflammatory chemokine CXC motif ligand 16 triggers platelet activation and adhesion via CXC motif receptor 6-dependent phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling[J]. Circ Res, 2012, 111(10): 1297-1307

- [33] Yang P, Li QJ, Feng Y, et al. TGF- β -miR-34a-CCL22 signaling-induced Treg cell recruitment promotes venous metastases of HBV-positive hepatocellular carcinoma[J]. Cancer Cell, 2012, 22(3): 291-303

- [34] Miyakawa Y, Oda A, Druker BJ, et al. Thrombopoietin induces tyrosine phosphorylation of Stat3 and Stat5 in human blood platelets [J]. Blood, 1996, 87(2): 439-446

- [35] Fusté B, Serradell M, Escolar G, et al. Erythropoietin triggers a signaling pathway in endothelial cells and increases the thrombogenicity of their extracellular matrices in vitro [J]. Thromb Haemost, 2002, 88(4): 678-685

- [36] Rousseau A, Woodhams B, Paunet-Bobo M, et al. Decreased procoagulant phospholipids in patients treated by vitamin K antagonists[J]. Thromb Res, 2012, 130(3): 491-494

- [37] Hubackova S, Krejcikova K, Bartek J, et al. IL1- and TGF β -Nox4 signaling, oxidative stress and DNA damage response are shared features of replicative, oncogene-induced, and drug-induced paracrine 'bystander senescence' [J]. Aging (Albany NY), 2012, 4(12): 932-951

- [38] Gupta S, Braun A, Morowski M, et al. CLP36 is a negative regulator of glycoprotein VI signaling in platelets [J]. Circ, 2012, 111(11): 1410-1420

(下转第 154 页)

- exposure to the antiandrogen flutamide alters connexin 43 gene expression in adult porcine ovary [J]. *Domest Anim Endocrinol*, 2011, 40(1): 19-29
- [19] Kopera I, Durllej M, Hejmej A, et al. Differential expression of connexin 43 in adult pig testes during normal spermatogenic cycle and after flutamide treatment [J]. *Reprod Domest Anim*, 2011, 46(6): 1050-1060
- [20] Rabih T, Charbel T, Laila K. Modulation of Cx43 and gap junctional intercellular communication by androstenedione in rat polycystic ovary and granulosa cells in vitro [J]. *J Reprod Infertil*, 2012, 13(1): 21-32
- [21] Chojnacka K, Brehm R, Weider K, et al. Expression of the androgen receptor in the testis of mice with a Sertoli cell specific knock-out of the connexin 43 gene (SCCx43KO(-/-))[J]. *Reprod Biol*, 2012, 12(4): 341-346
- [22] Lyng FM, Jones GR, Rommerts FF. Rapid androgen actions on calcium signaling in rat sertoli cells and two human prostatic cell lines: similar biphasic responses between 1 picomolar and 100 nanomolar concentrations [J]. *Biol Reprod*, 2000, 63(3): 736-747
- [23] Chu G, Misawa I, Chen H, et al. Contribution of FSH and triiodothyronine to the development of circadian clocks during granulosa cell maturation [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2012, 302(6): E645-653
- [24] Chen H, Zhao L, Chu G, et al. FSH induces the development of circadian clockwork in rat granulosa cells via a gap junction protein Cx43-dependent pathway [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2013, 304(6): E566-575
- [25] Pandey A, Gupta SC, Gupta N. Effect of FSH and LH hormones on oocyte maturation of buffalo and gene expression analysis of their receptors and Cx43 in maturing oocytes [J]. *Zygote*, 2010, 18(3): 231-234
- [26] Stock A, Sies H. Thyroid hormone receptors bind to an element in the connexin43 promoter [J]. *Biol Chem*, 2000, 381(9-10): 973-979
- [27] Marchlewska K, Kula K, Walczak-Jedrzejowska R, et al. Role of FSH and triiodothyronine in Sertoli cell development expressed by formation of connexin 43-based gap junctions [J]. *J Exp Zool A Ecol Genet Physiol*, 2011, 315(6): 329-336
- [28] Wu J, Taylor RN, Sidell N, et al. Retinoic acid regulates gap junction intercellular communication in human endometrial stromal cells through modulation of the phosphorylation status of connexin 43 [J]. *J Cell Physiol*, 2013, 228(4): 903-910
- [29] Batias C, Siffroi JP, Fénelon P, et al. Connexin43 gene expression and regulation in the rodent seminiferous epithelium [J]. *J Histochem Cytochem*, 2000, 48(6): 793-805

(上接第 138 页)

- [39] 温志超. 氧化型低密度脂蛋白活化血小板机理的初步探讨 [J]. *心血管病学进展*, 2012, 33(4): 478-481
- Wen Zhi-chao. Understanding How Oxidized Low-Density Lipoprotein Enhances Platelet Aggregation [J]. *Adv Cardiovasc Dis*, 2012, 33(4): 478-481
- [40] Yin H, Stojanovic A, Hay N, et al. The role of Akt in the signaling pathway of the glycoprotein Ib-IX induced platelet activation [J]. *Blood*, 2008, 111(2): 658-665
- [41] Moraes LA, Barrett NE, Jones CI, et al. Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 regulates collagen-stimulated platelet function by modulating the association of phosphatidylinositol 3-kinase with Grb-2-associated binding protein-1 and linker for activation of T cells [J]. *J Thromb Haemost*, 2010, 8(11): 2530-2541
- [42] Akbar H, Shang X, Perveen R, et al. Gene targeting implicates Cdc42 GTPase in GPVI and non-GPVI mediated platelet filopodia formation, secretion and aggregation [J]. *PLoS One*, 2011, 6(7): e22117