

生物信息学方法分析动脉闭塞性疾病中的凋亡相关基因

韩舒宁, 张翌帆*

青岛大学附属医院感染管理部, 山东 青岛

收稿日期: 2023年5月28日; 录用日期: 2023年6月23日; 发布日期: 2023年6月30日

摘要

目的: 动脉闭塞性疾病(arterial occlusive disease, AOD)是一种动脉疾病, 其最常见的原因是动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)。凋亡相关基因在AOD的病理生理过程中起着至关重要的作用。因此, 利用凋亡相关基因的表达谱来探讨凋亡与AOD之间的关系可能为其预防和治疗提供新的见解。方法: GSE57691数据集的差异表达的凋亡相关基因来自分子特征数据库(Molecular Signature Database, MSigDB)和基因表达(Gene Expression Omnibus, GEO)数据库, 通过基因本体(Gene Ontology, GO)分析、京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)、蛋白质互作网络(Protein-Protein Interaction Networks, PPI)分析GSE57691数据集的差异表达的凋亡相关基因。结果: 基于GSE57691数据集, 共选择了18个差异表达的凋亡相关基因。GO分析显示凋亡相关基因主要富集在胶质细胞发育及活化、生长因子受体结合等。KEGG分析表明凋亡相关基因主要富集在晚期糖基化终末产物(advanced glycation end products, AGE)与糖基化终末产物受体(receptor for advanced glycation end products, RAGE)信号通路糖尿病并发症、辅助性T细胞17 (T helper cell 17, Th17)细胞分化等。IL1B、IL6、SOD1、PPP3R1、APP等的表达被认为是PPI调控网络的重点。结论: 凋亡和凋亡相关基因可能在调节AOD的病理生理学方面发挥重要作用。

关键词

动脉闭塞性疾病, 动脉粥样硬化, 凋亡, 生物信息学分析, 基因表达

Analysis of Apoptosis Related Genes in Arterial Occlusive Disease Using Bioinformatics Methods

Shuning Han, Yifan Zhang*

Institute for Translational Medicine, Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao Shandong

*通讯作者。

Abstract

Objective: Arterial occlusive disease (AOD) is an arterial disease, the most common cause of which is atherosclerosis (AS). Apoptosis related genes play a crucial role in the pathophysiological process of AOD. Therefore, exploring the relationship between apoptosis and AOD using the expression profile of apoptosis related genes may provide new insights for its prevention and treatment. **Method:** The differentially expressed apoptosis related genes in GSE57691 data set came from Molecular Signature Database (MSigDB) and Gene Expression Omnibus (GEO) database. The differentially expressed apoptosis related genes in GSE57691 data set were analyzed through Gene Ontology (GO) analysis, Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) and Protein-Protein Interaction Networks (PPI). **Result:** Based on the GSE57691 dataset, a total of 18 differentially expressed apoptosis related genes were selected. GO analysis shows that apoptosis related genes are mainly enriched in the development and activation of glial cells, as well as the binding of growth factor receptors. KEGG analysis showed that apoptosis related genes are mainly enriched in the advanced glycation end products and receptor for advanced glycation end products (AGE-RAGE) signaling pathways diabetic complications, as well as in T helper cell 17 (Th17) cell differentiation. The expression of IL1B, IL6, SOD1, PPP3R1, APP, etc. is considered key focus of the PPI regulatory network. **Conclusion:** Apoptosis and apoptosis related genes may play an important role in regulating the pathophysiology of AOD and AS.

Keywords

Arterial Occlusive Disease, Atherosclerosis, Apoptosis, Bioinformatics Analysis, Gene Expression

Copyright © 2023 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

凋亡是一个受到高度监管的细胞死亡过程[1]。与坏死等创伤性的细胞死亡不同,凋亡是一个理性和积极的决定,牺牲特定的细胞来获得更大的生物体的利益。这是多细胞生物常见的正常生理过程[2]。尽管许多谜团仍然存在于相关的研究领域,但是今天已经有充分的证据表明,凋亡以一种协调的方式赋予多细胞生物以优势,从而使生物体维持体内平衡和微调生活史[3]。凋亡与多种疾病密切相关,如癌症、心血管疾病、免疫功能紊乱等[4] [5] [6]。随着凋亡成为研究的焦点,凋亡的深远治疗潜力使研究人员能够开发出有前途的治疗方案,重点是异常细胞的自愿死亡,临床上有用的化疗药物抑制生长或增殖所必需的过程,例如阻断 DNA、mRNA 或蛋白质产生,直接损伤 DNA 或抑制 DNA 复制或染色体分离所需的组分,如此,细胞可能发生有丝分裂突变,失去维持质膜活性的能力或变得衰老,即使它们的凋亡应激反应已经失能[7]。一系列利用凋亡的药物和疗法已被证明对疾病有效,基于细胞凋亡的研究和临床试验正在得到广泛的资金和研究工作的投入。

心血管疾病仍然是世界范围内死亡率和发病率的普遍原因,每年影响 1670 万人[8]。急性心血管死亡的主要原因之一是动脉闭塞性疾病(arterial occlusive disease, AOD),不良预后的 AOD 患者的血管事件影响四肢以及心血管事件[9] [10]。AOD 是一种常见的慢性炎症性疾病,表现为远端组织缺血、缺氧等,其最

常见的原因是动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS) [11]。

研究表明, 凋亡可能参与调节 AS 发生和发展过程中的细胞存活和死亡。AS 病变中的凋亡是由炎症过程触发的, 包括细胞与细胞的接触以及细胞因子和氧化类脂。凋亡在 AS 形成中的作用是双重的, 这取决于斑块的分期: 在早期阶段, 平滑肌和炎症细胞(如淋巴细胞和巨噬细胞)的凋亡死亡可能会延缓 AS 的进程。然而, 一旦斑块形成, 凋亡可能导致斑块破裂和血栓形成。目前, 越来越多的证据表明, 内皮细胞凋亡是 AS 的第一步, 过量的凋亡内皮细胞可能是 AS 发育过程中的一个初步事件[12]。

然而, 目前对 AOD 中凋亡相关基因的研究是有限的。近年来, 生物信息学技术被广泛应用于发掘多种疾病的遗传靶点, 有助于研究人员识别差异表达的基因和潜在的不同信号传导途径[13]。然而, 很少有研究应用于探讨凋亡与 AOD 之间的关系。在本研究中, 我们使用凋亡相关基因来探讨 AOD 与凋亡的关系。筛选差异表达的凋亡相关基因, 并对相关数据进行了基因本体(Gene Ontology, GO)分析、京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)和蛋白质互作网络(Protein-Protein Interaction Networks, PPI)分析。

2. 材料与方法

2.1. 资料收集

基因表达(Gene Expression Omnibus, GEO)数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)是一个高通量的资源功能基因组学数据库, 包括芯片、微阵列和基因表达数据。从 GEO 数据库中获取 GSE57691 数据集, 包含 9 个主动脉粥样硬化组织和 10 个正常主动脉组织。分子特征数据库(Molecular Signature Database, MSigDB, <https://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/>)包含 H 和 C1-C7 八个系列, 其中 HALLMARK_APOPTOSIS 为细胞凋亡特征基因集。

2.2. 差异表达基因分析

为获得微阵列数据的标准化表达矩阵, 我们从数据集中下载了信息, 并利用平台上的注释信息将探针转换为同源基因符号。主成分分析用于测试 GSE 中数据的可重复性, 并使用 R 软件(4.0.0 版)中的“SVA”工具包去除批次效应, 使用“Limma”工具包对数据进行了标准化。阈值为校正 P 值 < 0.05 和 $|\log_2 \text{fold change(FC)}| > 2$ 。热图是使用“heatmap”工具包绘制的。

2.3. PPI 分析

Cytoscape 软件(3.8.1 版)和 STRING 数据库(11.0 版, <https://STRING-db.org/>)用于对差异表达的凋亡相关基因进行交互分析。首先, 利用 STRING 数据库构建包含差异表达凋亡相关基因的 PPI 网络, 综合得分 > 0.4 被认为是统计学显著的相互作用。然后将 PPI 调节网络分析结果导入到 Cytoscape 中进行可视化。

2.4. GO 与 KEGG 分析

GO 和 KEGG 分析是使用 R 软件中的“clusterProfiler”工具包进行的。GO 分析的主要领域是细胞组分(cellular component, CC)、生物过程(biological process, BP)和分子功能(molecular function, MF)。

3. 结果

3.1. AOD 中差异表达的凋亡相关基因

首先, 对两组数据进行主成分分析(Principal Component Analysis, PCA), 结果显示在对照组或 AOD 组中的每个样本之间的距离在维度上很接近, 对照组和 AOD 组之间的距离很远(图 1(a)), 因此 GSE57691

数据集的组内重复性是可以接受的。随后,以校正 P 值 < 0.05 和 $|\log_2\text{fold change (FC)}| > 2$ 为标准,在 AOD 组鉴定出 18 个差异表达的基因在热图(图 1(b))及火山图(图 1(c))中表示,其中包括 7 个上调基因,如白细胞介素-1 β (IL-1B)、白细胞介素-6 (IL-6)、早期应答基因 3 (IER3)、转录激活因子 3 (ATF3)等; 以及和 11 个下调基因,如血小板衍生生长因子受体 β (PDGFRB)、谷胱甘肽过氧化物酶 4 (GPX4)、转化生长因子 β 受体 3 (TGFB3)、细胞周期素 D2 (CCND2)、周期素依赖性激酶抑制因子 1B (CDKN1B)等。

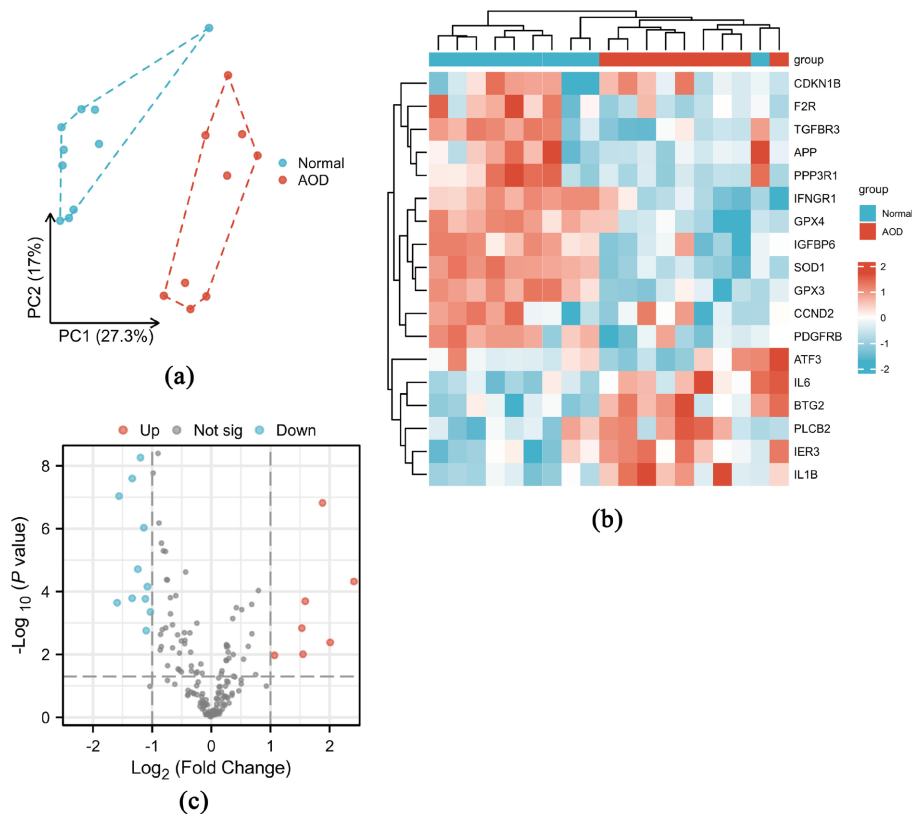


Figure 1. Differentially expressed apoptosis related genes in AOD and healthy samples. (a) Results of the PCA. AOD samples of GSE57691 are marked in red, healthy samples are marked in blue. (b) Heatmap of 18 differentially expressed apoptosis related genes in AOD and healthy samples. (c) Volcano plot of differentially expressed apoptosis related genes. Significantly up regulated and down regulated genes are represented by red and blue dots, respectively

图 1. AOD 和健康样本中差异表达的凋亡相关基因。(a) PCA 分析的结果。GSE57691 中的 AOD 标记为红色, 对照标记为蓝色。(b) AOD 和健康样本中 18 个差异表达的凋亡相关基因的热图。(c) 差异表达的凋亡相关基因的火山图。显著上调和下调的基因分别用红点和蓝点表示

3.2. 候选凋亡相关基因的 GO 和 KEGG 分析

在 GO 分析的基础上,我们发现 BP 中的候选凋亡相关基因在胶质细胞活化、胶质细胞发育等显著富集; CC 中的候选凋亡相关基因在细胞器包膜腔、核膜等显著富集; MF 中的候选凋亡相关基因在生长因子受体结合、谷胱甘肽过氧化物酶活性等显著富集(图 2(a)和图 2(b))。我们还进行了 KEGG 通路富集分析,结果表明候选凋亡相关基因在在晚期糖基化终末产物(advanced glycation end products, AGE)与糖基化终末产物受体(receptor for advanced glycation end products, RAGE)信号通路糖尿病并发症、辅助性 T 细胞 17 (T helper cell 17, Th17)细胞分化等通路中富集(图 2(c)和图 2(d))。

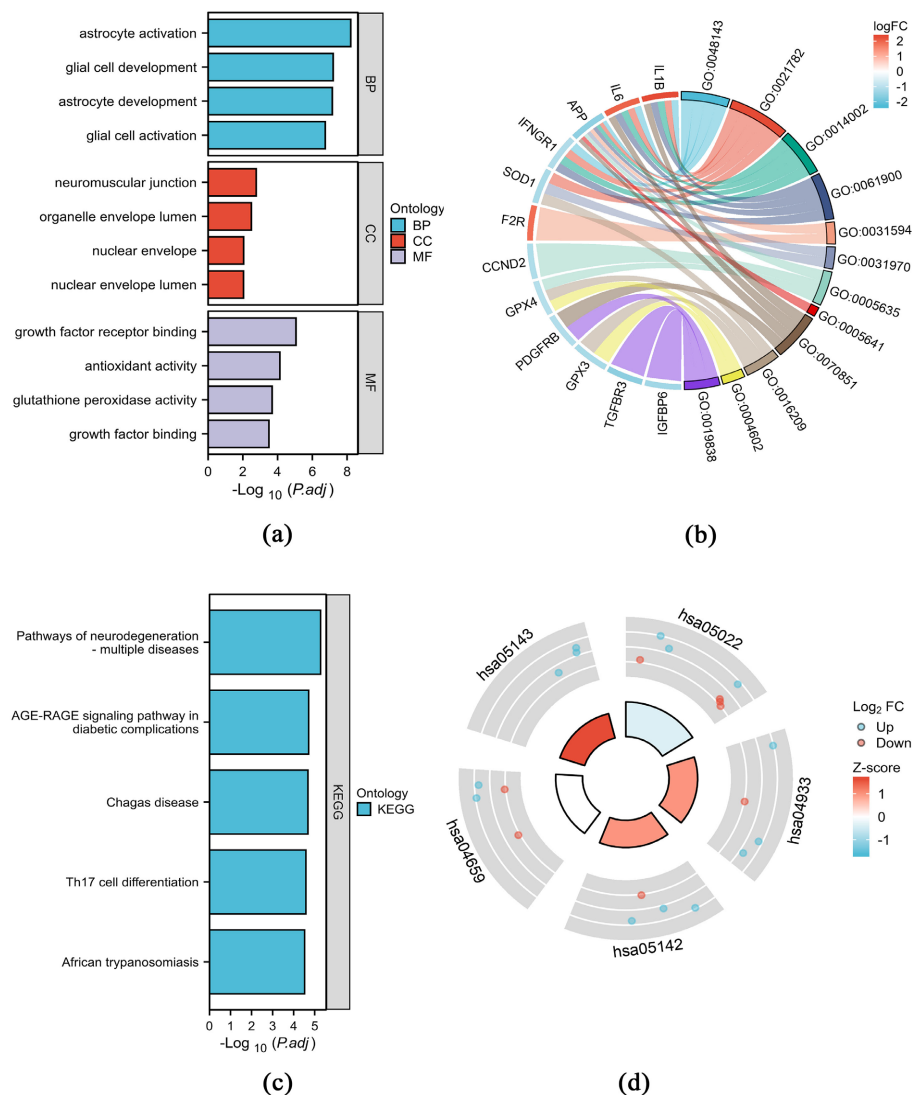


Figure 2. GO and KEGG enrichment analysis of 18 differentially expressed apoptosis related genes. (a) GO analysis Classification bar chart. (b) GO analysis chord diagram. (c) KEGG enrichment analysis histogram. (d) KEGG enrichment analysis circle plot

图 2. 18 个差异表达凋亡相关基因的 GO 和 KEGG 富集分析。(a) GO 分析分类柱状图。(b) GO 分析弦图。(c) KEGG 富集分析直方图。(d) KEGG 富集分析圈图

3.3. 候选凋亡相关基因中的 PPI 网络及枢纽基因的鉴定

我们构建了差异表达的凋亡相关基因的 PPI 调控网络, 包含 17 个节点和 26 个相互作用对, 没有相互作用的候选基因被排除(图 3(a))。在 PPI 网络中, 筛选出得分最高的 5 个基因构成了枢纽框架: IL1B、IL6、一氧化氮歧化酶(SOD1)、蛋白磷酸酶 3 调节因子亚基 1 (PPP3R1)和淀粉样前体蛋白(APP)(图 3(b))。

4. 讨论

越来越多的证据表明, 凋亡参与维持心血管健康。此外, 凋亡相关基因通过调节巨噬细胞、血管平滑肌细胞和内皮细胞来影响 AOD [14]。比如, 抑制 PI3K/Akt 信号能够促进泡沫细胞凋亡和 AS 的进展[15]; lncRNA MIAT 作为晚期 AS 细胞过程的一种新型调节因子, 能够控制平滑肌细胞的凋亡[16]; NRP2 通过调节内皮细胞凋亡在 AS 前发挥重要作用[17]。

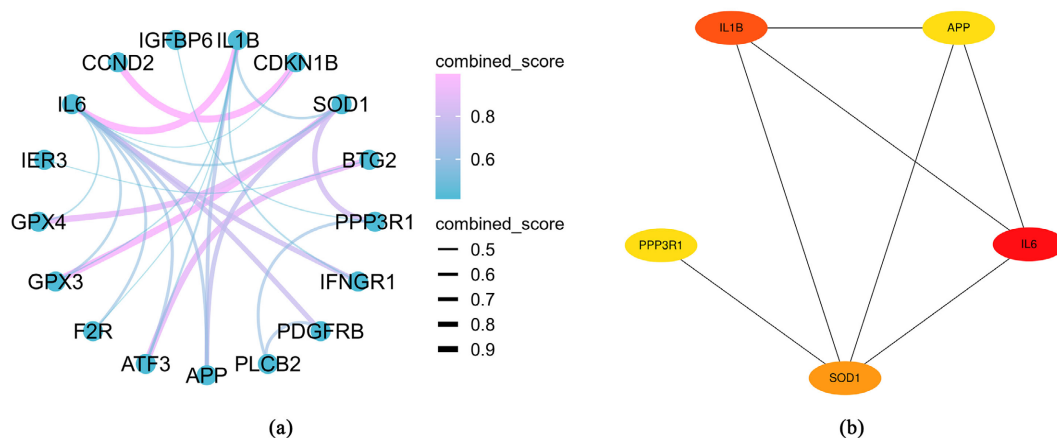


Figure 3. PPI analysis of candidate differentially expressed apoptosis related genes. (a) PPI networks of candidate genes. (b) PPI subnetwork of the top 5 hub candidate genes
图 3. 候选差异表达凋亡相关基因的 PPI 分析。(a) 候选基因的 PPI 网络。(b) 前 5 个枢纽候选基因的 PPI 子网络

基因芯片技术是探索新的疾病生物标志物的一种新方法。Huang 等通过 DNA 微阵列分析从 AOD 巨噬细胞中筛选出 98 个差异表达的基因，然后通过一系列分析将 *KDELR3*, *CD55* 和 *DYNC2H1* 鉴定为关键基因[18]。

在本研究中，为了确定凋亡相关基因与 AOD 之间的关系，采用基因芯片技术从 AOD 组和对照组中鉴定差异表达的凋亡相关基因。首先，我们在 AOD 组和对照组之间筛选了 18 个差异表达的凋亡相关基因。然后，基于 GO 和 KEGG 分析，我们发现差异表达的凋亡相关基因涉及多种生物学过程和信号通路，包括谷胱甘肽过氧化物酶活性、生长因子受体结合、AGE-RAGE 信号通路糖尿病并发症、Th17 细胞分化通路等。最后，通过 PPI 调控网络鉴定总共 5 个枢纽基因(*IL1B*, *IL6*, *SOD1*, *PPP3R1* 和 *APP*)。

活性氧是线粒体呼吸或新陈代谢的副产物，或由谷胱甘肽过氧化物酶产生，在 AOD 病理情况下，活性氧的释放超过内源性防老化剂的能力，导致细胞死亡。在心血管水平，氧化应激与 AOD 密切相关[19]，例如，氧化应激反应凋亡诱导蛋白在阿霉素诱导的大鼠心肌细胞凋亡中起关键作用[20]。通过减少糖化终产物的形成或交联断裂来抑制糖尿病中的 AGE 积累和 RAGE 表达与 AS 的减少有关，AGE 与 RAGE 结合导致一系列炎症和纤维化途径的活化，引起组织损伤[21]。Dong 等发现抑制成纤维细胞生长因子信号传导可抑制 AS 内皮 - 间质转化[22]。Zhang 等认为 Th17 细胞产生的炎性细胞因子 IL-17A 是 AOD 形成的关键因素[23]。以上先前研究都证实了我们的生信分析的合理性。

在 PPI 网络中共确定了 5 个枢纽目标，包括 *IL1B*、*IL6*、*SOD1*、*PPP3R1* 和 *APP*。据研究报道，血管巨噬细胞中的嗅觉感受器 2 通过依赖于 NLRP3 的 *IL1B* 产生来驱动 AS [24]；NF- κ B/*IL-6* 信号通路介导巨噬细胞的炎症反应和 AS [25]；此外，中枢神经系统局部 *APP* 过表达产生的血管促炎作用导致 β -淀粉样蛋白沉积和神经元功能不良之前的 AS 形成[26]。而我们的研究提示这些枢纽基因可能通过调控细胞凋亡而影响 AOD 的发生。

我们的研究基于 GEO 数据库和 MSigDB 对 AOD 中的凋亡相关基因进行了评估。我们发现凋亡相关基因通过多种生物学过程和信号传导途径参与 AOD 的发生和发展。然而，相关基因的表达水平及其发挥的确切调控机制仍有待进一步探究。综上所述，凋亡在 AOD 中扮演至关重要的角色。

致 谢

感谢来自青岛大学附属医院的同事，感谢他们在本研究中的付出。

参考文献

- [1] D'Arcy, M.S. (2019) Cell Death: A Review of the Major Forms of Apoptosis, Necrosis and Autophagy. *Cell Biology International*, **43**, 582-592. <https://doi.org/10.1002/cbin.11137>
- [2] Doran, A.C., Yurdagul Jr, A. and Tabas, I. (2020) Efferocytosis in Health and Disease. *Nature Reviews Immunology*, **20**, 254-267. <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0240-6>
- [3] Xu, X.B., Lai, Y.Y. and Hua, Z.C. (2019) Apoptosis and Apoptotic Body: Disease Message and Therapeutic Target Potentials. *Bioscience Reports*, **39**, No. 1. <https://doi.org/10.1042/BSR20180992>
- [4] Duan, H.X.Y., et al. (2021) Suppression of Apoptosis in Vascular Endothelial Cell, the Promising Way for Natural Medicines to Treat Atherosclerosis. *Pharmacological Research*, **168**, Article ID: 105599. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2021.105599>
- [5] Nagata, S. and Tanaka, M. (2017) Programmed Cell Death and the Immune System. *Nature Reviews Immunology*, **17**, 333-340. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.153>
- [6] Wong, R.S.Y. (2011) Apoptosis in Cancer: From Pathogenesis to Treatment. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, **30**, Article No. 87. <https://doi.org/10.1186/1756-9966-30-87>
- [7] Gerl, R. and Vaux, D.L. (2005) Apoptosis in the Development and Treatment of Cancer. *Carcinogenesis*, **26**, 263-270. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgh283>
- [8] Fisher, S.A., Langille, B.L. and Srivastava, D. (2000) Apoptosis during Cardiovascular Development. *Circulation Research*, **87**, 856-864. <https://doi.org/10.1161/01.RES.87.10.856>
- [9] Frostegård, J. (2013) Immunity, Atherosclerosis and Cardiovascular Disease. *BMC Medicine*, **11**, Article No. 117. <https://doi.org/10.1186/1741-7015-11-117>
- [10] Campia, U., Gerhard-Herman, M., Piazza, G. and Goldhaber, S.Z. (2019) Peripheral Artery Disease: Past, Present, and Future. *The American Journal of Medicine*, **132**, 1133-1141. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2019.04.043>
- [11] Libby, P. (2021) The Changing Landscape of Atherosclerosis. *Nature*, **592**, 524-533. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03392-8>
- [12] Li, M., et al. (2022) Programmed Cell Death in Atherosclerosis and Vascular Calcification. *Cell Death & Disease*, **13**, Article No. 467. <https://doi.org/10.1038/s41419-022-04923-5>
- [13] Gauthier, J., Vincent, A.T., Charette, S.J. and Derome, N. (2019) A Brief History of Bioinformatics. *Briefings in Bioinformatics*, **20**, 1981-1996. <https://doi.org/10.1093/bib/bby063>
- [14] Davies, M.J. (1997) Apoptosis in Cardiovascular Disease. *Heart*, **77**, 498-501. <https://doi.org/10.1136/hrt.77.6.498>
- [15] Wang, Z.Q., et al. (2019) Nε-Carboxymethyl-Lysine-Induced PI3K/Akt Signaling Inhibition Promotes foam Cell Apoptosis and Atherosclerosis Progression. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, **115**, Article ID: 108880. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.108880>
- [16] Fasolo, F., et al. (2021) Long Noncoding RNA MIAT Controls Advanced Atherosclerotic Lesion Formation and Plaque Destabilization. *Circulation*, **144**, 1567-1583. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.120.052023>
- [17] Luo, S., et al. (2022) NRP2 Promotes Atherosclerosis by Upregulating PARP1 Expression and Enhancing Low Shear Stress-Induced Endothelial Cell Apoptosis. *The FASEB Journal*, **36**, e22079. <https://doi.org/10.1096/fj.202101250RR>
- [18] Huang, H.M., et al. (2019) Identification of Biomarkers in Macrophages of Atherosclerosis by Microarray Analysis. *Lipids in Health and Disease*, **18**, Article No. 107. <https://doi.org/10.1186/s12944-019-1056-x>
- [19] Dubois-Deruy, E., Peugnet, V., Turkieh, A. and Pinet, F. (2020) Oxidative Stress in Cardiovascular Diseases. *Antioxidants (Basel)*, **9**, 864. <https://doi.org/10.3390/antiox9090864>
- [20] Yao, T., Fujimura, T., Murayama, K., Okumura, K. and Seko, Y. (2022) Oxidative Stress-Responsive Apoptosis Inducing Protein (ORAIP) Plays a Critical Role in Doxorubicin-Induced Apoptosis in Rat Cardiac Myocytes. *International Journal of Cardiology*, **348**, 119-124. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2021.11.085>
- [21] Jandeleit-Dahm, K., Watson, A. and Soro-Paavonen, A. (2008) The AGE/RAGE Axis in Diabetes-Accelerated Atherosclerosis. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, **35**, 329-334. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2007.04875.x>
- [22] Dong, Y., et al. (2023) Targeting Epsins to Inhibit Fibroblast Growth Factor Signaling While Potentiating Transforming Growth Factor-β Signaling Constrains Endothelial-to-Mesenchymal Transition in Atherosclerosis. *Circulation*, **147**, 669-685. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.122.063075>
- [23] Zhang, L., et al. (2021) Th17/IL-17 Induces Endothelial Cell Senescence via Activation of NF-κB/p53/Rb Signaling Pathway. *Laboratory Investigation*, **101**, 1418-1426. <https://doi.org/10.1038/s41374-021-00629-y>
- [24] Orecchioni, M., et al. (2022) Olfactory Receptor 2 in Vascular Macrophages Drives Atherosclerosis by NLRP3-

- Dependent IL-1 Production. *Science*, **375**, 214-221. <https://doi.org/10.1126/science.abg3067>
- [25] Zheng, Y., *et al.* (2022) Mettl14 Mediates the Inflammatory Response of Macrophages in Atherosclerosis through the NF- κ B/IL-6 Signaling Pathway. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **79**, Article No. 311. <https://doi.org/10.1007/s00018-022-04331-0>
- [26] Tibolla, G., *et al.* (2010) Increased Atherosclerosis and Vascular Inflammation in APP Transgenic Mice with Apolipoprotein E Deficiency. *Atherosclerosis*, **210**, 78-87. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2009.10.040>