

儿童恶性疟疾患者外周血 基因表达谱的改变及生物信息学特征分析*

杨 维¹, 彭 晶¹, 何秋仙², 张荣强³ (1. 西安市中医医院检验科, 西安 710021;
2. 陕西省人民医院体检中心, 西安 710068; 3. 陕西中医药大学公共卫生学院, 陕西咸阳 712046)

摘要:目的 分析儿童恶性疟疾患者外周血基因表达谱、关键蛋白的改变及其生理学功能, 为疟疾防治提供新依据。方法 从基因芯片公共数据库 GEO 中获得疟疾患儿外周血基因芯片数据, 共 5 例疟疾患儿, 均依据 WHO 疟疾诊断标准明确诊断, 采用自体匹配设计, 每位患儿分别在轻症、重症疟疾时采集外周血; 分析不同病情患儿的基因表达谱、蛋白相互作用网络、分子生物学过程、基因功能, 寻找疟疾患儿病情进展相关的关键基因。结果 623 个 (1.93%) 差异表达基因可鉴别区分轻症、重症患儿; OAS2, OAS3, IFIT3 和 USP18 基因是差异基因蛋白-蛋白交互作用网络 (protein-protein interactions, PPI) 中子网络的核心节点; 差异表达基因主要参与机体的免疫防御、免疫应答、对外部刺激应答、干扰素-1 型通路的活化等生物学功能。结论 疟疾患儿病情的进展可能受 OAS2, OAS3, IFIT3 和 USP18 等基因的调控, 儿童的免疫防御能力下降与病情进展具有重要的关系。

关键词:疟原虫; 疟疾; 差异表达基因; 生物信息学

中图分类号: R725.3; Q786 文献标志码: A 文章编号: 1671-7414(2017)04-036-04

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2017.04.010

Changes in Gene Expression Profile and Bioinformatics Analysis of Children with Severe Malaria

YANG Wei¹, PENG Jing¹, HE Qiu-xian², ZHANG Rong-qiang³ (1. Department of Clinical Laboratory, Xi'an Hospital of Traditional Chinese Medicine, Xi'an 710021, China; 2. Medical Examination Center, Shaanxi Provincial People's Hospital, Xi'an 710068, China; 3. School of Public Health, Shaanxi University of Traditional Chinese Medicine, Shaanxi Xianyang 712046, China)

Abstract: **Objective** To conduct bioinformatics analysis of children with severe malaria to find out the key gene changes in order to provide a new basis for the prevention and treatment of malignant malaria. **Methods** Microarray gene chip data was downloaded from public databases GEO and imported into the analysis software STRING, PANTHER and GenClip. The gene expression profiles, protein interaction networks, the process of molecular biology, gene function were analyzed. **Results** 623 (1.93%) differentially expressed genes had a good diagnostic capabilities in the diagnosis of mild and severe malaria. OAS2, OAS3, IFIT3 and USP18 were the core sub-network node of the Protein-Protein Interactions. Differentially expressed genes mainly involved in the body's immune defense, immune response, response to external stimuli, the biological function of type 1 interferon activation pathways. **Conclusion** The progress of malaria of children may be in the regulation of OAS2, OAS3, IFIT3, USP18 and children's immune defense capacity decreased, the malaria began to progress more easily.

Keywords: plasmodium; malaria; differentially expressed genes; bioinformatics

疟疾是世界范围内引起儿童发病和死亡的主要原因之一, 全球受疟疾威胁的儿童人数在 300 万人以上, 每年大约有 100 万例患者死于由疟原虫 (plasmodium falciparum, PF) 引起的恶性疟疾^[1~3]。流行病学研究提示: 年龄较大的疟疾患儿一般呈现较轻的临床症状, 而年龄较小的患儿往往为重症; 提示: 这可能与疟疾患儿的免疫系统发育状况有关^[4,5]。随着基因组学技术的发展, 疟疾基因组学研究取得丰硕成果, 为其防治积累了大量的数据结果。利用生物信息学分析方法和数据挖掘

技术对相关数据进行更深入的分析和挖掘, 对了解疟疾患儿机体的免疫状况、制定防治策略具有重要价值。重症患儿一般由轻症进展而来, 在这进展过程中, 患儿机体免疫状况的改变及其机制仍不清楚。了解人类机体对疟疾 (特别是重症疟疾) 是如何启动免疫防御系统的, 对制定疾病的计划免疫策略和治疗方案均具有重要的意义。本研究针对美国国家生物技术信息中心 (national center of biotechnology information, NCBI) 基因芯片公共数据库 (gene expression omnibus, GEO) 收录的一组疟

* 基金项目: 陕西中医药大学校内基金资助 (基金编号: 2015QN05)。

作者简介: 杨 维 (1981—), 女, 硕士, 主管检验师, 主要从事临床检验, Tel: 15332408186, E-mail: 95250473@qq.com。

通讯作者: 张荣强, 男, 博士在读, Tel: 18165311997, E-mail: zhangrqxianyang@163.com。

疾患儿(<45 月龄)的外周血表达的基因芯片数据资料进行深入挖掘和分析,采用生物信息学分析技术探讨轻度恶性疟原虫疟疾患儿进展为重症疟疾过程中的外周血分子网络改变情况及其可能涉及分子生物学功能,并了解上述改变与患儿免疫状况的关系,旨在为疟疾的防治提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 数据来源 在 NCBI 的 GEO 数据库中以“Malaria”为检索词进行检索,获得 Daily JP 于 2012 年 1 月提交的 GSE33811 基因芯片数据。GSE33811 数据集是采用 Affymetrix 公司人类 ST Array 1.0 基因表达芯片平台 GPL6244 检测获得。基因芯片数据来自于非洲东南部内陆国家马拉维的布兰太尔市的队列人群中,由轻症疟疾进展为重症疟疾的 5 例(<45 月龄)脑型疟疾儿童患者外周血单核细胞的 RNA 标本,患儿均依据 WHO 的诊断标准明确诊断。GSE33811 数据集共包含了 32 321 个基因的表达数据。5 例患儿分别在轻症和重

症时各采集一次血样,提取 RNA 标本进行检测。5 例患儿的基本情况如下:年龄:8 月龄 2 例(40.00%),23 月龄、42 月龄、45 月龄各 1 例(各 20.00%);性别:男性 3 例(60.00%),女性 2 例(40.00%)。

1.2 数据分析

1.2.1 基因表达谱系分析:将数据集 GSE33811 导入到 Qlucore Omics Explorer 3.1(QOE),对原始数据进行(均数=0,标准差=1)标准化处理;通过($P<0.01$, $q<0.01$)过滤后行两独立样本 t 检验,筛选出轻症患儿与重症患儿的差异表达基因,然后行主成分分析及分层聚类分析。

1.2.2 差异表达基因的蛋白-蛋白相互作用图谱分析:见表 1。将差异最明显(>1.5 Fold Change)的 15 个基因相应的蛋白名称上传至 STRING 9.05 蛋白-蛋白相互作用在线分析软件。调节可信度和附加节点参数,绘制不同病情差异表达基因的蛋白-蛋白相互作用图谱,找出关键基因。

表 1			两组差异表达的前 15 个基因名称		
序号	轻症患者表达上调的基因(≥ 2 倍)	缩写	序号	重症患者表达上调的基因(≥ 1.5 倍)	缩写
1	干扰素诱导蛋白 1	IFIT1	1	碳酸酐酶 1	CA1
2	干扰素诱导蛋白 2	IFIT2	2	G 蛋白偶联受体 89B	GPR89B
3	干扰素诱导蛋白 3	IFIT3	3	脂质运载蛋白-2	LCN2
4	黏液病毒基因 1	MX1	4	胸苷激酶 1	TK1
5	2',5'-寡腺苷酸合成酶 1	OAS1	5	核仁小 RNA C/D30	SNORD30
6	2',5'-寡腺苷酸合成酶 2	OAS2	6	TBC1 域家族成员 3	TBC1D3
7	2',5'-寡腺苷酸合成酶 3	OAS3			
8	溶酶体蛋白酶 W	CTSW			
9	穿孔素基因 1	PRF1			

1.2.3 差异表达基因的 GO 功能富集和文献挖掘:将差异最明显的 15 个基因列表上传至人类基因功能和网络分析软件 GenCliP 2.0,根据需要调节各类分析的主要参数,分析两组患者差异表达基因的 GO 功能富集状况,并检索“疟疾(Malaria)”进行文献挖掘。

1.2.4 差异表达基因的信号通路分析:将差异最明显的 15 个基因 ID 号上传至 PANTHER8 在线分类系统,通过调节数据类型及分析类型参数,获得 15 个指定基因的信号通路分析结果。

2 结果

2.1 数据稳定性评估 5 例患儿不同症状时 32 321 个基因表达在不同症状的疟疾患儿基因表达谱总体相似,将 5 例受试者的基因表达谱导入 QOE 软件行相关性分析,结果表明 5 例患儿的基因表达谱具有高度的关联性($r>0.864$),提示本研究采用数据集稳定合格,可确保后续分析结果的可

靠性。

2.2 轻症和重症患儿基因表达模式比较 QOE 软件对原始数据进行标准正态化处理后采用两独立样本的 t 检验进行分析,共发现 623 个(1.93%)差异表达基因(≥ 1 Fold Change, $P<0.05$, $q<0.05$),差异表达基因的聚类热图显示:623 个差异表达基因可良好区别轻、重症患儿。轻、重症患儿差异表达基因表达主成分分析可见,两类患儿差异基因表达模式具有良好的区分度,X 轴、Y 轴和 Z 轴的数据方差分别为 10%、7%和 30%。上述结果提示:在轻症疟疾患儿进展为重症的过程中,至少 623 个基因表达发生了改变。

2.3 差异表达基因的蛋白-蛋白相互作用网络分析 选择差异最明显的 15 个基因(轻症患者表达上调基因 9 个,重症患者表达上调的基因 6 个)相对应的蛋白名称导入 STRING 9.05 软件分析蛋白-蛋白相互作用网络(PPI)。拓扑网络中包含 1

个最典型的子网络,主要与调节含先天性在内的免疫应答、防御反应、刺激反应等生理学功能有关。OAS2,OAS3,IFIT3 和 USP18 等与网络中的其他 ≥ 10 个蛋白存在相互作用关系,删除上述节点后网络结构涣散,可以认为 OAS2,OAS3,IFIT3 和 USP18 是子网络的核心节点。

2.4 差异表达基因涉及的 GO 生物学功能富集分析 采用 GenClip 在线软件分析两类患儿前 15 个差异表达基因的 GO 功能富集状况。轻症患儿表达上调的 9 个基因(100.00%)(CTSW,IFIT2,IFIT1,IFIT3,MX,OAS1,OAS2,OAS3,PRF1)均参与机体免疫防御及免疫应答;8 个基因(88.89%)(IFIT2,IFIT1,IFIT3,MX,OAS1,OAS2,OAS3,PRF1)参与机体防御病毒的免疫应答、对外部刺激应答等;7 个基因(77.78%)(IFIT2,IFIT1,IFIT3,MX,OAS1,OAS2,OAS3)参与机体干扰素-1 型通

路激活、先天性免疫应答、细胞表面受体通路激活等生物学过程;部分基因还与 RNA 的合成、负性干扰病毒的生命周期等有关。

2.5 差异表达基因参与的蛋白分类分析 Panther 分类系统的蛋白分类结果:轻症患儿明显上调的差异基因共涉及 10 类蛋白,其中基因数 > 2 的蛋白类别包括防御/免疫蛋白、水解酶、核酸结合酶、转移酶。重症患儿明显上调的差异基因共涉及 5 类蛋白,包括异构酶、激酶、裂解酶、转移/载体蛋白、转移酶。

2.5 差异表达基因参与的信号通路分析 除上述 GO 生物学功能涉及的信号通路外,不同症状疟疾患儿差异表达还涉及到 8 条信号通路,但每条通路仅与 1 个基因有关,基因及通路名称、所占百分比及 ID 号见表 2,表 3。

表 2 轻症患儿上调基因参与的信号转导通路分析

序号	信号通路	基因数量	基因简称	百分比(%)	Accession ID
1	异 G 蛋白信号通路-Gi α 和 Gs α 介导的通路	1	MX1	11.11	P00026
2	异 G 蛋白信号通路-Gq α 和 Go α 介导的通路	1	MX1	11.11	P00027
3	代谢型谷氨酸受体组 III 通路	1	MX1	11.11	P00039
4	T 细胞活化通路	1	OAS1	11.11	P00039

表 3 重症患儿上调基因参与的信号转导通路分析

序号	信号通路	基因数量	基因简称	百分比(%)	Accession ID
1	嘌呤生物合成通路	1	LCN2	16.67	P02738
2	嘧啶生物合成的脱氧核糖核苷酸通路	1	LCN2	16.67	P02739
3	嘧啶生物合成的核糖核苷酸通路	1	LCN2	16.67	P02740
4	补救嘧啶脱氧核糖核苷酸通路	1	TK1	16.67	P02774

3 讨论 疟疾是一种古老的传染病,对人类的健康和生命产生的威胁历史久远^[6~8],随着医学的进步,人们逐渐认识到疟疾的真正传染源是疟原虫,而疟原虫引起的疟疾通常属于恶性^[9~12]。近年来,随着灭蚊虫、积极治疗患者、积极预防等综合防治措施的实施,我国疟疾发病率不断降低。但在全球范围内,疟疾仍是威胁人类特别是儿童生命健康的重要传染病之一^[13]。据流行病学研究显示:全球受疟疾威胁的人数在 300 万人以上;其中,每年大约有 100 万例患者死于由疟原虫引起的恶性疟疾,然而疟疾的具体发病机制仍不清楚,但以往研究显示机体免疫状况在疟疾发生和发展过程中发挥着重要作用^[12,13]。从预防医学角度而言,积极了解疟疾患者机体的免疫系统如何应对疟疾发病,对制定疟疾的计划免疫策略和治疗方案均具有重要意义^[14~17]。

本研究采用生物信息学分析对 NCBI 基因芯片公共数据库 GEO 收录的一组 < 45 月龄的疟疾

患儿的外周血表达的基因芯片数据资料进行深入挖掘和分析,分析机体的免疫状况在疟疾进展中的作用。结果显示 623 个在不同症状的患儿间差异表达的基因,15 个基因差异在 ≥ 1.5 Fold Change,其中 9 个基因在轻症时呈现高表达,6 个基因在重症时高表达,提示:儿童轻症疟疾患儿在进展为恶性的过程中,基因表达谱发生一定改变,即:疟疾病情进展在一定程度上受基因组的调控。15 个差异表达最明显的基因编码蛋白的交互作用网络显示:15 个蛋白拓补网络中包含 1 个最典型的子网络,主要与调节含先天性在内的免疫应答、防御反应、刺激反应等生理学功能有关,表明:机体免疫调控基因在疟疾病情进展中发挥着关键作用。在轻症时呈高表达的 9 个基因主要参与机体的免疫防御、免疫应答、对外部刺激应答、干扰素-1 型通路激活等,而重症患儿表达上调的 6 个基因未表现出特定的生理学功能。文献挖掘的结果与上述结果一致。蛋白分类结果、通路分析结果也与上述结果基本相

似。根据上述分析结果,我们可以认为:当患儿机体免疫屏障相对完善时,疟疾病情进展缓慢,反之亦然。

目前,关于疟疾对儿童的威胁大于成人的机制尚不十分清楚,科学家推测主要与儿童与成人之间的自体免疫的应答效果有关。成人的免疫系统更完善,从而产生更佳的自体免疫,可更好抵御疟原虫病毒入侵^[18]。本研究的分析结果也很好的印证了上述推测:当与机体免疫功能相关的基因表达下降的时候,机体的干扰素-1型通路等与免疫相关的通路得到激活,免疫应答效应降低,免疫防御能力下降,为疟疾患儿的病情加重提供了条件^[19]。因此,从公共卫生学的角度而言,积极接种疟疾疫苗,改善儿童免疫状况,完善免疫屏障,仍是防控疟疾的有效措施。

综上所述,疟疾患儿的病情进展受到免疫防御相关基因的调控作用,当此类基因表达下降时,患儿机体的免疫水平下降,为病情恶化提供了条件。因此,对儿童积极接种疟疾疫苗,增强儿童免疫水平,完善免疫屏障,仍是预防和控制疟疾的重要措施。

参考文献:

- [1] Ren N, Kuang YM, Tang QL, et al. High incidence of malaria along the sino-burmese border is associated with polymorphisms of CR1, IL-1A, IL-4R, IL-4, NOS, and TNF, but not with G6PD deficiency[J]. Medicine, 2015, 94(40):e1681.
- [2] Talha AA, Pirahmadi S, Mehri AA, et al. Molecular genetic analysis of *Plasmodium vivax* isolates from Eastern and Central Sudan using pvcsp and pvmsp-3alpha genes as molecular markers[J]. Infect Genet Evol, 2015(32):12-22.
- [3] Yuda M, Iwanaga S, Kaneko I, et al. Global transcriptional repression: An initial and essential step for *Plasmodium sexual* development[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2015, 112(41):12824-12829.
- [4] Hawkes M, Conroy AL, Opoka RO, et al. Slow clearance of plasmodium falciparum in severe pediatric malaria, Uganda, 2011 ~ 2013 [J]. Emerg Infect Dis, 2015, 21(7):1237-1239.
- [5] Kiari WC, Wangai L, Agola E, et al. Chloroquine sensitivity: diminished prevalence of chloroquine-resistant gene marker *pfprt-76* 13 years after cessation of chloroquine use in Msambweni, Kenya[J]. Malar J, 2015(14):328.
- [6] Gaillard T, Wurtz N, Houze S, et al. Absence of association between *Plasmodium falciparum* small subunit ribosomal RNA gene mutations and in vitro decreased susceptibility to doxycycline [J]. Malar J, 2015, 14:348.
- [7] Norris LC, Norris DE. Phylogeny of anopheline (Diptera: Culicidae) species in southern Africa, based on nuclear and mitochondrial genes[J]. J Vector Ecol, 2015, 40(1):16-27.
- [8] Robbiani DF, Deroubaix S, Feldhahn N, et al. Plasmodium infection promotes genomic instability and AID-dependent B cell lymphoma[J]. Cell, 2015, 162(4):727-737.
- [9] Chahar P, Kaushik M, Gill SS, et al. Genome-wide collation of the plasmodium falciparum WDR protein superfamily reveals malarial parasite-specific features [J]. PLoS One, 2015, 10(6):e128507.
- [10] Fairhurst RM. Understanding artemisinin-resistant malaria: what a difference a year makes [J]. Curr Opin Infect Dis, 2015, 28(5):417-425.
- [11] Koepfli C, Robinson LJ, Rarau P, et al. Blood-stage parasitaemia and age determine *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* gametocytaemia in Papua New Guinea[J]. PLoS One, 2015, 10(5):e126747.
- [12] Ukaegbu UE, Zhang X, Heinberg AR, et al. A unique virulence gene occupies a principal position in immune evasion by the malaria parasite plasmodium falciparum[J]. PLoS Genet, 2015, 11(5):e1005234.
- [13] Koepfli C, Rodrigues PT, Antao T, et al. *Plasmodium vivax* diversity and population structure across four continents [J]. PLoS Negl Trop Dis, 2015, 9(6):e0003872.
- [14] Lin JW, Spaccapelo R, Schwarzer E, et al. Replication of plasmodium in reticulocytes can occur without hemozoin formation, resulting in chloroquine resistance[J]. J Exp Med, 2015, 212(6):893-903.
- [15] Garcia-Longoria L, Hellgren O, Bensch S, et al. Detecting transmission areas of malaria parasites in a migratory bird species [J]. Parasitology, 2015, 142(9):1215-1220.
- [16] 李慧霞. 疟疾患者血液中 PLT, Hb, RBC 和 ALT 检测结果变化及临床意义 [J]. 国际检验医学杂志, 2016, 37(2):256-257.
- [16] Li HX. Changes of PLT, Hb, RBC and ALT in blood of malaria patients and its clinical significance [J]. International Journal of Laboratory Medicine, 2016, 37(2):256-257.
- [17] Baldeviano GC, Okoth SA, Arrospide N, et al. Molecular epidemiology of *plasmodium falciparum* malaria outbreak, tumbes, peru, 2010 ~ 2012 [J]. Emerg Infect Dis, 2015, 21(5):797-803.
- [18] Mohammed H, Mindaye T, Belayneh M, et al. Genetic diversity of *Plasmodium falciparum* isolates based on MSP-1 and MSP-2 genes from Kolla-Shele area, Arbaminch Zuria District, southwest Ethiopia [J]. Malar J, 2015, 14(1):73.
- [19] 罗慧琴, 李玲, 刘付芹, 等. 疟疾患者体内疟原虫滴度与体温及预后之间的相关性研究 [J]. 国际检验医学杂志, 2017, 38(4):478-479, 482.
- [19] Luo HQ, Li L, Liu FQ, et al. Study on correlation between *plasmodium* titre with body temperature and prognosis in malaria patients [J]. Int J Lab Med, 2017, 38(4):478-479, 482.

收稿日期:2017-02-08

修回日期:2017-04-09