

基于 GEO 数据库生物信息学筛选动脉粥样硬化铁死亡关键基因和实验验证

魏 星^{1a}, 陈芊颖², 龚厚文^{1b}, 许锋成^{1b}, 韩立明^{1c}, 葛 斌^{1a}, 龚大彩^{1a} (1. 成都医学院第三附属医院 / 成都市郫都区人民医院 a. 检验科; b. 心内科; c. 超声科, 成都 611730; 2. 成都医学院检验学院, 成都 610500)

摘要: **目的** 利用生物信息学方法, 筛选动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 铁死亡关键基因, 并分析关键基因的生物学功能, 以便深入了解 AS 发病机制。 **方法** 从 GEO (gene expression omnibus) 数据库下载 AS 基因表达谱芯片数据集 GSE100927, 以 $P < 0.05$, $|\log FC| > 1$ 为条件筛选 AS 的差异基因, 并与铁死亡数据集 Ferroptosis 基因取交集, 筛选出 AS 铁死亡相关基因, 并进行基因本体 (GO) 功能注释和京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 富集分析, 随后通过 STRING 在线分析工具联合 Cytoscape 可视化软件挖掘在 AS 生物学过程中发挥关键作用的基因, 并采用 AS 数据集 GSE9874 作为验证集, 验证关键基因的表达, 最后, 收集 2023 年 1 ~ 3 月所在医院心血管内科 30 例 AS 确诊患者血液样本作为实验组, 同时收集 20 例健康志愿者血液样本作为对照组, 提取样本 RNA, 采用实时荧光定量 PCR (quantitative real time polymerase chain reaction, qRT-PCR) 方法对筛选基因验证。 **结果** 采用生物信息学方法共筛选出 10 个 AS 铁死亡相关差异基因。GO 功能富集分析结果表明, 差异基因主要涉及炎症、细胞凋亡、氧化应激等生物学过程, KEGG 通路富集分析表明差异基因主要涉及铁死亡、HIF-1 信号通路、白细胞经内皮细胞迁移通路等。蛋白互作网络筛选出 7 个基因构建的关键模块, 分别是 FTL, SLC40A1, CYBB, NCF2, HMOX1, DPP4 和 ALOX5, 采用 GSE9874 进行验证, 最终筛选出 ALOX5, DPP4, FTL, SLC40A1, NCF2 等 5 个关键基因; qRT-PCR 对临床样本中关键基因表达检测显示, 相对于对照组, AS 组血液中表达上调的基因有 DPP4 ($t=1.795$, $P=0.046$), FTL ($t=2.218$, $P=0.029$), SLC40A1 ($t=2.859$, $P=0.009$); 表达下调的基因有 ALOX5 ($t=8.039$, $P<0.001$), NCF2 ($t=11.867$, $P<0.001$), 差异具有统计学意义; 实验结果与生物信息学分析结果一致。亚组分析发现斑块组 DPP4 表达高于内膜增厚组, 差异具有统计学意义 ($t=2.843$, $P=0.036$)。 **结论** 通过生物信息学筛选出 AS 铁死亡关键基因 ALOX5, DPP4, FTL, SLC40A1 和 NCF2, 可能成为 AS 诊断治疗的潜在靶点, 为 AS 的临床诊疗提供新的思路。

关键词: 生物信息学; 铁死亡; 动脉粥样硬化; 差异表达基因; 实时荧光定量 PCR

中图分类号: R543.5; R446 **文献标志码:** A **文章编号:** 1671-7414 (2024) 05-112-08

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2024.05.021

Screening Key Genes of Ferroptosis in Atherosclerosis Based on GEO Database Bioinformatics and Experimental Validation

WEI Xing^{1a}, CHEN Qianying², GONG Houwen^{1b}, XU Fengcheng^{1b}, HAN Liming^{1c}, GE Bin^{1a}, GONG Dacai^{1a}

(1a. Department of Clinical Laboratory; 1b. Department of Cardiology; 1c. Department of Ultrasound, the Third Affiliated Hospital of Chengdu Medical College / Chengdu Pidu District People's Hospital, Chengdu 611730, China; 2. College of Laboratory Medicine, Chengdu Medical College, Chengdu 610500, China)

Abstract: Objective To screen key genes for ferroptosis in atherosclerosis (AS) using bioinformatics methods and analyze the biological functions of key genes to gain an in-depth understanding of the pathogenesis of AS. **Methods** AS gene expression profile chip dataset GSE100927 was downloaded from the Gene Expression Omnibus (GEO) database. $P < 0.05$ and $|\log FC| > 1$ were used as the conditions to screen the differential genes of AS. These genes were intersected with ferroptosis gene dataset to screen out the genes related to AS ferroptosis. Gene ontology (GO) functional annotation and enrichment analysis of Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) were carried out. The STRING online analysis tool combined with Cytoscape visualization software was subsequently used to mine genes that play a key role in the biological process of AS, and the AS dataset GSE9874 was used as the verification set to verify the expression of key genes. Blood samples from 30 confirmed AS patients in the cardiovascular department of our hospital from January to March 2023 were collected as the experimental

基金项目: 成都市卫健委 2022 年课题 (立项编号: 2022504); 2021 年四川省医学会青年创新科研课题 (立项编号) Q21094; 成都医学院校级课题 (CZYB20-23)。

作者简介: 魏星 (1984-), 男, 硕士, 副主任技师, 主要研究方向: 生物信息学, E-mail: weixing3009@163.com。

通讯作者: 龚大彩 (1979-), 男, 大学本科, 主任技师, 主要研究方向: 临床检验诊断学, E-mail: 603632601@qq.com。

group, while blood samples from 20 healthy volunteers were collected as the control group. Sample RNA was extracted, and quantitative real time polymerase chain reaction (qRT-PCR) was used to verify the selected genes. **Results** A total of 10 differential genes related to ferroptosis were screened by bioinformatics method. GO functional enrichment analysis showed that differential genes were mainly involved in inflammation, apoptosis, oxidative stress and other biological processes, while KEGG pathway enrichment analysis showed that differential genes were mainly involved in ferroptosis, HIF-1 signaling pathway, and leukocyte migration pathway through endothelial cells. Seven key modules of gene construction were screened out through the protein interaction network, which were FTL, SLC40A1, CYBB, NCF2, HMOX1, DPP4 and ALOX5. GSE9874 was used for verification, and 5 key genes including ALOX5, DPP4, FTL, SLC40A1 and NCF2 were finally screened out. The expression detection of key genes in clinical samples by qRT-PCR showed that compared with the control group, the up-regulated genes in blood of AS group were DPP4 ($t=1.795$, $P=0.046$), FTL ($t=2.218$, $P=0.029$) and SLC40A1 ($t=2.859$, $P=0.009$), and the down-regulated genes were ALOX5 ($t=8.039$, $P<0.001$) and NCF2 ($t=11.867$, $P<0.001$), and the differences were significant. The experimental results were consistent with the results of bioinformatics analysis. Subgroup analysis showed that DPP4 expression in plaque group was higher than that in intima thickening group, and the difference was significant ($t=2.843$, $P=0.036$). **Conclusion** The key genes of ferroptosis screened by bioinformatics are AS, ALOX5, DPP4, FTL, SLC40A1 and NCF2, which may be potential targets for the diagnosis and treatment of AS, providing new ideas for the clinical diagnosis and treatment of AS. **Keywords:** bioinformatics; ferroptosis; atherosclerosis; differentially expressed genes; qRT-PCR

动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 是一种慢性炎症性疾病, 是冠心病、缺血性中风和外周动脉疾病在内的多种心脑血管疾病发生发展的关键病理机制, 但发病机制极其复杂, 其主要特征是低密度脂蛋白 (LDL) 颗粒在大中型动脉中积累, 不同类型的免疫细胞通过功能失调的内皮细胞迁移, 脂质斑块形成。随着炎症因子的释放, 动脉壁发生慢性炎症反应^[1-2], 斑块破裂、血栓形成和管腔狭窄阻碍血液流动, 导致一系列主要的不良心血管事件发生^[3]。

铁死亡^[4]是一种新发现细胞程序性死亡方式, 主要发病机制是细胞在氧化应激状态下, 铁代谢紊乱导致多种抗氧化系统异常, 导致脂质过氧化, 已被证实参与了包括 AS 在内的多种心脑血管疾病的发生发展^[5-6]。铁作为各种生命形式中必需的微量元素, 参与了许多生物过程, 包括能量代谢和核苷酸的合成和修复, 铁超载和铁死亡都可通过氧化损伤导致心脑血管疾病的发生, 但这一过程的确切机制尚不清楚^[7]。近年来, 随着测序技术和生物信息学的发展, 多种临床疾病如肝癌、多发性骨髓瘤、心血管疾病等^[8-10]相关的生物标志物被发现, 在临床疾病的预测和发病机制研究中起重要作用。本课题利用生物信息学方法, 通过微阵列高通量表达数据, 筛选 AS 铁死亡相关基因, 并进行功能富集分析和蛋白网络分析, 最后通过收集一定数量的临床样本, 采用实时荧光定量 PCR (quantitative real time polymerase chain reaction, qRT-PCR) 方法验证筛选基因, 为深入研究铁死亡基因作为 AS 诊断治疗分子标志物的潜在价值提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 研究对象 从 GEO (Gene Expression Omnibus)

数据库中下载 AS 研究数据集 GSE100927 的基因芯片数据, 该数据集包括 69 例 AS 患者和 35 例正常人群外周血样本。采用 GSE9874 作为验证集, 该数据集包括 30 例 AS 患者及 30 例无动脉粥样硬化人群外周血样本。铁死亡相关基因数据来源于 FerrDb 数据库 (<http://www.zhounan.org/ferrdb/legacy/operations/download.html>)^[11], 该数据库目前收录 259 个铁死亡相关基因。

实验验证选取 2023 年 1 ~ 3 月在心血管内科收治的 30 例 AS 患者作为研究对象, 设为实验组, 其中男性 18 例, 女性 12 例, 年龄 30 ~ 62 (44.93 ± 7.43) 岁, 内膜增厚 14 例, 斑块形成 16 例。纳入与排除标准: ①根据《血管超声检查指南》, 使用彩色多普勒超声诊断仪对研究对象进行颈动脉超声检查, 颈动脉内 - 中膜厚度 (CIMT) $>1.0\text{mm}$ 为内膜增厚, CIMT $>1.5\text{mm}$ 为斑块形成, 内膜增厚或斑块形成均为 AS, 纳入研究; ②排除手术、药物、免疫治疗等就诊者; ③排除糖尿病、高血压及肿瘤患者; ④排除遗传性疾病家族史。同时选择 20 例健康志愿者作为对照组, 其中男性 10 例, 女性 10 例, 年龄 28 ~ 55 (37.47 ± 6.72) 岁。两组研究对象的性别组成一致, 年龄差异无统计学意义 ($t=0.13$, $P>0.05$)。

1.2 仪器与试剂 本研究中相关基因 PCR 定量检测采用美国 ThermoFisher 公司的实时荧光定量 PCR 仪, 试剂包括生工生物工程 (上海) 生产的 RNA 提取试剂盒 Spin Column Blood Total RNA Purification Kit, 宝日医生物技术有限公司生产的 RNA 转录试剂盒 PrimeScript RT reagent Kit 及荧光定量 PCR 试剂盒 TB GreenTM Premix Ex TaqTM II (Tli RNaseH Plus)。

1.3 方法

1.3.1 差异基因表达的筛选及 GO 和 KEGG 富集分析: 利用 limma 包对数据集 GSE100927 进行数据分析, 选择出 $|\log_2 FC| > 1$ 且 P 值 < 0.05 的基因作为候选差异表达基因, 差异基因用火山图表示; 使用 Rstne 包进行主成分 (principal component analysis, PCA) 分析, umap 包进行流形数据降维分析, 通过 ggplot2 包进行可视化分析, 结果用热图表示。将其与上述铁死亡相关基因取交集, 使用 ggplot2 包生成 AS 铁死亡基因的 Venn 图。并对筛选的基因进行基因本体 (gene ontology, GO) 和京都基因与基因组百科全书 (kyotoencyclopedia of gene and genomes, KEGG) 富集分析。

1.3.2 蛋白质互作网络分析及关键基因筛选: 利用在线数据库 STRING 对蛋白质间的互作进行研究分析, 构建 AS 相关铁死亡基因的蛋白质相互作用网络。利用 Cytoscape3.9.1 软件 (<http://www.cytoscape.org>) 中的 MCODE 插件对差异基因构建网络调控模块。

1.3.3 GSE9874 验证筛选的关键基因: 从 GEO 数据库中下载 GSE9874 基因表达文件及样本信息文件, 提取筛选基因的表达数据, 采用 Graphpad

prism9.0 软件统计 AS 组与对照组筛选基因的表达差异并绘图。

1.3.4 qRT-PCR 实验验证候选基因: 采集实验组和对照组静脉全血 2ml, 冻存于 -80°C 冰箱, 用于筛选基因的临床验证。本课题的立项及具体实施已得到我院伦理委员会的审核和批准 (伦理批号: 202211), 所有患者均同意参加这项研究。将收集的 30 例 AS 患者和 20 例健康志愿者的静脉外周血样本取出, 使用 Spin Column Blood Total RNA Purification Kit 从全血中提取总 RNA, 去除 RNA 中的基因组 DNA, 并使用 PrimeScript RT reagent Kit 进行逆转录和 TB Green TM Premix Ex TaqTM II 进行扩增, 检测差异表达基因的表达水平, 并以 GAPDH 作为内参基因。引物序列 (表 1) 由上海生工合成, 并以 ULTRAPAGE 纯化。PCR 反应体系 $20\ \mu\text{l}$, 反应条件: 预变性, $30\text{s } 95^{\circ}\text{C}$; 变性, $5\text{s } 95^{\circ}\text{C}$; 退火, $30\text{s } 55^{\circ}\text{C}$; 延伸, $30\text{s } 72^{\circ}\text{C}$; 合计 45 个循环。采用 Thermo Scientific PikoReal 软件 (Thermo 公司) 分析检测样本的 CT (Threshold cycle) 值。通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算各基因相对 mRNA 表达水平: $\Delta Ct = Ct_{\text{目的基因}} - Ct_{\text{内参}}$, $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{实验}} - \Delta Ct_{\text{对照}}$, mRNA 表达差别倍数以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示。

表 1

引物序列

引物名称	上游引物	下游引物
GAPDH	5'-TGACTTCAACAGCGACACCCA-3'	5'-CACCTGTGTGCTGTACCCAAA-3'
ALOX5	5'-GACCTATGCCTCCCTGTGCTTTC-3'	5'-CGTGAACGTCCTGATGGCTTCC-3'
DPP4	5'-AGTGGCGTGTCAAGTGTGGAATAG-3'	5'-GGTCAAGGTTGTCTTCTGGAGTTGG-3'
FTL	5'-TGGAGACTCACTTCCTAGATGA-3'	5'-TGAGCCTTTCAAGAGATACTC-3'
SLC40A1	5'-ACAATACGAAGGATTGACCACT-3'	5'-ATACCAAGTTCATCCCGAAAT-3'
NCF2	5'-CTGTTTCGACCAAATGAGAGAC-3'	5'-CAAACCCAGAGAACTGTCTTG-3'

1.4 统计学分析 采用 SPSS22.0 统计学软件进行分析, 计量资料采用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用 t 检验。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 AS 差异表达基因的筛选 从 GEO 数据库中下载 GSE100927 数据集, 其中包括 69 例 AS 患者和 35 例正常人群血液样本。AS 组 (Group2) 和正常对照组 (Group1) 主成分进行分析, PCA 图显示见图 1-A, 其中 PC1 和 PC2 的交集较少, 组内距离较近; UMAP 图显示见图 1-B, UMPA1 和 UMPA2 各组分组内组间距离较远, 两组分间无明显交集。说明分

图显示见图 1-D。

2.2 AS 铁死亡相关基因的筛选 通过对 FerrDb 数据库中提供的 259 个铁死亡相关基因和上述 540 个 AS 差异表达基因进行分析, 筛选出 10 个差异基因分别为 HMOX1, CAPG, ALOX5, DPP4, NCF2, HILPDA, ANGPTL7, CYBB, SLC40A1 和 FTL, 见图 2。其中, 基因表达上调的有 HMOX1, CAPG, DPP4, CYBB, SLC40A1 和 FTL, 基因表达下调的有 ALOX5, NCF2, HILPDA 和 ANGPTL7。

2.3 差异表达基因富集分析 为了探索 AS 铁死亡相关差异基因的潜在生物学功能, 通过在线软件进行 GO 富集分析和 KEGG 通路分析, 所得结果显示见图 3A, 3B。其中 GO 本体分析中分子功能 (molecular function, MF) 包括产生超氧化物的 NADPH 氧化酶活性、氧化还原酶活性、电子传递

活性等, 细胞组分 (cellular component, CC) 显示主要在次级溶酶体、内吞小泡、NADPH 氧化酶复合体和氧化还原酶复合体中, 生物过程 (biological process, BP) 主要是对细胞铁离子稳态、细胞对

铁离子的反应、细胞过渡金属离子稳态等。此外, KEGG 的通路分析主要是铁死亡、HIF-1 信号通路、白细胞经内皮细胞迁移等。

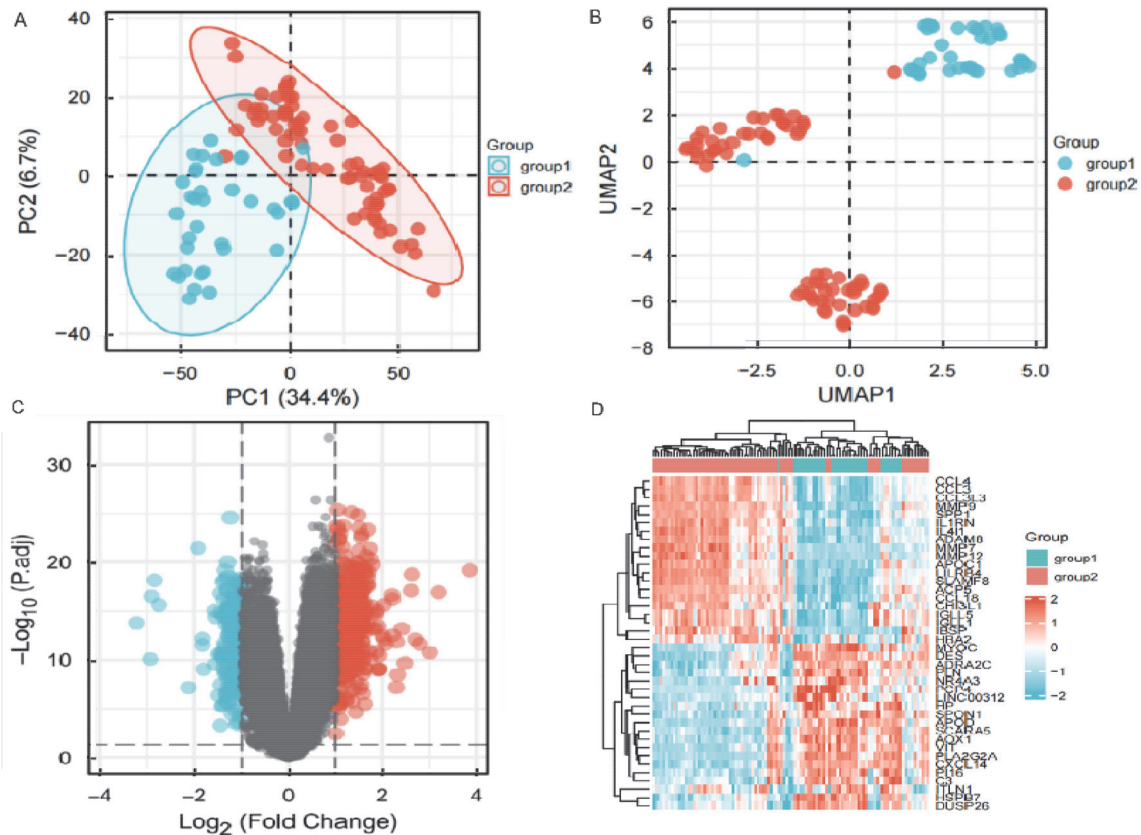


图1 GSE100927 中差异基因筛选 A 为 PCA 图, B 为 UMAP 图, C 为火山图, D 为热图。group1 为对照组, group2 为实验组

图1 GSE100927 中差异基因筛选

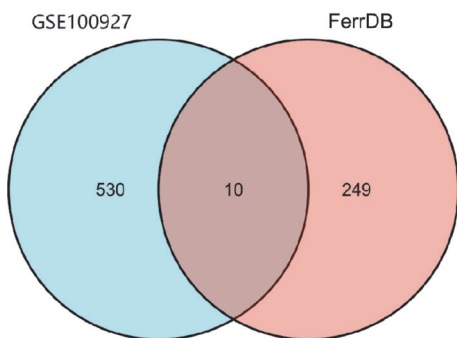


图2 AS 差异表达基因与铁死亡相关基因韦恩图

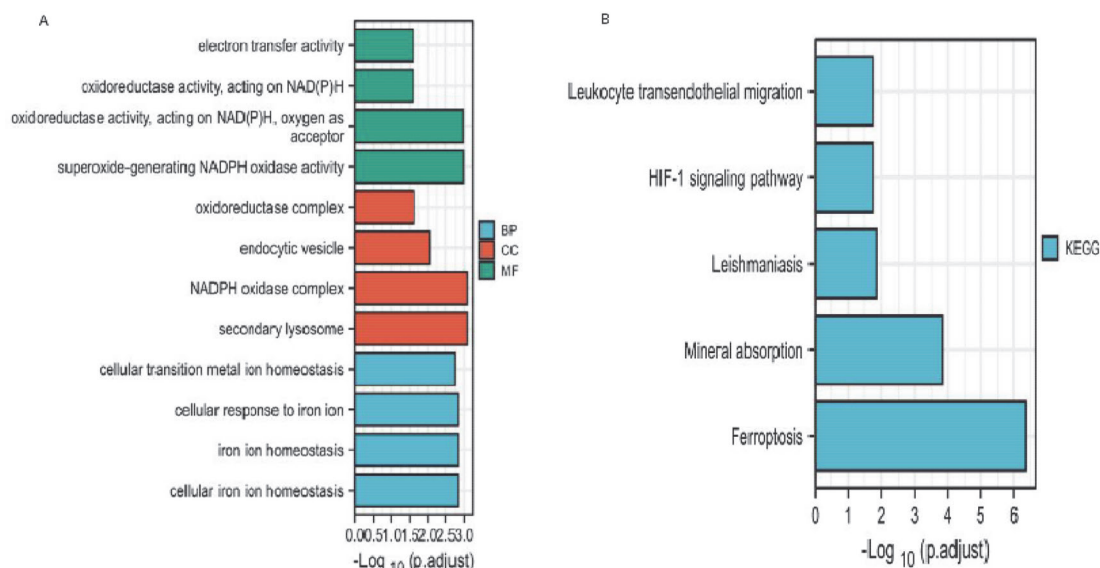
2.4 蛋白网络的构建及关键基因的确定 为了探索动脉粥样硬化铁死亡相关差异基因之间的相互作用, 使用 STRING 数据库进行蛋白相互作用网络分析。筛选出了连通性最高的 7 个基因, 分别为 FTL, SLC40A1, CYBB, NCF2, HMOX1, DPP4 和 ALOX5。网络的基因本体分析表明, 基因功能在细胞应激的反应、炎症反应、坏死凋亡、氧化应激上, 与 GO 富集及 KEGG 富集分析大体吻合。表明 AS 的发病机制中可能发生氧化应激、炎症反应及坏死凋亡等变化, 见图 4。

2.5 GSE9874 验证筛选的关键基因 选择 GEO 数据库中 AS 患者外周血的单核细胞来源的数据集 GSE9874 作为验证集, 该数据集包括 30 例 AS 患者及 30 例无动脉粥样硬化人群外周血样本转录组测序数据。结果显示上述 7 个基因中, FTL, SLC40A1 和 DPP4 在 AS 患者中表达上调, 与对照组相比差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), ALOX5 和 NCF2 在 AS 患者中表达下调, 与对照组相比差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), HMOX1 和 CYBB 基因表达在两组间无差异, 见图 5。

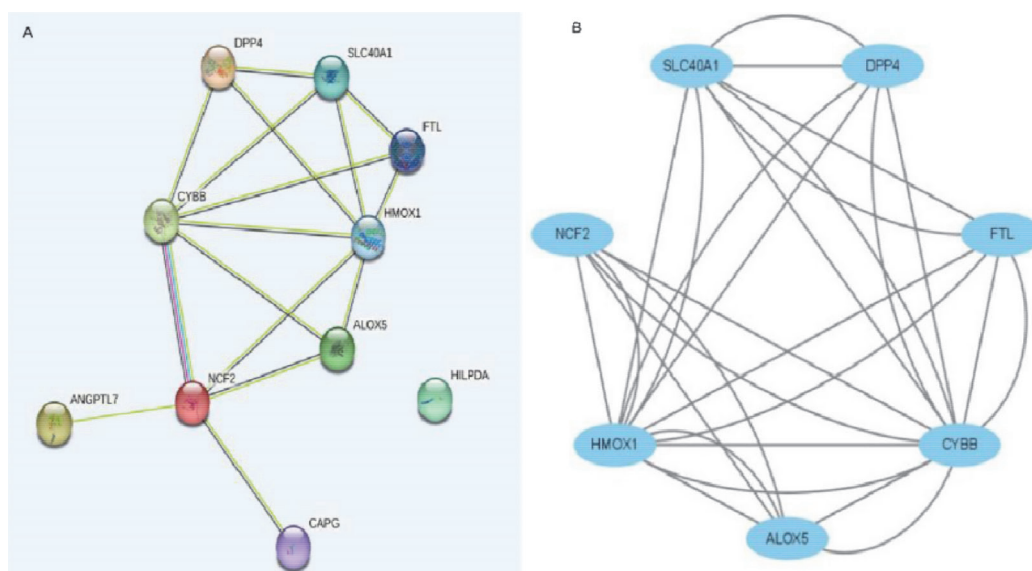
2.6 实验验证关键基因的表达情况 收集来的 30 例 AS 患者样本和 20 个健康志愿者全血样本提取 RNA, qRT-PCR 检测 ALOX5, DPP4, FTL, SLC40A1 和 NCF2 基因表达水平, 结果见表 2。可以看出实验组中上调基因有 DPP4, FTL 和 SLC40A1, 相对于对照组, 基因表达差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。实验组中 ALOX5 和 NCF2 相对于对照组基因表达下调, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。验证结果与生物信息学数据分析一致。将实验组按照颈动脉中膜厚度 (CMT) 分为内膜增厚组和斑块组, 进行亚组比较, 结果发

现斑块组中 DPP4 基因表达与内膜增厚组相比, 差异具有统计学意义 (均 $P < 0.05$); 两组间 ALOX5,

FTL, SLC40A1, NCF2 基因表达差异均无统计学意义 ($P > 0.05$), 见表 3。



A. GO 富集分析, B. KEGG 富集分析
图 3 AS 铁死亡相关基因富集分析



A. STRING 网络图, B. MCODE 模型

图 4 蛋白互作网络分析

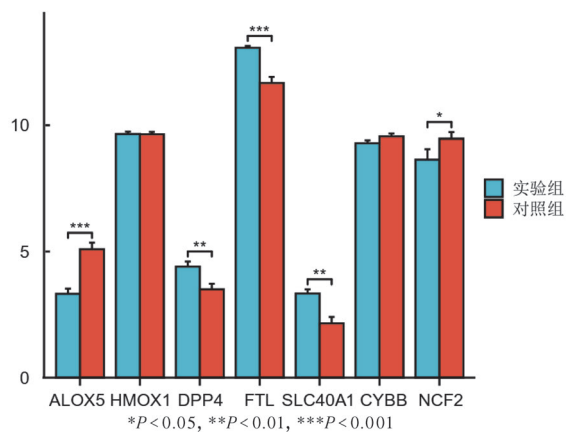


图 5 GSE9874 数据集中关键基因的表达

表 2 实验组与对照组各关键基因表达差异比较 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)

基因名称	实验组 (n=30)	对照组 (n=20)	t 值	P 值
ALOX5	0.343 ± 0.181	1.027 ± 0.244	8.039	<0.001
DPP4	1.623 ± 1.030	1.024 ± 0.238	1.795	0.046
FTL	2.074 ± 1.113	1.147 ± 0.868	2.218	0.029
SLC40A1	2.095 ± 1.102	1.053 ± 0.383	2.859	0.009
NCF2	0.248 ± 0.101	1.020 ± 0.222	11.867	<0.001

表3 斑块组与内膜增厚组各关键基因
表达差异比较 ($2^{-\Delta\Delta C_t}$)

基因名称	斑块组 (n=16)	内膜增厚组 (n=14)	t值	P值
ALOX5	0.413 ± 0.165	0.378 ± 0.146	1.432	>0.05
DPP4	1.835 ± 0.852	1.436 ± 0.469	2.843	0.036
FTL	2.152 ± 1.244	2.036 ± 0.645	0.854	>0.05
SLC40A1	1.984 ± 1.063	2.068 ± 1.285	1.152	>0.05
NCF2	0.288 ± 0.137	0.253 ± 0.089	0.976	>0.05

3 讨论

AS发病机制复杂,主要由低密度脂蛋白(LDL)在内皮下基质中的积累引起的,是一种以内皮损伤、炎症细胞浸润、细胞增殖和脂肪沉积为特征的进行性疾病^[6],其发生发展和斑块的破裂及血管细胞的损伤有关,包括内皮细胞、平滑肌细胞和巨噬细胞^[12]。铁死亡作为一种全新的细胞死亡方式,2012年由DIXON等^[13]提出并命名,其具有铁依赖性,以细胞内活性氧积累为特征,不同于细胞凋亡。研究发现^[14],铁死亡通过对磷脂的氧化损伤,加速脂质过氧化中的内皮功能障碍来促进AS。此外,细胞内铁的紊乱会引起巨噬细胞、血管平滑肌细胞、血管内皮细胞的损伤,并影响AS的许多危险因素或病理过程,如脂质过氧化、氧化应激、炎症和血脂异常等。此外,铁蛋白轻链在AS患者冠状动脉中浓度持续偏高,揭示了AS斑块中聚集过量的铁^[15]。另一项研究^[16]也验证了铁死亡参与AS的调节,BAI等^[16]以载脂蛋白E缺陷小鼠为研究对象,采用高脂饮食饲养,成功构建AS模型,发现加入铁抑制剂Fer-1后,Fe²⁺和脂质ROS指标在小鼠内皮细胞中的表达显著降低,细胞活力得到不同程度的逆转,内皮细胞铁死亡现象得到抑制,为铁死亡在AS发生发展中的机制研究提供实验证据。

本课题通过生物信息技术,从GEO数据库GSE100927数据集中69例AS患者和35例正常人群血液样本转录组测序数据中筛选出540个差异表达基因,与FerrDb数据库中提供的249个铁死亡相关基因取交集,筛选出HMOX1, CAPG, ALOX5, DPP4, NCF2, HILPDA, ANGPTL7, CYBB, SLC40A1和FTL等10个差异基因。GO富集分析发现这10个基因分子功能主要是产生超氧化物的NADPH氧化酶活性、氧化还原酶活性、电子传递活性等,细胞组分分析主要是次级溶酶体、内吞小泡、NADPH氧化酶复合物、氧化还原酶复合体等,生物过程主要是对细胞铁离子稳态、细胞对铁离子的反应、细胞过渡金属离子稳态等。此外,KEGG的通路分析主要是铁死亡通路、HIF-1

信号通路、白细胞经内皮细胞迁移等。蛋白互作网络分析,筛选出7个基因构建的关键模块,分别为FTL, SLC40A1, CYBB, NCF2, HMOX1, DPP4和ALOX5,验证集GSE9874验证显示,ALOX5, DPP4, FTL, SLC40A1和NCF2等5个基因表达与筛选结果一致,经收集临床样本,采用qRT-PCR检测AS患者中这5个关键基因表达情况,结果显示AS患者DPP4, FTL和SLC40A1相对于对照组基因表达上调,差异具有统计学意义($P<0.05$)。S组中ALOX5, NCF2相对于对照组基因表达下调,差异具有统计学意义($P<0.05$)。实验结果与生物信息学分析结果一致。亚组分析显示DPP4在斑块组中表达上调,与内膜增厚组相比较,差异具有统计学意义($P<0.05$)。这5个铁死亡关键基因在AS发病过程中可能起重要作用。

FTL即铁蛋白轻链,铁蛋白是原核生物和真核生物细胞内主要的铁储存蛋白,它由重铁蛋白链和轻铁蛋白链的24个亚基组成, UYY基因突变可导致血清铁蛋白浓度升高^[17]。ELENA等^[18]在研究非凋亡调节的细胞死亡(铁死亡和坏死)导致的损伤相关分子模式(damage-associated molecular patterns, DAMPs)过程中,发现高脂血症动物表现出大量异质性动脉粥样硬化病变,血清脂质浓度高,包括FTL在内的多种铁死亡相关蛋白显著上调且对降脂治疗无反应,FTL持续高表达促进AS病变的发生和AS斑块不稳定发展^[19]。SLC40A1是溶质载体家族的一员,其主要功能是编码膜铁转运蛋白(recombinant ferroportin, FPN),胞质中Fe²⁺可以被铁蛋白还原并以Fe³⁺的形式储存,并且Fe²⁺可以通过SLC40A1运出细胞,在铁的循环利用中发挥重要作用^[20],有研究表明SLC40A1存在一个新的杂合突变(p.Cys326Phe突变)^[21],与高铁血症和高转铁蛋白饱和度密切相关。DPP4(dipeptidyl peptidase-4)即T细胞表面抗原CD26,铁死亡过程中,DPP4-NOX结合是促进脂质过氧化作用的关键因子。在心血管疾病高危人群的血清样本中含有高水平DPP4调节的补体和凝血因子。重要的是,DPP4减轻了衰老细胞负担和提高了凝血功能,改善了斑块稳定性^[22]。此外,钟玉梅等^[23]研究证实,在2型糖尿病并发AS患者血清中DPP4水平高于健康人群,本课题对AS亚组分析发现,DPP4在斑块组中表达上调,相对于内膜增厚组,基因表达差异具有统计学意义($P<0.05$),说明DPP4在AS发生发展过程中起重要作用。P67-phox细胞质亚基的编码基因是NCF2,即嗜中性粒细胞胞浆因子2,作为吞噬细胞中还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(triphosphopyridine nucleotide, NADPH)组成成分

之一, NADPH 可催化细胞内的 O_2 还原成活性氧类物质 (reactive oxygen species, ROS) [24], 促进铁死亡的发生。另一方面, NADPH 能够促进一系列抗氧化产物的产生, 进而抑制铁死亡。研究证实 [25], 除吞噬细胞 NADPH 氧化酶外, 其他具有不同功能的 NADPH 氧化酶也在包括内皮细胞在内的多种非吞噬细胞中表达, 并与心血管和肾脏疾病有关。NCF2 / p67phox 作为 NADPH 氧化酶复合物的活化亚基, 通过 NADPH 氧化酶 / ROS 通路, 参与心血管疾病的发生发展。ALOX5 作为编码白三烯生物合成中的一个关键酶 (5-脂氧合酶), 可激活炎症反应并引发多种细胞死亡模式 [26]。CAMACHO-MEJORADO 等 [27] 人研究表明, ALOX5 等基因多态性及其多等位基因组合在有 AS 血栓形成临床表现的个体中出现的频率是健康组的 2 ~ 4 倍, 对人口分层进行了调整, 这些差异仍然存在。

综上所述, 本课题通过生物信息学筛选和临床样本验证, ALOX5, DPP4, FTL, SLC40A1 和 NCF2 这 5 个铁死亡基因可能是 AS 发生发展的关键基因, 可能成为 AS 诊断治疗的潜在靶点。本研究不足之处在于收集的临床样本数量较少, 且没进行细胞实验和动物实验验证分析结果, 下一步需要扩大临床样本数量, 并深入研究铁死亡在 AS 发病过程中的机制。

参考文献:

- [1] RANGARAJAN S, ORUJYAN D, RANGCHAIKUL P, et al. Critical role of inflammation and specialized pro-resolving mediators in the pathogenesis of atherosclerosis[J]. *Biomedicines*, 2022, 10(11): 2829.
- [2] FREDMAN G, SERHAN C N. Specialized pro-resolving mediators in vascular inflammation and atherosclerotic cardiovascular disease[J]. *Nature Reviews Cardiology*, 2024;DOI: 10.1038/s41569-023-00984-x.
- [3] 王雪琦, 赵嫄婷, 马春燕. 颈动脉及下肢动脉粥样硬化与冠心病相关性的研究进展 [J]. *实用临床医药杂志*, 2022, 26(3): 125-129.
WANG Xueqi, ZHAO Lanting, MA Chunyan. Research progress of correlation of carotid artery and lower limb atherosclerosis with coronary heart disease[J]. *Journal of Clinical Medicine in Practice*, 2022, 26(3): 125-129.
- [4] 王冯宇, 李亘, 林晓伊, 等. 铁死亡在肿瘤治疗作用中的研究进展 [J]. *基础医学与临床*, 2022, 42(11): 1781-1784.
WANG Fengyu, LI Gen, LIN Xiaoyi, et al. Research progress on the role of ferroptosis in the treatment of tumors[J]. *Basic & Clinical Medicine*, 2022, 42(11): 1781-1784.
- [5] YU Yi, YAN Yuan, NIU Fanglin, et al. Ferroptosis: a cell death connecting oxidative stress, inflammation and cardiovascular diseases[J]. *Cell Death Discovery*, 2021, 7(1): 193.
- [6] LIN Lin, ZHANG Muxin, ZHANG Lei, et al. Autophagy, pyroptosis, and ferroptosis: new regulatory mechanisms for atherosclerosis[J]. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2021, 9: 809955.
- [7] FANG Xuexian, ARDEHALI H, MIN Junxia, et al. The molecular and metabolic landscape of iron and ferroptosis in cardiovascular disease[J]. *Nature Reviews Cardiology*, 2023, 20(1): 7-23.
- [8] 吴良银, 李文丽, 刘俊. 基于 GEO 数据的病毒相关性肝癌潜在生物标志物的筛选及生物信息学分析 [J]. *现代检验医学杂志*, 2021, 36(6): 106-110.
WU Liangyin, LI Wenli, LIU Jun. Screening and bioinformatics analysis of potential biomarkers for virus-associated hepatocellular carcinoma based on GEO data[J]. *Journal of Modern Laboratory Medicine*, 2021, 36(6): 106-110.
- [9] 侯丽, 张丽, 唐婧, 等. 基于 GEO 对多发性骨髓瘤关键基因生物信息学分析及免疫浸润模式与验证 [J]. *现代检验医学杂志*, 2023, 38(5): 23-28.
HOU Li, ZHANG Li, TANG Jing, et al. Bioinformatics analysis and verify core genes and immune infiltration patterns in multiple myeloma based on GEO[J]. *Journal of Modern Laboratory Medicine*, 2023, 38(5): 23-28.
- [10] 侯芳霞, 刘琳, 张维, 等. 基于 GEO 数据库筛选稳定性心绞痛患者外周血关键差异基因及诊断模型构建 [J]. *现代检验医学杂志*, 2022, 37(6): 19-23, 69.
HOU Fangxia, LIU Lin, ZHANG Wei, et al. Identification of hub genes and differential expression genes for peripheral blood samples of stable angina pectoris based on GEO databases[J]. *Journal of Modern Laboratory Medicine*, 2022, 37(6): 19-23, 69.
- [11] 晏子钦, 魏明波, 程波. 基于铁死亡相关基因的口腔鳞状细胞癌的生物信息学分析 [J]. *临床口腔医学杂志*, 2022, 38(1): 19-22.
YAN Ziqin, WEI Mingbo, CHENG Bo. Bioinformatics analysis of oral squamous cell carcinoma based on the expression of ferroptosis-related genes[J]. *Journal of Clinical Stomatology*, 2022, 38(1): 19-22.
- [12] BÄCK M, YURDAGUL A J, TABAS I, et al. Inflammation and its resolution in atherosclerosis: mediators and therapeutic opportunities[J]. *Nature Reviews Cardiology*, 2019, 16(7): 389-406.
- [13] DIXON S J, LEMBERG K M, LAMPRECHT M R, et al. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death[J]. *Cell*, 2012, 149(5): 1060-1072.
- [14] OUYANG Siyu, YOU Jia, ZHI Chenxi, et al. Ferroptosis: the potential value target in atherosclerosis[J]. *Cell Death & Disease*, 2021, 12(8): 782.
- [15] XIAO Lin, LUO Gang, GUO Xiaoping, et al. Macrophage iron retention aggravates atherosclerosis: evidence for the role of autocrine formation of hepcidin in plaque macrophages[J]. *Biochimica Et Biophysica Acta Molecular and Cell Biology of Lipids*, 2020, 1865(2): 158531.
- [16] BAI Tao, LI Mingxing, LIU Yuanfeng, et al. Inhibition of ferroptosis alleviates atherosclerosis through attenuating lipid peroxidation and endothelial dysfunction in mouse aortic endothelial cell[J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2020, 160: 92-102.

- [17] YANG Yunfan, LIN Ting, KUANG Pu, et al. Ferritin L-subunit gene mutation and hereditary hyperferritinaemia cataract syndrome (HHCS): a case report and literature review[J]. Hematology, 2021, 26(1): 896-903.
- [18] UYY E, SUICA V I, BOTEANU R M, et al. Regulated cell death joins in atherosclerotic plaque silent progression[J]. Scientific Reports, 2022, 12(1): 2814.
- [19] WANG Yuqin, ZHAO Yajie, YE Ting, et al. Ferroptosis signaling and regulators in atherosclerosis[J]. Frontiers in Cell and Developmental Biology, 2021, 9: 809457.
- [20] RAJENDRAN P, AMMAR R B, AL-SAEEDI F J, et al. Kaempferol inhibits zearalenone-induced oxidative stress and apoptosis via the PI3K/Akt-mediated Nrf2 signaling pathway: in vitro and in vivo studies[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 22(1): 217.
- [21] CHEN S R, YANG L Q, CHONG Y T, et al. Novel gain of function mutation in the SLC40A1 gene associated with hereditary haemochromatosis type 4[J]. Internal Medicine Journal, 2015, 45(6): 672-676.
- [22] HERMAN A B, TSITSIPATIS D, ANERILLAS C, et al. DPP4 inhibition impairs senohemostasis to improve plaque stability in atherosclerotic mice[J]. Journal of Clinical Investigation, 2023, 133(12): e165933.
- [23] 钟玉梅, 钟雪玉, 周卫平, 等. 2型糖尿病颈动脉粥样硬化患者血清二肽基肽酶4和氧化低密度脂蛋白水平改变[J]. 中国糖尿病杂志, 2022, 30(2): 111-115. ZHONG Yumei, ZHONG Xueyu, ZHOU Weiping, et al. Changes of serum dipeptidyl peptidase-4 and oxidized low-density lipoprotein levels in type 2 diabetic patients with carotid atherosclerosis[J]. Chinese Journal of Diabetes, 2022, 30(2): 111-115.
- [24] 谢金波, 彭波. NCF2/p67phox在泛肿瘤中的表达调控及临床意义研究进展[J]. 同济大学学报(医学版), 2023, 44(6): 889-896. XIE Jinbo, PENG Bo. Expression and clinical significance of NCF2/p67phox in pan-tumor[J]. Journal of Tongji University (Medical Science), 2023, 44(6): 889-896.
- [25] TARAZONA-SANTOS E, MACHADO M, MAGALHÃES W C S, et al. Evolutionary dynamics of the human NADPH oxidase genes CYBB, CYBA, NCF2, and NCF4: functional implications[J]. Molecular Biology and Evolution, 2013, 30(9): 2157-2167.
- [26] 赵倩倩, 孙之, 潘月眉, 等. ALOX5可作为与免疫细胞浸润相关的非小细胞肺癌预后生物标志物[J]. 中南大学学报(医学版), 2023, 48(3): 311-322. ZHAO Qianqian, SUN Zhi, PAN Yuemei, et al. Role of ALOX5 in non-small cell lung cancer: a potential therapeutic target associated with immune cell infiltration[J]. Journal of Central South University(Medical Science), 2023, 48(3): 311-322.
- [27] CAMACHO-MEJORADO R, GÓMEZ R, TORRES-SÁNCHEZ L E, et al. ALOX5, LPA, MMP9 and TPO gene polymorphisms increase atherothrombosis susceptibility in middle-aged Mexicans[J]. Royal Society Open Science, 2020, 7(1): 190775.
- 收稿日期: 2023-12-20
修回日期: 2024-02-05

(上接第95页)

- [13] 段新飞, 宋利宏, 胡科, 等. 血管性痴呆大鼠氧化应激、炎症反应与SIRT1的相关性研究[J]. 精神医学杂志, 2020, 33(2): 122-125. DUAN Xinfei, SONG Lihong, HU Ke, et al. Correlation between oxidative stress, inflammatory response and SIRT1 in vascular dementia rats[J]. Journal of Psychiatry, 2020, 33(2): 122-125.
- [14] ZHANG Jianbin, ZHANG Qianren, JIN Qian, et al. Sestrin2 maintains hepatic immune homeostasis and redox balance partially via inhibiting RIPK3-mediated necroptosis in metabolic dysfunction-associated steatohepatitis[J]. Molecular Metabolism, 2024, 80: 101865.
- [15] CHE Xiaojing, CHAI Jiagui, FANG Yan, et al. Sestrin2 in hypoxia and hypoxia-related diseases[J]. Redox Report, 2021, 26(1): 111-116.
- [16] 王迪, 啜红斐. 血清Sestrin2水平与急性脑梗死患者氧化应激反应及早期神经功能恶化的关系[J]. 实用临床医药杂志, 2022, 26(6): 14-17, 22. WANG Di, CHUAI Hongfei. Correlations of serum Sestrin2 level with oxidative stress response and early deterioration of neurological function in patients with acute cerebral infarction[J]. Journal of Clinical Medicine in Practice, 2022, 26(6): 14-17, 22.
- [17] 雷晓鹏, 张泽平. 可溶性Fms样酪氨酸激酶-1预测急性颅脑损伤蛛网膜下腔出血后脑血管痉挛的研究[J]. 卒中与神经疾病, 2019, 26(4): 427-430, 434. LEI Xiaopeng, ZHANG Zeping. The study on the predictive effect of soluble Fms-like tyrosine kinase 1 on cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage in acute craniocerebral injury[J]. Stroke and Nervous Diseases, 2019, 26(4): 427-430, 434.
- [18] LIAO Li, ZHAO Xingtao, ZHOU Mengting, et al. sFlt-1: A double regulator in angiogenesis-related diseases[J]. Current Pharmaceutical Design, 2021, 27(40): 4160-4170.
- [19] DRAKER N, TORRY D S, TORRY R J. Placenta growth factor and sFlt-1 as biomarkers in ischemic heart disease and heart failure: a review[J]. Biomarkers in Medicine, 2019, 13(9): 785-799.
- [20] 吕霞, 周小燕, 焦黛妍. 血清sCAM-1, IGF-1和sFlt-1对自发性蛛网膜下腔出血后脑血管痉挛的病情与预后评估的价值[J]. 河北医药, 2022, 44(8): 1194-1197. LÜ Xia, ZHOU Xiaoyan, JIAO Daiyan. The predictive and evaluation value of serum SCAM-1, IGF-1 and sFLT-1 levels in cerebral vasospasm after spontaneous subarachnoid hemorrhage[J]. Hebei Medical Journal, 2022, 44(8): 1194-1197.
- 收稿日期: 2024-01-04
修回日期: 2024-02-29