

本文引用：林梅英，甘东辉，高颖，等. 原发性抗磷脂综合征患者中性粒细胞关键基因的生物信息学分析[J]. 医学研究与教育，2022，39(1)：8-14. DOI：10.3969/j.issn.1674-490X.2022.01.002.

· 基础医学 ·

原发性抗磷脂综合征患者中性粒细胞关键基因的生物信息学分析

林梅英，甘东辉，高颖，王正杰，陈志敏

(莆田学院附属医院，福建 莆田 351100)

摘要：**目的** 通过生物信息学方法筛选原发性抗磷脂综合征（antiphospholipid syndrome, APS）患者中性粒细胞中的关键差异基因，并鉴定其参与的生物功能和信号通路。**方法** 在 GEO 数据库中下载 APS 患者中性粒细胞的 RNA 测序数据，使用 R 语言中的 limma 包筛选差异表达基因，通过 clusterProfiler 包分别对上调和下调基因进行基因本体论（gene ontology, GO）和京都基因与基因组百科全书（Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG）富集分析。最后，通过 STRING 数据库构建蛋白-蛋白互作网络，使用 Cytoscape 软件计算网络中的核心基因。**结果** 共筛选得到 512 个上调基因，473 个下调基因，上调基因主要参与的功能和通路包括固有免疫反应调节、中性粒细胞激活、炎症复合体形成等，下调基因主要参与的功能和通路包括 T 细胞激活、淋巴细胞分化、淋巴细胞激活等。*IFIT1*、*IFI35*、*IFI3*、*CCL2*、*TLR8*、*FCGR1A* 是核心的上调基因。*MYC*、*CD8A*、*FYN*、*CD28*、*LCK*、*GNB2L1* 是核心的下调基因。**结论** 通过生物信息学方法分析出的核心基因可能是 APS 患者中性粒细胞发挥免疫效应的关键靶点。

关键词：抗磷脂综合征；中性粒细胞；hub 基因；免疫效应

DOI: 10.3969/j.issn.1674-490X.2022.01.002

中图分类号：R446 文献标志码：A 文章编号：1674-490X(2022)01-0008-07

Identification and bioinformatics analysis of key neutrophil genes in patients with primary antiphospholipid syndrome

LIN Meiyong, GAN Donghui, GAO Ying, WANG Zhengjie, CHEN Zhimin

(Affiliated Hospital of Putian College, Putian 351100, China)

Abstract : Objective To screen key differential genes and identify the biological functions and signaling pathways involved in neutrophils from patients with primary antiphospholipid syndrome (APS) by bioinformatic methods. **Methods** RNA sequencing data of neutrophils from APS patients were downloaded from the GEO database, differentially expressed genes were screened by using the limma package in R language, and up- and down-regulated genes were subjected to gene ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) enrichment analysis by clusterProfiler, respectively. Finally, protein-protein interaction network was constructed by STRING database and core genes in the network were calculated using cytoscape software. **Results** A total of 512 up-regulated genes and 473 down-regulated genes were obtained by limma package screening. Up-regulated genes

收稿日期：2021-12-10

基金项目：莆田学院校内科科研项目（2019040，2019044）

第一作者：林梅英（1986—），女，福建莆田人，主管护师，主要从事血液风湿内分泌系统疾病护理与基础研究。

E-mail: linmeiyong999@163.com

通信作者：陈志敏（1994—），男，福建莆田人，医师，在读博士，主要从事生物信息学与内科系统疾病研究。

E-mail: chenzm0905@163.com

were mainly involved in functions and pathways including regulation of innate immune response, neutrophil activation, inflammatory complex formation, etc. down-regulated genes were mainly involved in functions and pathways including T cell activation, lymphocyte differentiation, lymphocyte activation, etc. *IFIT1*, *IFI35*, *IFI3*, *CCL2*, *TLR8*, *FCGR1A* were the core genes among the up-regulated genes. *MYC*, *CD8A*, *FYN*, *CD28*, *LCK*, *GNB2L1* were the core genes among the down-regulated genes. **Conclusion** The core genes identified by bioinformatic methods may be the key targets for the immune effects of neutrophils in patients with primary antiphospholipid syndrome.

Key words: antiphospholipid syndrome; neutrophils; hub gene; immune effect

原发性抗磷脂综合征（antiphospholipid syndrome, APS）是一种全身性自身免疫性疾病，特点是持续性的抗磷脂抗体阳性^[1]。常见的临床表现为广泛的静脉、动脉或微血管血栓形成，非血栓性表现则包括瓣膜心脏病、肝纤维化、抗磷脂抗体相关肾病、血小板减少、溶血性贫血和认知功能障碍^[2]。中性粒细胞已被证明在诱导血栓形成中起作用，研究^[3]表明，在自身免疫性疾病中，中性粒细胞胞外诱捕网（neutrophil extracellular traps, NETs）会导致静脉和动脉血栓栓塞，NETs 是由 DNA、组蛋白和杀微生物蛋白组成的网络，由激活的中性粒细胞通过一种名为 NETosis 的程序释放出来。在 APS 中，抗磷脂抗体与中性粒细胞表面接触，绕过正常的稳态机制，导致中性粒细胞异常免疫效应发生^[4]。目前尚不清楚 APS 发生过程中中性粒细胞免疫异常具体的调控机制。随着人类基因组计划的完成，现阶段医学和生物学研究已经进入了后基因组时代，测序技术和微阵列技术可以在基因水平对疾病获得更深刻的认识，通过生物信息学手段，挖掘大数据，研究疾病发生发展过程中的分子机制已经被广泛应用于多种疾病^[5]。现拟通过生物信息学方法识别 APS 发病过程中中性粒细胞的差异表达基因（differentially expressed genes, DEGs），从基因层面为 APS 的机制研究提供新思路。

1 材料和方法

1.1 数据下载

在 NCBI 的综合基因集数据库 GEO (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) 上以“antiphospholipid syndrome”“neutrophil”为关键词进行检索，下载 GSE102215^[6]数据集 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE102215>)，该数据集基于 GPL16791 平台 [Illumina HiSeq 2500 (Homo sapiens)]，包含了 9 例 APS 患者的中性粒细胞 RNA 测序数据，9 例健康人类中性粒细胞 RNA 测序数据。

1.2 DEGs 筛选

使用 R 语言的 limma 包对表达矩阵进行差异分析，设置筛选标准为 $|\log_2 FC| > 1$ (FC 为差异倍数)，矫正后 P 值 (P_{adj}) < 0.05 ，获得 APS 患者中性粒细胞中的 DEGs。使用 ggplot2 包绘制差异基因火山图，并标记出上下调基因中差异倍数前 5 位的基因。

1.3 基因功能和通路富集分析

提取 DEGs 中上调 ($\log_2 FC > 0$) 和下调 ($\log_2 FC < 0$) 的基因，使用 R 语言的 clusterProfiler 包分别对两群基因进行基因本体论 (gene ontology, GO) 和京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 富集分析。使用 ggplot2 包对结果进行可视化。

1.4 上调和下调 DEGs 的蛋白-蛋白互作网络构建和 hub 基因筛选

分别将上调和下调的 DEGs 输入 STRING 数据库 (<https://www.string-db.org/>)，构建蛋白-蛋白互作网络 (protrin-protein interaction, PPI)，设置交互置信度为 0.4，将所得网络导入 Cytoscape 3.8 软件，使用 cytohubba 插件计算 PPI 网络中每个节点的度值权重分数，对度值前 30 位的节点进行可视化，将网络中度值前 5 位的基因鉴定为 hub 基因。

2 结果

2.1 APS 中性粒细胞 DEGs 筛选

以 $|\log_2FC| > 1$ ， $P_{adj} < 0.05$ 为标准，在 GSE102215 数据集共筛选得到 985 个 DEGs，其中上调 DEGs 512 个，下调 DEGs 473 个，图 1 展示了这些基因的分布情况，上调基因中差异程度最大的 5 个基因为 *ATOH8* ($\log_2FC = 3.50$)、*LILRA4* ($\log_2FC = 3.10$)、*SOWAHD* ($\log_2FC = 3.85$)、*FAM3B* ($\log_2FC = 2.80$)、*IFIT1* ($\log_2FC = 2.74$)。下调基因中差异程度最大的 5 个基因为 *RORA* ($\log_2FC = -2.58$)、*GRASP* ($\log_2FC = -2.55$)、*FAT4* ($\log_2FC = -2.48$)、*ZNF483* ($\log_2FC = -2.47$)、*GFPT2* ($\log_2FC = -2.42$)。

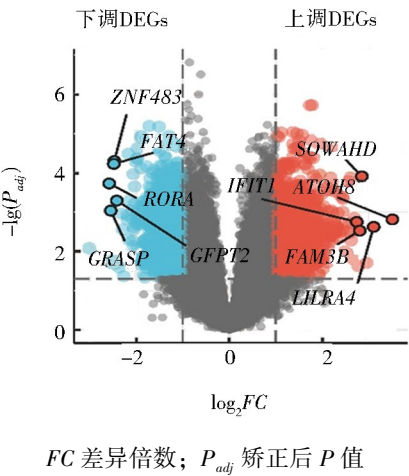


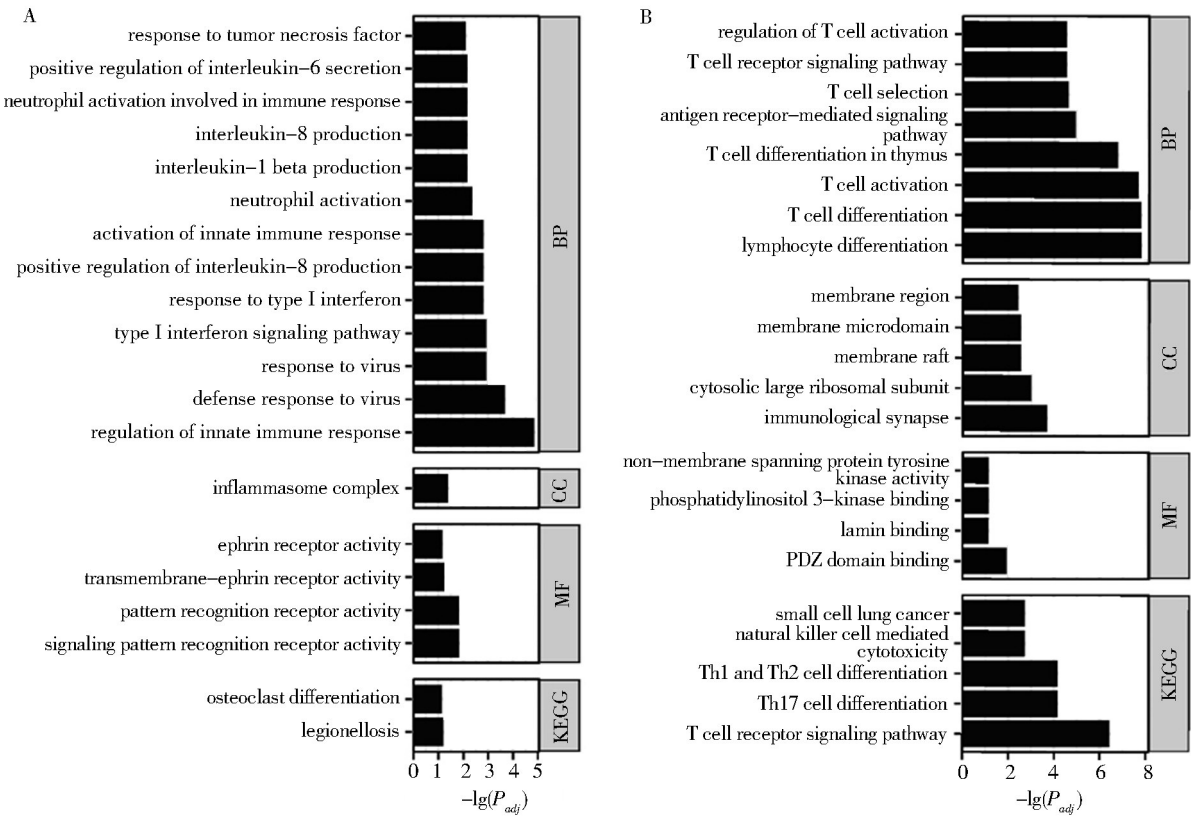
图 1 APS 中性粒细胞差异表达基因火山图

2.2 上下调 DEGs 的 GO、KEGG 富集分析

使用 clusterProfiler 进行基因富集分析，上调基因主要富集到的 GO 条目包括固有免疫反应调节、中性粒细胞激活、对 TNF 的反应、对 I 型干扰素的反应、I 型干扰素信号通路、IL-1 β 产生、IL-8 产生等，KEGG 条目包括军团菌病、成骨细胞分化。下调基因主要富集到的 GO 条目包括 T 细胞激活、淋巴细胞分化和激活、TCR 通路、T 细胞选择等，KEGG 条目包括 Th17 细胞分化、NK 细胞介导的细胞毒性等。见图 2。

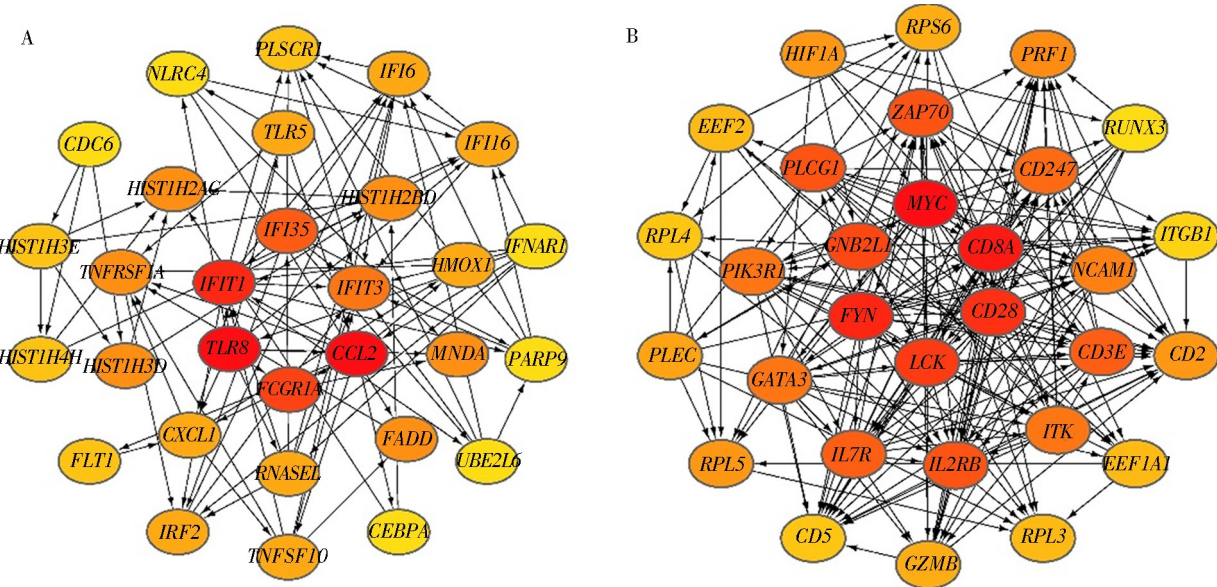
2.3 蛋白-蛋白互作网络构建和 hub 基因鉴定

将上调 DEGs 输入 STRING 后得到了一个包括 317 个节点、1 158 条边的 PPI 网络，导入 Cytoscape 后计算网络中每个节点的度值权重，度值越大表明该节点具有越广泛的连接性，是网络中的核心节点。在上调 DEGs 的 PPI 网络中度值前 5 位基因为 *IFIT1* (13)、*IFIT3* (11)、*CCL2* (11)、*TLR8* (10)、*IFI6* (10)。下调 DEGs 输入 STRING 后得到了一个包括 360 个节点、2 498 条边的 PPI 网络，网络中度值前 5 位基因为 *MYC* (112)、*CD8A* (98)、*FYN* (80)、*CD28* (78)、*LCK* (76) (图 3，表 1)。



A 上调 DEGs GO 和 KEGG 富集点图；B 下调 DEGs GO 和 KEGG 富集点图；BP 生物过程；CC 细胞组分；MF 分子功能；KEGG 京都基因与基因组百科全书； P_{adj} 矫正后 P 值

图 2 差异表达基因的基因富集分析



A 上调 DEGs PPI 网络中度值前 30 位基因互作网络图；B 下调 DEGs PPI 网络中度值前 30 位基因互作网络图

图 3 APS 中性粒细胞差异表达基因互作网络图

表 1 APS 中性粒细胞中上调和下调的前 30 个 hub 基因及其全称

上调差异基因			下调差异基因		
基因名称	度值	全称	基因名称	度值	全称
<i>IFIT1</i>	13	干扰素诱导四肽重复序列蛋白 1	<i>MYC</i>	112	MYC 原癌基因，BHLH 转录因子
<i>IFIT3</i>	11	干扰素诱导四肽重复序列蛋白 3	<i>CD8A</i>	98	CD8a 分子
<i>CCL2</i>	11	C-C 基序趋化因子配体 2	<i>FYN</i>	80	FYN 原癌基因，Src 家族酪氨酸激酶
<i>TLR8</i>	10	Toll 样受体 8	<i>CD28</i>	78	CD28 分子
<i>IFI6</i>	10	干扰素诱导蛋白 6	<i>LCK</i>	76	LCK 原癌基因，Src 家族酪氨酸激酶
<i>IFI35</i>	9	干扰素诱导蛋白 35	<i>GNB2L1</i>	70	活化蛋白 C 激酶受体 1
<i>IFI16</i>	9	干扰素诱导蛋白 16	<i>PLCG1</i>	66	磷脂酶 C γ 1
<i>IFNARI</i>	7	干扰素和受体亚基 1	<i>ZAP70</i>	66	酪氨酸蛋白激酶 ZAP-70
<i>PLSCR1</i>	7	磷脂转运酶 1	<i>IL2RB</i>	66	白细胞介素 2 受体亚基 Beta
<i>PARP9</i>	7	Poly（ADP -核糖）聚合酶家族成员 9	<i>IL7R</i>	64	白细胞介素 7 受体
<i>IRF2</i>	7	干扰素调节因子 2	<i>CD3E</i>	64	CD3e 分子
<i>TNFRSF1A</i>	7	肿瘤坏死因子受体超家族成员 1A	<i>CD247</i>	62	CD247 分子
<i>TNFSF10</i>	7	TNF 超家族成员 10	<i>GATA3</i>	60	GATA 结合因子 3
<i>RNASEL</i>	7	核糖核酸酶 4	<i>PIK3R1</i>	60	磷脂酰肌醇 3-激酶调节亚基 Alpha
<i>CXCL1</i>	7	C-X-C 基序趋化因子配体 1	<i>ITK</i>	60	IL2 诱导型 T 细胞激酶
<i>UBE2L6</i>	6	泛素载体蛋白 L6	<i>NCAM1</i>	58	神经细胞黏附分子 1
<i>TLR5</i>	5	Toll 样受体 5	<i>PRF1</i>	56	穿孔素 1
<i>HIST1H3D</i>	5	组蛋白簇 1 H3 家族成员 D	<i>HIF1A</i>	54	缺氧诱导因子 1 亚基 Alpha
<i>HIST1H4H</i>	5	组蛋白簇 1 H4 家族成员 H	<i>RPL5</i>	54	核糖体蛋白 L5
<i>HIST1H3E</i>	5	组蛋白簇 1 H3 家族成员 E	<i>CD2</i>	54	CD2 分子
<i>HIST1H2AC</i>	5	组蛋白簇 1 H2A 家族成员 C	<i>PLEC</i>	52	凝集素
<i>HIST1H2BD</i>	5	新的转录产物，反义 HIST1H2BD	<i>RPS6</i>	50	核糖体蛋白 S6
<i>NLRC4</i>	5	NLR 家族含有 CARD 结构域的蛋白质 4	<i>GZMB</i>	50	颗粒酶 B
<i>CEBPA</i>	3	CCAAT 增强子结合蛋白	<i>EEF1A1</i>	48	真核翻译延伸因子 1 α 1
<i>MNDA</i>	3	髓细胞核分化抗原	<i>EEF2</i>	48	真核翻译延伸因子 2
<i>CDC6</i>	3	细胞分裂周期 6 同源物	<i>RPL3</i>	48	大核糖体亚基蛋白 UL3
<i>FADD</i>	3	FAS 相关死亡域蛋白	<i>RPL4</i>	46	核糖体蛋白 L4
<i>FCGR1A</i>	3	IgG 受体 Ia 的 Fc 片段	<i>CD5</i>	46	CD5 分子
<i>HMOX1</i>	3	血红素加氧酶 1	<i>ITGB1</i>	44	整合素亚基 β 1
<i>FLT1</i>	2	Fms 相关受体酪氨酸激酶 1	<i>RUNX3</i>	42	RUNX 家族转录因子 3

3 讨论

原发性 APS 可以在没有临床和实验室证据的患者身上发现，其发病常伴随其他疾病，主要包括系

统性红斑狼疮和急性早幼粒细胞白血病，越来越多学者开始关注到 APS 患者中性粒细胞的异常反应^[7]。目前研究^[8]认为，APS 的机制中最重要的就是抗磷脂抗体（antiphospholipid antibodies, aPL）的异常激活，aPL 结合磷脂和各种细胞（血小板、内皮细胞、中性粒细胞、单核细胞、成纤维细胞和滋养细胞）表达的质膜蛋白，产生高凝固性血液。尽管 aPL 具有已知的嗜血栓性作用，但这种疾病的确切发病机制尚未完全阐明。

在上调基因构成的核心 PPI 网络中，包含了一群干扰素相关基因，包括 *IFIT1*、*IFIT3*、*IFI6*、*IFI35*、*IFI16*、*IFNAR1*。*IFIT1*、*IFIT3* 是干扰素依赖性多蛋白复合物的组成成分。研究^[9]表明，I 型干扰素基因在 APS 患者中的表达是通过浆细胞样树突状细胞途径、Toll 样受体（*TLR7* 和 *TLR9*）、抗 $\beta 2$ 糖蛋白 I 抗体介导的中性粒细胞激活和依赖于 *TLR4* 的 NETs 释放，以及随后的 B 细胞和浆母细胞激活而诱导的，并可通过 *TLR7* 和 *TLR9* 等 Toll 样受体、抗 $\beta 2$ 糖蛋白 I 抗体介导的中性粒细胞激活和中性粒细胞外陷阱释放，进而激活 B 细胞和浆母细胞。在前瞻性研究中，干扰素评分高与预后差的相关性可以指导高危人群迅速治疗^[10]。*CCL2* 是一种趋化因子，是参与免疫调节和炎症过程的分泌蛋白超家族，该趋化因子是 C-C 趋化因子亚家族的成员，其特征在于两个相邻的半胱氨酸残基。这种细胞因子对单核细胞和嗜碱性粒细胞显示趋化活性^[11]。*TLR8* 是 Toll 样受体家族的成员，其在病原体识别和固有免疫激活中起重要作用，是非特异性免疫系统中抵御入侵病原体的第一道防线。此前有研究^[12]表明，单核细胞中 *TLR8* 异常表达与 aPL 相关，但中性粒细胞中 *TLR8* 异常表达目前研究尚空白。此外，*FADD* 高表达也与 APS 相关，该基因编码的蛋白质是一种衔接分子，可与各种细胞表面受体相互作用并介导细胞凋亡信号。通过其 C 端死亡域，该蛋白可以被 *TNFRSF6/Fas* 受体、肿瘤坏死因子受体、*TNFRSF25* 和 *TNFRSF10/TRAIL* 受体募集，从而参与由这些受体引发的死亡信号，这提示细胞死亡在 APS 中的潜在调控作用^[13]。下调基因主要参与的生物学功能和通路则与 T 细胞激活和分化密切相关，包括 *CD8A*、*IL7R*、*CD3E* 在内的基因表达下调，这提示在 APS 中，通过中性粒细胞引起的多免疫细胞抑制反应可能是一种重要的调节机制。

综上，本研究筛选到 APS 中性粒细胞中核心的上调基因：*IFIT1*、*IFI35*、*IFI3*、*CCL2*、*TLR8*、*FCGR1A* 与核心的下调基因 *MYC*、*CD8A*、*FYN*、*CD28*、*LCK*、*GNB2L1* 可能与 APS 的中性粒细胞激活、NETs 形成、免疫抑制等机制相关，本研究的局限性在于缺乏更多关于 APS 中性粒细胞的表达谱数据，对于筛选出来的核心基因仍需进一步实验验证，这将在后续研究中进一步完善。

参考文献：

[1] GARCIA D, ERKAN D. Diagnosis and management of the antiphospholipid syndrome[J]. N Engl J Med, 2018, 378(21): 2010-2021. DOI: 10.1056/NEJMr1705454.

[2] SCHREIBER K, SCIASCIA S, DE GROOT P G, et al. Antiphospholipid syndrome[J]. Nat Rev Dis Primers, 2018, 4: 17103. DOI: 10.1038/nrdp.2017.103.

[3] LU Y, DONG Y, ZHANG Y, et al. Antiphospholipid antibody-activated NETs exacerbate trophoblast and endothelial cell injury in obstetric antiphospholipid syndrome[J]. J Cell Mol Med, 2020, 24(12): 6690-6703. DOI: 10.1111/jcmm.15321.

[4] WIRESTAM L, ARVE S, LINGE P, et al. Neutrophils-important communicators in systemic lupus erythematosus and antiphospholipid syndrome[J]. Front Immunol, 2019, 10: 2734. DOI: 10.3389/fimmu.2019.02734.

[5] LI K N, DU Y X, LI L, et al. Bioinformatics approaches for anti-cancer drug discovery[J]. Curr Drug Targets, 2020, 21(1): 3-17. DOI: 10.2174/1389450120666190923162203.

[6] KNIGHT J S, MENG H, COIT P, et al. Activated signature of antiphospholipid syndrome neutrophils reveals potential therapeutic target[J]. JCI Insight, 2017, 2(18): e93897. DOI: 10.1172/jci.insight.93897.

[7] NEGRINI S, PAPPALARDO F, MURDACA G, et al. The antiphospholipid syndrome: from pathophysiology to treatment[J].

- Clin Exp Med, 2017, 17(3): 257-267. DOI: 10.1007/s10238-016-0430-5.
- [8] DOBROWOLSKI C, ERKAN D. Treatment of antiphospholipid syndrome beyond anticoagulation[J]. Clin Immunol, 2019, 206: 53-62. DOI: 10.1016/j.clim.2018.03.001.
- [9] XOURGIA E, TEKTONIDOU M G. Type I interferon gene expression in antiphospholipid syndrome: pathogenetic, clinical and therapeutic implications[J]. J Autoimmun, 2019, 104: 102311. DOI: 10.1016/j.jaut.2019.102311.
- [10] PALLI E, KRAVVARITI E, TEKTONIDOU M G. Type I interferon signature in primary antiphospholipid syndrome: clinical and laboratory associations[J]. Front Immunol, 2019, 10: 487. DOI: 10.3389/fimmu.2019.00487.
- [11] KIM B, YEON J W, LEE J H, et al. CCL2 mitigates cyclic AMP-suppressed Th2 immune response in human dendritic cells[J]. Allergy, 2020, 75(8): 2108-2111. DOI: 10.1111/all.14284.
- [12] HURST J, PRINZ N, LORENZ M, et al. TLR7 and TLR8 ligands and antiphospholipid antibodies show synergistic effects on the induction of IL-1beta and caspase-1 in monocytes and dendritic cells[J]. Immunobiology, 2009, 214(8): 683-691. DOI: 10.1016/j.imbio.2008.12.003.
- [13] SCHWARZER R, JIAO H P, WACHSMUTH L, et al. FADD and caspase-8 regulate gut homeostasis and inflammation by controlling MLKL-and GSDMD-mediated death of intestinal epithelial cells[J]. Immunity, 2020, 52(6): 978-993. DOI: 10.1016/j.immuni.2020.04.002.

(责任编辑: 刘俊华)