

生物信息学分析证实肺动脉高压发病机制中潜在的坏死性凋亡基因



曹亚朋*, 张敏, 王思雨

西安交通大学医学部基础医学院心血管研究中心, 西安交通大学环境与疾病相关基因教育部重点实验室, 陕西西安 710061

摘要: 目的: 肺动脉高压 (Pulmonary artery hypertension, PAH) 是一种严重危及生命的肺部疾病, 目前尚无有效的治疗药物。坏死性凋亡在 PAH 的发病机制中起关键作用。因此, 我们通过生物信息学和在体实验来研究和验证 PAH 中潜在的坏死相关基因。方法: 首先, 我们从 Gene Expression Omnibus (GEO) 和 Kyoto Encyclopedia of genes and Genomes (KEGG) 数据库中获取 PAH (GSE15197) 的微阵列数据和坏死相关基因的数据集; 利用生物信息学方法来分析 PAH 患者肺与健康肺间的差异表达基因; 通过富集分析和蛋白-蛋白相互作用分析来筛选关键的枢纽基因。同时, 我们进行了模构建和枢纽基因的共表达分析; 通过 TRRUST 网站, 我们来解析枢纽基因的关键转录因子。最后我们建立了实验小鼠 PAH 模型, 利用实时荧光定量聚合酶链式反应 (qRT-PCR) 实验来验证枢纽基因和关键转录因子的表达水平。结果: 通过比较健康肺和 PAH 患者的肺, 我们共鉴别出 16 个与坏死相关的差异表达基因, 其中上调基因有 10 个, 下调基因有 6 个。另外, ClueGO 和 KEGG 富集分析表明, 这些与坏死性凋亡相关的差异表达基因参与了一氧化氮生物合成过程、坏死性凋亡细胞死亡、趋化因子的产生和坏死、NOD 样受体信号通路的正调控过程。通过 cytoHubba, 我们获得了 7 个枢纽基因, 包括 BAX、XIAP、TLR4、TNF、HSP90AA1、FAS 和 TNFSF10。qRT-PCR 实验结果表明, 与正常小鼠相比, 实验性 PAH 小鼠肺中 *Bax*、*Tlr4*、*30tnf*、*Hsp90aa1*、*Fas* 和 *Tnfsf10* 的表达显著上调, 然而 *Xiap* 的表达水平没有显著差异。结论: 本研究确定了 PAH 发病过程中与坏死性凋亡相关的 7 个重要的枢纽基因, 其可作为 PAH 潜在的治疗靶点, 为进一步研究 PAH 的发病机制及靶向治疗提供了新的思路。

关键词: 坏死性凋亡; 肺动脉高压; 生物信息学分析; 基因表达综合数据库; 枢纽基因; 转录因子

DOI: [10.57237/j.life.2024.01.003](https://doi.org/10.57237/j.life.2024.01.003)

Bioinformatics Analysis Confirms Potential Necroptosis Genes in the Pathogenesis of Pulmonary Artery Hypertension

Yapeng Cao*, Min Zhang, Siyu Wang

Cardiovascular Research Center, School of Basic Medical Sciences, Xi'an Jiaotong University Health Science Center; Key Laboratory of Environment and Genes Related to Diseases, Xi'an Jiaotong University, Ministry of Education, Xi'an 710061, China

基金项目: 国家自然科学基金项目 (82000072); 中国博士后科学基金项目 (2020M673425).

*通信作者: 曹亚朋, caoyapengzju@163.com

收稿日期: 2023-12-07; 接受日期: 2024-01-24; 在线出版日期: 2024-02-04

<http://www.lifescitech.org>

Abstract: Objective: Pulmonary artery hypertension (PAH) is a life-threatening lung disease without effective therapeutic agents. Necroptosis plays a key role in the pathogenesis of PAH. We therefore investigated to identify and validate the potential necroptosis-related genes in PAH by bioinformatics analysis and experiments. Methods: Firstly, the microarray data of PAH (GSE15197) and necroptosis-related genes were obtained from Gene Expression Omnibus (GEO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) database. Then we used the bioinformatics methods to identify the differentially expressed genes (DEGs) between the normal lungs and the lungs of PAH patients and extract the necroptosis-related DEGs. Enrichment analysis and protein-protein interaction (PPI) analysis were performed to screen the hub genes. Module construction and co-expression analysis of hub genes were also conducted. Key transcription factors (TFs) of hub genes were obtained by using the TRRUST website. Finally, the experimental mouse PAH model was performed to verify the expression of hub genes and key TFs by qRT-PCR. Results: A total of 16 necroptosis-related DEGs (10 upregulated genes and 6 downregulated genes) were identified by comparing the normal lungs and the lungs of PAH patients. ClueGO and KEGG enrichment analysis demonstrated these necroptosis-related DEGs were involved in positive regulation of nitric oxide biosynthetic process, programmed necrotic cell death, positive regulation of chemokine production, necroptosis, and NOD-like receptor signaling pathway. 7 hub genes were obtained by cytoHubba, including BAX, XIAP, TLR4, TNF, HSP90AA1, FAS, and TNFSF10. qRT-PCR analysis confirmed that expression of *Bax*, *Tlr4*, *Tnf*, *Hsp90aa1*, *Fas* and *Tnfsf10* were significantly upregulated, while the expression level of *Xiap* was not significant in mouse lungs with experimental PAH compared with normal mouse lungs. Conclusion: Our study identified 7 important hub genes related to necroptosis in PAH, which could be used as potential therapeutic targets and provide new insights into further mechanism study for PAH.

Keywords: Necroptosis; Pulmonary Artery Hypertension; Bioinformatics Analysis; Gene Expression Omnibus; Hub Genes; Transcription Factors

1 引言

肺动脉高压 (PAH) 是一种严重的危及生命的肺部疾病, 其特征是肺小血管的重塑, 导致肺血管阻力的进行性升高, 最终导致右心室衰竭和死亡。PAH 的主要病理改变包括肺血管细胞增殖和抗凋亡的增加, 细胞外基质的产生和积累, 促炎细胞因子和趋化因子的表达, 以及随后的肺血管周围大量的白细胞浸润[1-3]。既往研究表明, PAH 患病率为 15-60 例/百万人/年, 发病率为 5-10 例/百万人/年[4]。尽管在过去的 46 年里对 PAH 的发病机制进行了大量的研究, 但其发病机制仍不清楚, 目前可用的药物对该疾病的治疗效果仍有限[5]。

在多细胞生物中, 细胞死亡是对细胞微环境干扰引起的损伤或应激反应的关键过程。最近, 有研究报道了一种由基因编程和调控的坏死形式, 被称为坏死性凋亡[6]。坏死性凋亡最初被认为是一种在泛 caspase 抑制剂存在的条件下由肿瘤坏死因子 (TNF) 诱导的细胞死亡机制, 不依赖于细胞凋亡蛋白酶[7]。细胞坏死性凋亡广泛参与到肺部疾病的发病机制中, 包括慢性阻塞性肺疾病 (COPD) [8], 特发性肺纤维化 (IPF)

[9], 肺癌[10], 和 PAH [11]。坏死性凋亡需要 RIPK3 和 MLKL 这两个激酶的存在, 其特征是细胞膜硬化、核染色质浓缩、核断裂和质膜鼓泡[12]。细胞坏死性凋亡被认为是程序性细胞死亡的一种替代形式。然而, 越来越多的证据表明, 细胞坏死性凋亡与临床疾病相关, 且独立于细胞凋亡[13]。值得注意的是, Xiao 等人已经证明, RIPK3 介导的细胞坏死性凋亡参与了损伤相关分子模式 (DAMPs) 的产生, 而 DAMPs 与大鼠野百合碱诱导的多环芳烃中 TLR 和 NLR 通路的激活有关, 这表明细胞坏死性凋亡可能是 PAH 的主要致病原因[11]。此外, Zemskova 等人的研究表明, 细胞坏死性凋亡在 TLR4 的激活和 PAH 的严重程度上表现出的性别差异中起着潜在的作用[14]。因此, 需要进一步的研究来确认参与 PAH 的细胞坏死性凋亡的相关基因, 以发现细胞坏死性凋亡参与 PAH 的潜在机制, 从而为 PAH 的治疗提供新的见解。

据我们所知, 目前还没有关于细胞坏死性凋亡基因在 PAH 的发病机制中的生物信息学研究。因此, 在这篇研究中, 我们使用数据挖掘技术获得了 PAH 患者

与正常对照肺的差异表达基因。然后，我们将上述差异表达基因与细胞坏死性凋亡基因集相交，得到与细胞坏死性凋亡基因相关的差异表达基因。之后，我们使用 Cytoscape 的 cytoHubba 插件鉴别出了重要的枢纽基因。此外，我们用实验性 PAH 小鼠验证了肺中枢基因和关键转录因子的表达情况。本研究将有助于阐明在 PAH 发病过程中细胞坏死性凋亡的作用机制，为 PAH 的临床诊断和治疗提供新的思路。

2 材料与方法

2.1 动物和小鼠 PAH 模型

动物使用方案经西安交通大学机构动物爱护使用委员会批准。动物实验设施的环境条件符合中国《实验动物与环境设施》标准。实验中使用的所有小鼠均为 C57BL/6J 背景。将 8 周龄的雄性小鼠暴露在 10% 的氧气中 4 周，以诱导小鼠产生 PAH 模型，随后小鼠在指定时间被麻醉进行血流动力学分析，然后收集肺组织用于定量实时 PCR 分析。

2.2 GEO 信息

GSE15197 的微阵列数据下载自 GEO (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>) 数据库[15]，该数据库是一个包含大量高通量测序和微阵列数据集的公共数据集。GSE15197 数据集包含 18 个 PAH 患者和 13 个对照人肺组织。

2.3 细胞坏死性凋亡相关差异表达基因的鉴别

我们使用在线分析工具 GEO2R (www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/ge2r) [16] 比较 PAH 和对照组之间的基因表达谱，以获得差异表达基因。GEO2R 是基于两个 R 包：GEOquery 和 Limma。其中，“GEOquery”包主要用于读取数据。R 中的“Limma”包是计算微分表达倍数和鉴别差异表达基因。校正 p 值 < 0.05，且 $| \log_{2}(\text{fold change}) | \geq 1$ 的基因被认为是差异表达基因。

从 KEGG 数据库 (<https://www.kegg.jp/>) 下载 159 个与细胞坏死性凋亡相关基因的数据集，与 GSE15197 交叉比对，鉴别出细胞坏死性凋亡相关基因。然后我们使用在线维恩工具

(<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>) 绘制维恩图并获得细胞坏死性凋亡相关的差异表达基因。

2.4 细胞坏死性凋亡相关差异表达基因的富集分析

为了研究细胞坏死性凋亡相关差异表达基因的潜在作用，我们用 Cytoscape 的插件 ClueGO 对这些基因进行了生物学功能分析，并将它们可视化为功能团网络 [17]。此外，利用 DAVID 网站 (<https://david.ncifcrf.gov/home.jsp>) 进行细胞坏死性凋亡相关差异表达基因的 KEGG 富集通路分析。然后，我们使用‘clusterProfiler’和‘ggplot2’R 包来可视化和描绘富集的通路。P < 0.05 为有统计学意义。

2.5 蛋白-蛋白相互作用网络分析与模块构建

利用 STRING 网站 (<https://string-db.org/>) 构建细胞坏死性凋亡相关差异表达基因的蛋白-蛋白相互作用网络，综合评分大于 0.4，认为具有统计学意义。然后我们使用 Cytoscape 软件（版本：3.7.2）对蛋白-蛋白相互作用网络进行可视化分析。聚类分析采用 Cytoscape 的分子复合物检测技术（MCODE）进行，设置 K-core = 2，度截断值=2，最大深度=100，节点评分截断值=0.2。这些基因的富集分析通过 ClueGO 和 DAVID 网站获得。

2.6 枢纽基因的鉴别与分析

我们使用了 cytoHubba 的 7 种算法（MCC, MNC, Degree, Closeness, Radiality, Stress, EPC）来获得枢纽基因。然后，我们通过 GeneMANIA (<http://www.genemania.org/>) 对枢纽基因进行了共表达分析，以研究这些枢纽基因的相关性。

2.7 关键转录因子（TFs）预测

我们使用 TRRUST 数据库 (<https://www.grnpedia.org/trrust/>) 揭示的转录调控关系获得了枢纽基因的关键 TFs，其中包括 TFs 之间的调控关系[18]。校正 p 值 < 0.05 认为有统计学意义。

2.8 RNA 提取及定量 RT-PCR(qRT-PCR) 分析

用 Trizol 试剂从冷冻小鼠肺组织中提取总 RNA。取 1 μ g RNA, 按 cDNA 合成试剂盒说明书进行 cDNA

合成。在 StepOne Plus 系统 (Applied Biosystems, Grand Island, NY) 上使用通用 SYBR green 混合液进行 qRT-PCR。基因特异性引物序列见表 1。采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法定量靶基因的相对表达量。18S rRNA 作为内参。

表 1 引物序列

基因名	引物序列
Tnf	F: GGTGCCTATGTCTCAGCCTCTT; R: GCCATAGAACTGATGAGAGGGAG
Bax	F: AGGATGCGTCCACCAAGAAGCT; R: TCCGTGTCCACGTCAGCAATCA
Xiap	F: GGCAGAACATGAAGCACGGATCG; R: CACTTGGCTTCCAATCCGTGAG
Tlr4	F: AGCTTCTCCAATTTTCAGAACCTTC; R: TGAGAGGTGGTGTAAGCCATGC
Hsp90aa1	F: GCTTCAGAGCTGTTGCGGTAC; R: AAAGGCAGGAGTTAGCAACCTGG
Fas	F: CTGCGATTCTCCTGGCTGTGAA; R: CAACAACCATAAGCGATTCTGG
Tnfsf10	F: GGAAGACCTCAGAAAGTGGCAG; R: TTTCCGAGAGGACTCCCAGGAT
Pml	F: GTCTAAGACCCAACCTGTGGCT; R: CTTCATGGAGGCCACTGTCTGA
Sp1	F: CTCCAGACCATTAAACCTCAGTGC; R: CACCACCAAGATCCATGAAGACC

2.9 统计分析

采用 GraphPad Prism 软件和 R (版本 3.6.1) 软件进行统计分析。对于微阵列数据, 我们使用“Limma”软件包进行差异基因分析。在动物实验中, 采用 unpaired Student's t 检验评估两组间差异的显著性。所有结果均以均数±SEM 表示。 $P < 0.05$ 被认为是显著的。所有的生物实验至少重复三次。

3 实验结果

3.1 细胞坏死性凋亡相关差异表达基因的鉴别

将微阵列数据标准化后, 根据调整后的 p 值 < 0.05 和 $| \log_{2}(\text{fold change}) | \geq 1$ 的标准, 得到 2662 个差异表达基因 (见图 1a)。然后, 我们通过维恩图将 2662 个差异表达基因与 159 个细胞坏死性凋亡相关基因的数据集相交, 以确定与坏死相关的差异表达基因。如图 1b 和表 2 所示, 共获得 16 个与坏死相关的差异表达基因, 其中 10 个表达上调, 6 个表达下调。

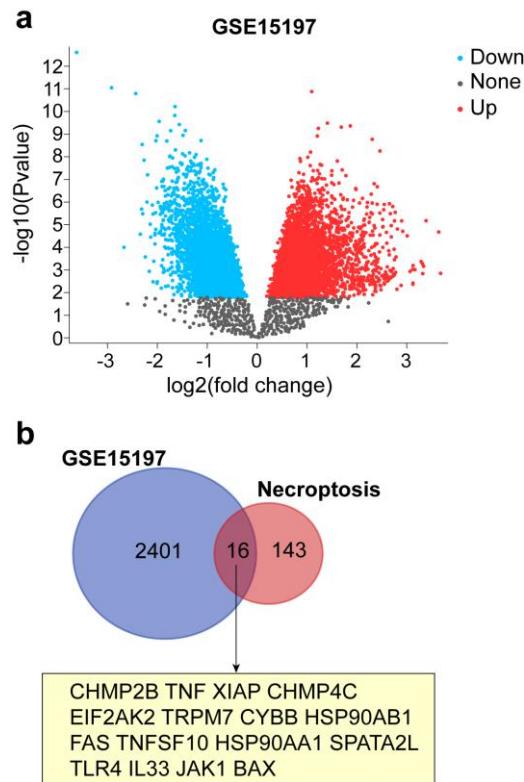


图 1 火山图和维恩图。(a) GSE15197 的火山图。上调基因以浅红色标记。下调基因以浅蓝色标记。无显著差异的基因用灰色标记。(b) 坏死性凋亡相关差异表达基因的维恩图。将 GSE15197 与坏死相关基因数据集相交, 以鉴别与坏死性凋亡相关的差异表达基因。

表 2 在 PAH 发病过程中与坏死相关的差异表达基因。

Gene.symbol	logFC	adj.P.Val	Gene.title
Upregulated genes			
CYBB	2.5228657	0.000396	cytochrome b-245 beta chain
BAX	2.3728499	0.00269	BCL2 associated X, apoptosis regulator
XIAP	2.0856471	0.000667	X-linked inhibitor of apoptosis
TLR4	1.8343313	0.000219	toll like receptor 4
JAK1	1.5799934	0.0016	Janus kinase 1
HSP90AB1	1.3554205	0.000743	heat shock protein 90 alpha family class B member 1
CHMP4C	1.1510553	0.00445	charged multivesicular body protein 4C
EIF2AK2	1.0690987	0.00234	eukaryotic translation initiation factor 2 alpha kinase 2
SPATA2L	1.0359355	0.0471	spermatogenesis associated 2 like
TNF	0.7470438	0.0159	tumor necrosis factor
Downregulated genes			
TRPM7	-0.8631701	0.00276	transient receptor potential cation channel subfamily M member 7
HSP90AA1	-1.0637412	0.00437	heat shock protein 90 alpha family class A member 1
CHMP2B	-1.2158323	0.00441	charged multivesicular body protein 2B
FAS	-1.3358365	0.00021	Fas cell surface death receptor
TNFSF10	-1.4552821	0.00461	tumor necrosis factor superfamily member 10
IL33	-2.0870165	0.000184	interleukin 33

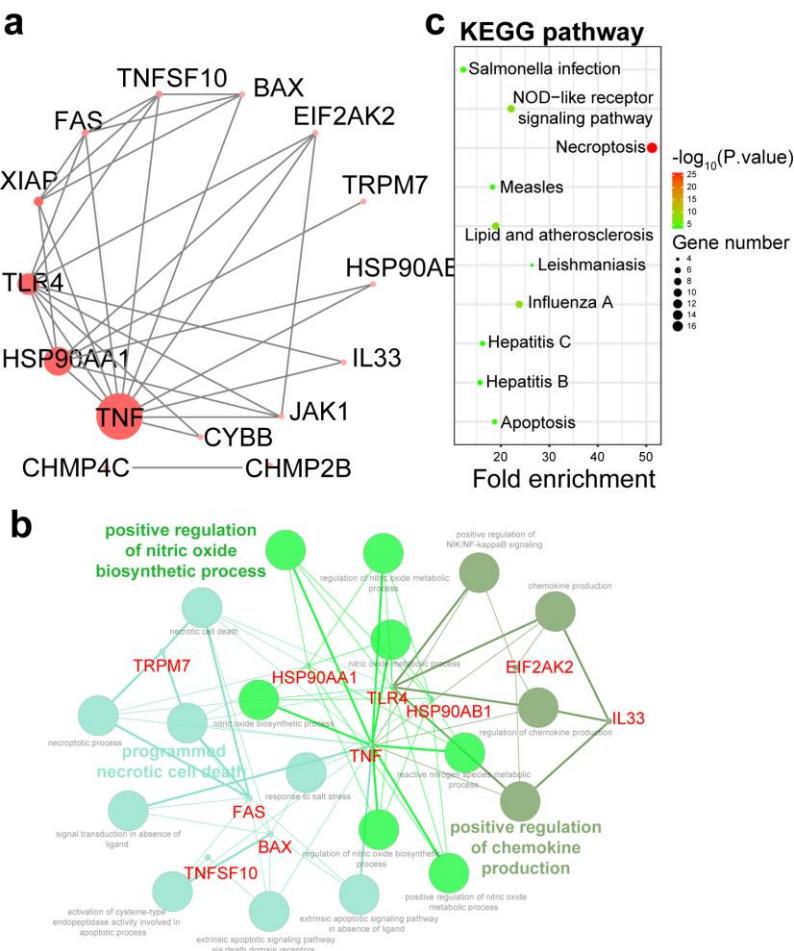


图 2 16 种与坏死性凋亡相关的差异表达基因的蛋白-蛋白相互作用网络及富集分析。(a) 16 个差异表达的与坏死性凋亡相关的基因的蛋白-蛋白相互作用网络。(b) 利用 Cytoscape 的 ClueGO 插件获得的 GO term 相互作用网络。具有显著差异的 GO term 被突出显示。GO, 基因本体。(c) 16 个坏死性凋亡相关差异表达基因的 KEGG 富集分析。圆圈的大小表示所涉及基因的数量, 横坐标表示总基因中所涉及基因的频率

3.2 细胞坏死性凋亡相关差异表达基因的富集分析

为探索以上 16 种坏死相关差异表达基因的潜在生物学功能和途径, 我们使用 ClueGo 进行 GO 富集分析, 利用 DAVID 工具进行 KEGG 富集分析。结果表明, 关于生物过程的前三个显著富集的 GO term 是一氧化氮生物合成过程的正调控、坏死性凋亡细胞死亡, 和趋化因子产生的正调控(见图 2b)。在 KEGG 通路方面, 最显著的富集项包括坏死性凋亡, 和 NOD 样受体信号通路(见图 2c)。这些结果有力地证实了坏死性凋亡及其相关趋化因子在 PAH 的发生发展中发挥重要作用。

3.3 蛋白-蛋白相互作用网络与模块构建分析

用 Cytoscape 构建了综合评分大于 0.4 的蛋白-蛋白相互作用网络, 以证实细胞坏死性凋亡相关差异表达基因之间的相互作用(见图 2a)。然后我们通过 Cytoscape 的 MCODE 插件得到一个紧密连接的基因模块, 该模块包含 8 个节点和 15 条边(见图 3a)。MCODE 基因的 ClueGO 富集分析表明, 这些基因与坏死性凋亡细胞死亡和坏死性凋亡过程显著相关(见图 3b)。KEGG 通路分析显示 MCODE 基因主要参与坏死性凋亡过程(见图 3c)。

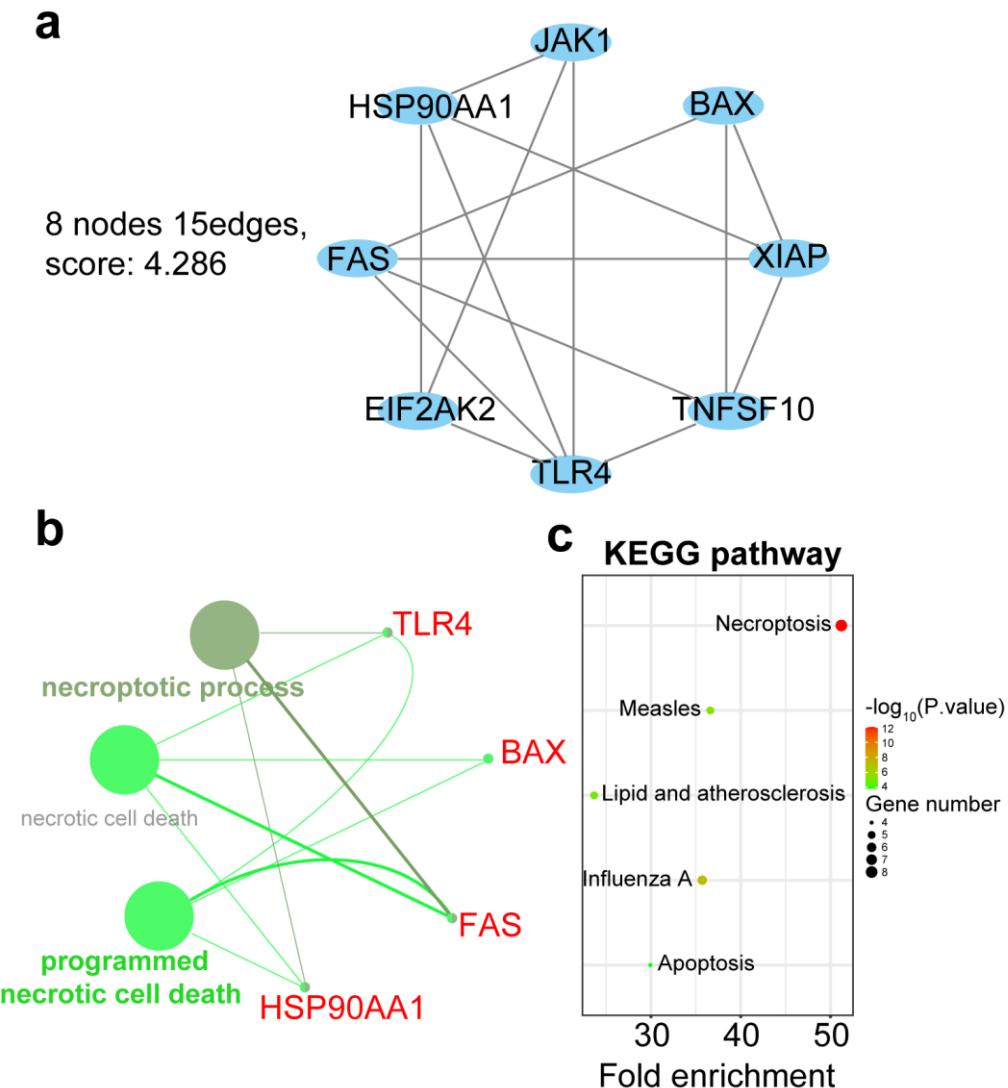


图 3 关键基因模块及模块基因富集分析。(a) 鉴定出的显著基因聚类模块。(b, c) 模块化基因的 ClueGO 和 KEGG 富集分析

3.4 枢纽基因的鉴定与分析

为了选择蛋白-蛋白相互作用网络的枢纽基因，我们采用了 cytoHubba 的 7 种算法，得到了排名前 10 位的枢纽基因（见表 3）。然后通过维恩图交叉筛选 7 个常见枢纽基因，包括 BAX、XIAP、TLR4、TNF、HSP90AA1、FAS 和 TNFSF10（见图 4a）。此外，通过

GeneMANIA 数据库获得这些枢纽基因的共表达网络（见图 4b）。结果表明，这些枢纽基因共享一个复杂的蛋白-蛋白相互作用网络，物理互作率为 43.25%，共享蛋白结构域为 26.83%，共表达率为 16.89%，预测率为 12.07%，基因互作率为 0.95%（见图 4b）。

表 3 排名前 10 位的枢纽基因。

MCC	MNC	Degree	Closeness	Radiality	Stress	EPC
TNF	TNF	TNF	TNF	TNF	TNF	TNF
TLR4	TLR4	TLR4	TLR4	TLR4	HSP90AA1	TLR4
TNFSF10	HSP90AA1	HSP90AA1	HSP90AA1	HSP90AA1	TLR4	HSP90AA1
FAS	TNFSF10	TNFSF10	XIAP	XIAP	XIAP	TNFSF10
HSP90AA1	FAS	FAS	TNFSF10	TNFSF10	TNFSF10	FAS
XIAP	XIAP	XIAP	FAS	FAS	FAS	XIAP
BAX	BAX	BAX	EIF2AK2	EIF2AK2	TRPM7	BAX
EIF2AK2	EIF2AK2	EIF2AK2	JAK1	JAK1	BAX	EIF2AK2
JAK1	JAK1	JAK1	BAX	BAX	HSP90AB1	JAK1
HSP90AB1	HSP90AB1	HSP90AB1	HSP90AB1	HSP90AB1	IL33	IL33

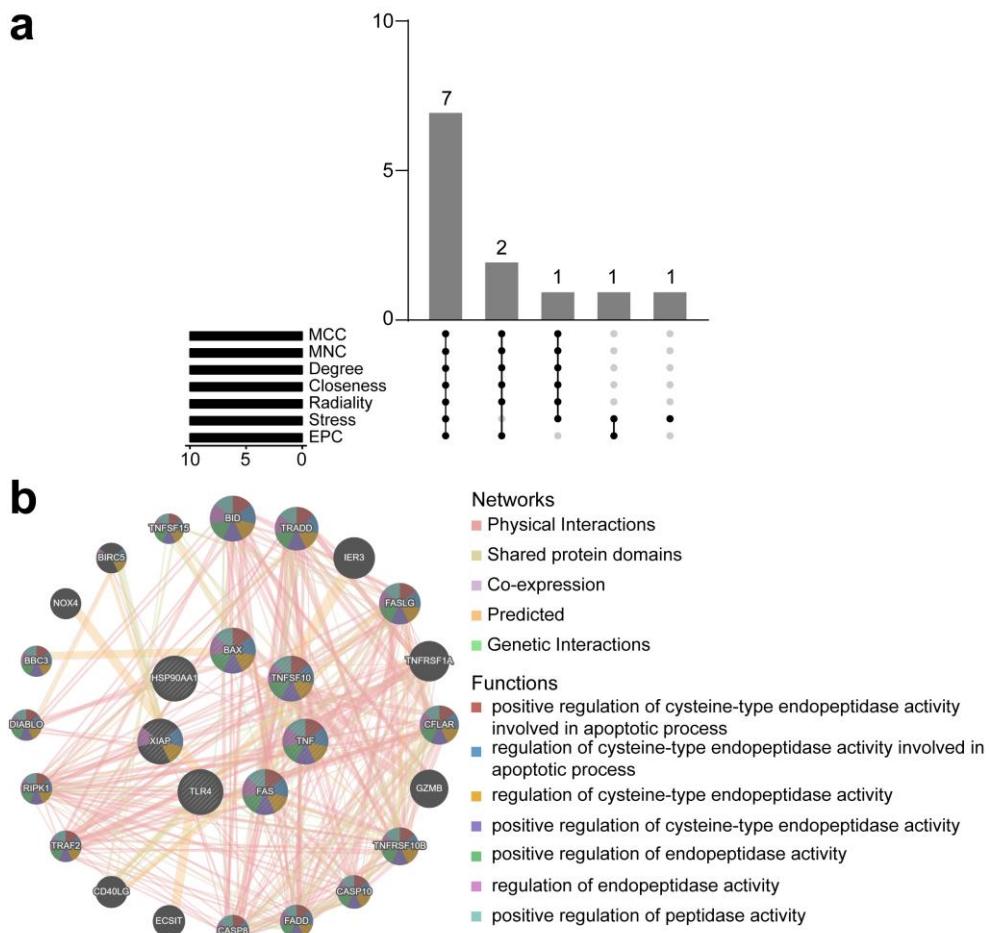


图 4 枢纽基因鉴定及枢纽基因共表达网络。(a) 维恩图显示，通过 Cytoscape 的 7 种算法筛选出 7 个重叠的枢纽基因。(b) 通过 GeneMANIA 分析 Hub 基因及其共表达基因。

3.5 关键转录因子的预测

基于 TRRUST 数据库, 我们发现有 12 个可能调控这些枢纽基因表达的转录因子, 包括 RELA、NFKB1、SP1、STAT1、EGR1、NFKBIA、PML、ATM、ATF2、SPI1、JUN、TP53 (见图 5)。这些转录因子的全称见表 4。

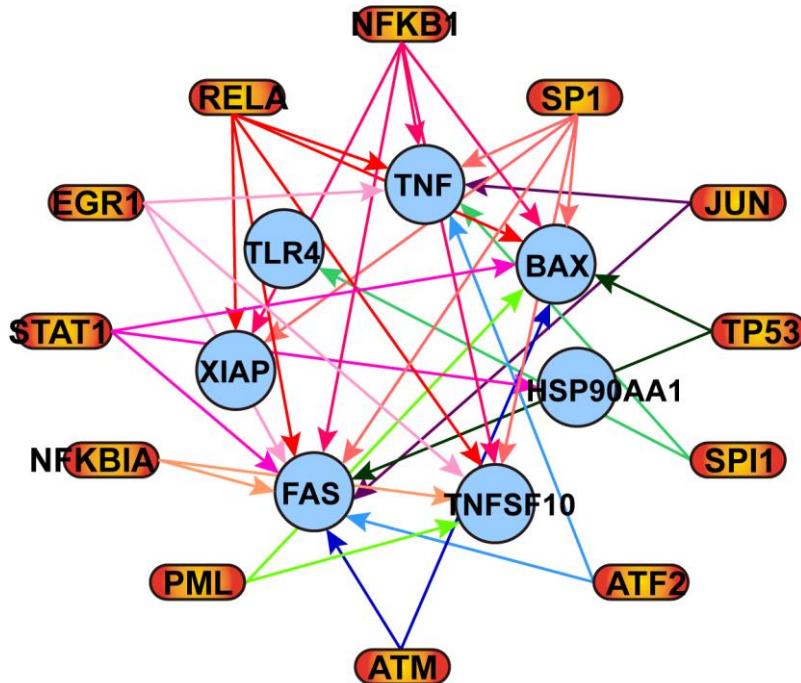


图 5 转录因子调控网络。转录因子用橙色标记, 枢纽基因用蓝色标记

表 4 枢纽基因的关键转录因子。

Key TFs	Description	P value	Genes
RELA	v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A (avian)	2.04E-08	FAS, TNFSF10, BAX, XIAP, TNF
NFKB1	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1	2.11E-08	BAX, XIAP, TNF, FAS, TNFSF10
SP1	Sp1 transcription factor	1.93E-07	BAX, TNF, TNFSF10, XIAP, FAS
STAT1	signal transducer and activator of transcription 1, 91kDa	2.94E-06	BAX, HSP90AA1, FAS
EGR1	early growth response 1	3.38E-06	TNFSF10, TNF, FAS
NFKBIA	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha	2.01E-05	TNFSF10, FAS
PML	promyelocytic leukemia	2.01E-05	BAX, TNFSF10
ATM	ataxia telangiectasia mutated	2.72E-05	FAS, BAX
ATF2	activating transcription factor 2	5.82E-05	FAS, TNF
SPI1	spleen focus forming virus (SFFV) proviral integration oncogene spi1	0.000221	TNF, TLR4
JUN	jun proto-oncogene	0.00127	FAS, TNF
TP53	tumor protein p53	0.00153	FAS, BAX

3.6 实验性 PAH 小鼠肺中枢基因和转录因子的表达验证

我们利用缺氧 (10% 氧气) 诱导小鼠产生肺动脉高

压模型, 缺氧 4 周后分离提取小鼠的肺组织, 如图 6 所示, 与对照组相比, 实验组 PAH 小鼠肺中 *Bax*、*Tlr4*、*Tnf*、*Hsp90aa1*、*Fas*、*Tnfsf10*、*Pml*、*Sp1* 的表达明显上调, 而两组之间 *Xiap* 的表达无显著差异 (见图 6)。

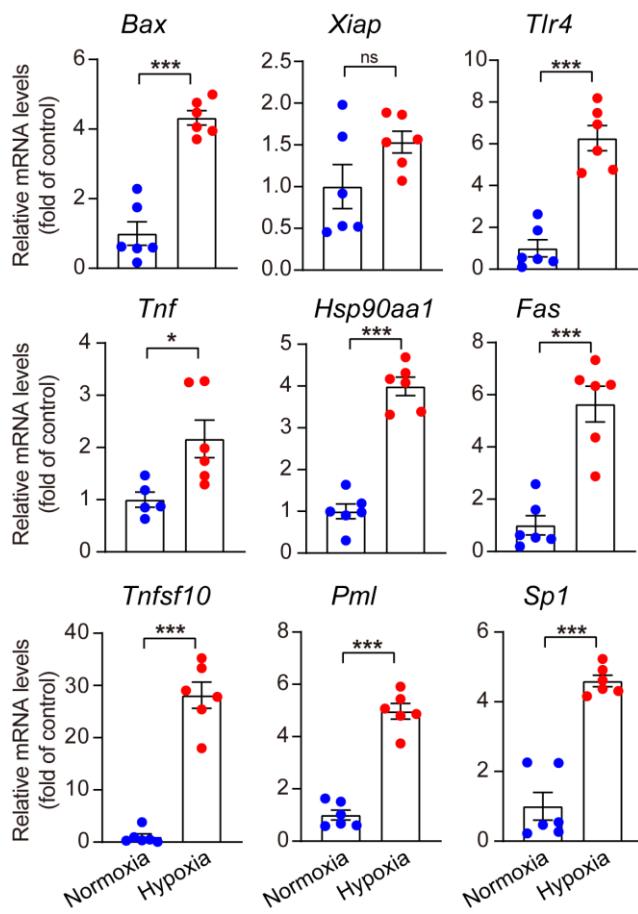


图 6 采用 qRT-PCR 方法验证实验性 PAH 小鼠肺中枢纽基因和转录因子的表达水平。qRT-PCR 检测实验性 PAH 小鼠和对照小鼠肺组织中 *Bax*、*Xiap*、*Tlr4*、*Tnf*、*Hsp90aa1*、*Fas*、*Tnfsf10*、*Pml*、*Sp1* 的 mRNA 水平。所有数据均以均值 \pm SEM 表示。统计学显著性采用 unpaired Student's t 检验。 $*P < 0.05$ 被认为是显著的， $**P < 0.01$ ， $***P < 0.001$ 。

4 讨论

在本研究中，我们鉴定了在 PAH 发病过程中重要的与坏死性凋亡的相关基因，并探讨了坏死性凋亡在 PAH 发展过程中的潜在发病机制。首先，我们利用测序数据集 GSE15197 与坏死性凋亡基因集，从其交集中获得了 16 个与坏死性凋亡相关的差异表达基因，其中包括 10 个上调基因和 6 个下调基因，这些与坏死性凋亡相关的差异表达基因之间存在显著的相互作用。此外，富集分析表明，这些坏死性凋亡相关的差异表达基因主要与一氧化氮生物合成过程的正调控、程序性坏死细胞死亡、趋化因子产生的正调控、坏死性凋亡和 NOD 样受体信号通路有关。随后，我们通过 cytoHubba 获得了 7 个关键枢纽基因，包括 BAX、XIAP、TLR4、TNF、HSP90AA1、FAS 和 TNFSF10。此外，

我们还鉴定了上述枢纽基因的转录因子调控网络。最后，我们建立了缺氧诱导的 PAH 小鼠模型，验证了枢纽基因和关键转录因子在实验组和对照组小鼠肺中的表达水平。结果表明，与对照组相比，实验组 PAH 小鼠肺中 *Bax*、*Tlr4*、*Tnf*、*Hsp90aa1*、*Fas*、*Tnfsf10*、*Pml* 和 *Sp1* 的表达显著上调。然而，*Xiap* 的表达无显著差异。虽然本研究获得的一些基因未曾报道，但本研究为 PAH 发病的潜在机制研究提供了新的见解和可靠的参考。

在过去的几十年里，坏死性凋亡是程序性坏死的一种形式，被认为是各种心血管疾病的病理基础，并且在心肌缺血再灌注损伤和心力衰竭中起着重要作用 [19-22]。近年来，研究发现坏死性凋亡在新型冠状病毒疾病 (COVID-19) [23]，特发性肺纤维化 (IPF) [9]，肺动脉高压 (PAH) [11]，和肺癌 [10] 等肺部疾病的发生进展中发挥重要作用。然而，PAH 确切致病机制仍有待详尽阐明。关于 PAH 相关的坏死性凋亡的潜在分子机制，GO 和 KEGG 富集分析结果表明，坏死性凋亡相关基因参与了一氧化氮生物合成过程的正调控、程序性坏死细胞死亡、趋化因子产生的正调控、坏死性凋亡和 NOD 样受体信号通路。肺血管过度收缩是 PAH 的特征之一，会导致血管横截面积减少，右心室后负荷增加 [24]。血管扩张性和抗增殖一氧化氮水平降低是目前提出的 PAH 发病机制之一 [25]。已有研究报道一氧化氮可通过激活 cGMP 使血管平滑肌张力松弛，抑制平滑肌的增殖和迁移，降低肺动脉阻力 [26-29]。最近有研究报道，在 MCT 诱导的 PAH 大鼠模型中，一些坏死性凋亡信号分子的表达水平发生显著变化 [11]。因此，这些研究表明，与炎症反应相关的程序性细胞死亡可能参与了 PAH 的发病机制。此外，多项研究表明趋化因子和细胞因子可导致 PAH 肺血管重构，包括白细胞介素(IL)-1 β 、IL-6、IL-8、单核细胞趋化蛋白-1 和肿瘤坏死因子(TNF)- α 的异常升高 [30, 31]。最近，Xiao 等人证实 RIPK3 介导的坏死性凋亡及其诱导的 TOLL 样通路和 NOD 样通路参与了 PAH 大鼠肺血管重构的进展过程 [11]。

此外，我们通过 Cytoscape 软件的 cytoHubba 插件获得 7 个关键枢纽基因，包括 TNF、TLR4、BAX、XIAP、HSP90AA1、FAS 和 TNFSF10，这些关键蛋白参与许多生物和病理过程。肿瘤坏死因子 (TNF α) 是一种关键的炎症介质，其循环水平在 PAH 患者肺中显著升高，研究表明肺中过表达 TNF α 的转基因小鼠出现了严重的 PAH 症状 [32]。也有研究报道 MCT 诱导的 PAH 大鼠或狗的动物模型中肺的 TNF α 表达水平显著升高 [33]，

34]。Liam A. Hurst 等人指出在 BMPR2 功能丧失的情况下, TNF α 可通过 c-SRC 家族成员和 NOTCH2/3 信号功能障碍刺激异常肺动脉平滑肌细胞增殖, 从而显著加剧 PAH 的发展[35]。在本研究中, 实验组 PAH 小鼠肺组织中 Tnf α 的 mRNA 表达显著升高与上述研究结果一致。此外, 我们还证实, 与对照组相比实验组 PAH 小鼠肺组织中 TNFSF10 的表达水平也明显升高。Toll 样受体 4 (TLR4) 是 HMGB1 的主要受体, 介导 HMGB1 在 PAH 中的促炎症作用[36]。已有研究表明, Tlr4 转基因敲除小鼠可能通过降低肺血管对慢性缺氧的炎症反应来保护小鼠免受 PAH 的损[37], 这与本研究中的生物信息学分析结果一致。BAX 属于 BCL2 蛋白家族, 其功能是凋亡激活因子。已有研究表明, 肺血管平滑肌细胞凋亡水平的降低可导致人类患者和实验性 PAH 啮齿动物模型中血管内膜厚度增加[38, 39]。热休克蛋白 HSP90AA1 在 PAH 患者的肺组织中差异表达, 参与气道炎症并影响支气管平滑肌的功能。这表明 HSP90AA1 可能是 PAH 治疗的潜在预后生物标志物和治疗靶点[40, 41]。在本研究中, Hsp90aa1 的 mRNA 水平在实验组 PAH 小鼠肺组织中的表达水平显著高于对照组, 这与前述报道的结果一致。此外, 凋亡受体的激活可触发外源性细胞凋亡。而 Fas 细胞表面凋亡受体是最具特征的凋亡受体, 在肺的肺泡和支气管上皮细胞、Clara 细胞、巨噬细胞和肌成纤维细胞中均有表达[42]。有报道称, 与对照组相比, PAH 患者中 Fas 细胞表面凋亡受体的表达显著升高[43], 这与我们在实验组 PAH 小鼠肺组织中发现的 Fas 的 mRNA 表达上调的结果一致。因此, 我们推测 Fas 细胞表面凋亡受体可促进 PAH 的坏死性凋亡并加重炎症反应, 从而加速 PAH 的进程。XIAP (X 连锁凋亡抑制蛋白) 是一种多功能蛋白, 在细胞凋亡、细胞分化和细胞骨架组织中起着至关重要的作用, 成为多种癌症治疗的潜在靶点。然而, XIAP 与 PAH 的关联尚未被阐明, 需要通过基础实验进一步验证。有趣的是, 我们研究中的小鼠实验表明 XIAP 与 PAH 没有显著相关性。因此, XIAP 与 PAH 的关联需要进一步通过基础实验来验证。值得注意的是, 生物信息学分析显示 HSP90AA1、FAS 和 TNFSF10 在 PAH 患者肺中下调, 但是 HSP90AA1、FAS 和 TNFSF10 的表达在缺氧诱导的 PAH 小鼠模型的肺中显著升高。尽管人与小鼠具有较高的基因同源性, 但小鼠实验结果与生物信息学分析结果不一致可能是由于物种不同所致。因此, 我们需要在未来进行更广泛的实验来验证以上结果。

虽然以前的研究已经报道了一些与 PAH 相关的枢纽基因和潜在的治疗靶点[44, 45], 但很少有研究通过生物信息学方法研究坏死性凋亡在 PAH 中的作用。由于坏死性凋亡在肺部疾病中的重要作用, 我们首次探索并鉴定了与坏死性凋亡相关的差异表达基因、枢纽基因和关键转录因子, 这有助于扩大我们对 PAH 的认识, 进一步揭示 PAH 的发病机制。尽管如此, 我们的研究仍有一些局限性。第一, PAH 患者和对照组的数量有限。第二, 不同坏死性凋亡相关基因在 PAH 细胞模型中的表达水平有待进一步验证。最后, 本研究仅基于生物信息学和依赖于公共数据库。因此, 不同坏死性凋亡相关基因的功能需要在细胞和分子水平上进一步验证。

5 结论

综上所述, 我们通过生物信息学分析确定了 PAH 中 16 个潜在的坏死性凋亡相关基因, 并进行了富集和蛋白-蛋白相互作用网络分析。我们获得了 7 个重要枢纽基因, 包括 BAX、XIAP、TLR4、TNF、HSP90AA1、FAS 和 TNFSF10, 它们可能通过调节坏死性凋亡影响 PAH 的发展。本研究为 PAH 的进一步机制研究提供了新的思路, 并发现了可能作为 PAH 的潜在治疗靶点的候选基因。

致谢

我们衷心感谢 GSE15197 数据集作者的贡献, 并感谢 334 个公共数据库, 包括 NCBI、KEGG、DAVID、STRING、GeneMANIA 和 TRRUST 提供开放获取。

参考文献

- [1] Rabinovitch, M., *Molecular pathogenesis of pulmonary arterial hypertension*. J Clin Invest, 2008. 118(7): p. 2372-9.
- [2] Southgate, L., et al., *Molecular genetic framework underlying pulmonary arterial hypertension*. Nat Rev Cardiol, 2020. 17(2): p. 85-95.
- [3] Tudor, R. M., *Pathology of pulmonary arterial hypertension*. Semin Respir Crit Care Med, 2009. 30(4): p. 376-85.
- [4] Lau, E. M. T., et al., *Epidemiology and treatment of pulmonary arterial hypertension*. Nat Rev Cardiol, 2017. 14(10): p. 603-614.

- [5] Elinoff, J. M., et al., *Challenges in Pulmonary Hypertension: Controversies in Treating the Tip of the Iceberg. A Joint National Institutes of Health Clinical Center and Pulmonary Hypertension Association Symposium Report.* Am J Respir Crit Care Med, 2018. 198(2): p. 166-174.
- [6] Pasparakis, M. and P. Vandebaele, *Necroptosis and its role in inflammation.* Nature, 2015. 517(7534): p. 311-20.
- [7] Vercammen, D., et al., *Inhibition of caspases increases the sensitivity of L929 cells to necrosis mediated by tumor necrosis factor.* J Exp Med, 1998. 187(9): p. 1477-85.
- [8] Wang, Y., et al., *Necroptosis Mediates Cigarette Smoke-Induced Inflammatory Responses in Macrophages.* Int J Chron Obstruct Pulmon Dis, 2020. 15: p. 1093-1101.
- [9] Lee, J. M., et al., *Involvement of Alveolar Epithelial Cell Necroptosis in Idiopathic Pulmonary Fibrosis Pathogenesis.* Am J Respir Cell Mol Biol, 2018. 59(2): p. 215-224.
- [10] Kim, J., et al., *Prognostic Significance of CHIP and RIPK3 in Non-Small Cell Lung Cancer.* Cancers (Basel), 2020. 12(6).
- [11] Xiao, G., et al., *Transcriptomic analysis identifies Toll-like and Nod-like pathways and necroptosis in pulmonary arterial hypertension.* J Cell Mol Med, 2020. 24(19): p. 11409-11421.
- [12] Galluzzi, L., et al., *Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018.* Cell Death Differ, 2018. 25(3): p. 486-541.
- [13] Linkermann, A. and D. R. Green, *Necroptosis.* N Engl J Med, 2014. 370(5): p. 455-65.
- [14] Zemskova, M., et al., *Necrosis-Released HMGB1 (High Mobility Group Box 1) in the Progressive Pulmonary Arterial Hypertension Associated With Male Sex.* Hypertension, 2020. 76(6): p. 1787-1799.
- [15] Edgar, R., M. Domrachev, and A. E. Lash, *Gene Expression Omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository.* Nucleic Acids Res, 2002. 30(1): p. 207-10.
- [16] Barrett, T., et al., *NCBI GEO: archive for functional genomics data sets--update.* Nucleic Acids Res, 2013. 41(Database issue): p. D991-5.
- [17] Bindea, G., et al., *ClueGO: a Cytoscape plug-in to decipher functionally grouped gene ontology and pathway annotation networks.* Bioinformatics, 2009. 25(8): p. 1091-3.
- [18] Han, H., et al., *TRRUST v2: an expanded reference database of human and mouse transcriptional regulatory interactions.* Nucleic Acids Res, 2018. 46(D1): p. D380-d386.
- [19] Luedde, M., et al., *RIP3, a kinase promoting necroptotic cell death, mediates adverse remodelling after myocardial infarction.* Cardiovasc Res, 2014. 103(2): p. 206-16.
- [20] Lichý, M., et al., *Different signalling in infarcted and non-infarcted areas of rat failing hearts: A role of necroptosis and inflammation.* J Cell Mol Med, 2019. 23(9): p. 6429-6441.
- [21] Koudstaal, S., et al., *Necrostatin-1 alleviates reperfusion injury following acute myocardial infarction in pigs.* Eur J Clin Invest, 2015. 45(2): p. 150-9.
- [22] Corsetti, G., et al., *Autophagy and Oncosis/Necroptosis Are Enhanced in Cardiomyocytes from Heart Failure Patients.* Med Sci Monit Basic Res, 2019. 25: p. 33-44.
- [23] Karki, R., et al., *Synergism of TNF- α and IFN- γ Triggers Inflammatory Cell Death, Tissue Damage, and Mortality in SARS-CoV-2 Infection and Cytokine Shock Syndromes.* Cell, 2021. 184(1): p. 149-168.e17.
- [24] Tuder, R. M., et al., *Development and pathology of pulmonary hypertension.* J Am Coll Cardiol, 2009. 54(1 Suppl): p. S3-s9.
- [25] Schermuly, R. T., et al., *Mechanisms of disease: pulmonary arterial hypertension.* Nat Rev Cardiol, 2011. 8(8): p. 443-55.
- [26] Garg, U. C. and A. Hassid, *Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells.* J Clin Invest, 1989. 83(5): p. 1774-7.
- [27] Sarkar, R., et al., *Nitric oxide reversibly inhibits the migration of cultured vascular smooth muscle cells.* Circ Res, 1996. 78(2): p. 225-30.
- [28] Thomae, K. R., et al., *The effect of nitric oxide on fetal pulmonary artery smooth muscle growth.* J Surg Res, 1995. 59(3): p. 337-43.
- [29] Tonelli, A. R., et al., *Nitric oxide deficiency in pulmonary hypertension: Pathobiology and implications for therapy.* Pulm Circ, 2013. 3(1): p. 20-30.
- [30] Huertas, A., et al., *Immune dysregulation and endothelial dysfunction in pulmonary arterial hypertension: a complex interplay.* Circulation, 2014. 129(12): p. 1332-40.
- [31] Ricard, N., et al., *Increased pericyte coverage mediated by endothelial-derived fibroblast growth factor-2 and interleukin-6 is a source of smooth muscle-like cells in pulmonary hypertension.* Circulation, 2014. 129(15): p. 1586-97.
- [32] Fujita, M., et al., *Overexpression of tumor necrosis factor-alpha produces an increase in lung volumes and pulmonary hypertension.* Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2001. 280(1): p. L39-49.
- [33] Chen, D., et al., *Atorvastatin prevents dehydromonocrotaline-induced pulmonary hypertension in beagles.* Exp Lung Res, 2012. 38(7): p. 333-43.

- [34] Li, X. Q., et al., *Fluoxetine inhibited extracellular matrix of pulmonary artery and inflammation of lungs in monocrotaline-treated rats*. Acta Pharmacol Sin, 2011. 32(2): p. 217-22.
- [35] Hurst, L. A., et al., *TNF α drives pulmonary arterial hypertension by suppressing the BMP type-II receptor and altering NOTCH signalling*. Nat Commun, 2017. 8: p. 14079.
- [36] Yang, H., et al., *A critical cysteine is required for HMGB1 binding to Toll-like receptor 4 and activation of macrophage cytokine release*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. 107(26): p. 11942-7.
- [37] Young, K. C., et al., *Toll-like receptor 4-deficient mice are resistant to chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension*. Exp Lung Res, 2010. 36(2): p. 111-9.
- [38] Chen, J., et al., *Reoxygenation Reverses Hypoxic Pulmonary Arterial Remodeling by Inducing Smooth Muscle Cell Apoptosis via Reactive Oxygen Species-Mediated Mitochondrial Dysfunction*. J Am Heart Assoc, 2017. 6(6).
- [39] Huang, X., et al., *Salidroside attenuates chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension via adenosine A2a receptor related mitochondria-dependent apoptosis pathway*. J Mol Cell Cardiol, 2015. 82: p. 153-66.
- [40] Deng, Y. X., et al., *Active ingredients targeting Nrf2 in the Mongolian medicine Qiwei Putao powder: Systematic pharmacological prediction and validation for chronic obstructive pulmonary disease treatment*. J Ethnopharmacol, 2021. 265: p. 113385.
- [41] Yao, X., et al., *Molecular Characterization and Elucidation of Pathways to Identify Novel Therapeutic Targets in Pulmonary Arterial Hypertension*. Front Physiol, 2021. 12: p. 694702.
- [42] Lu, Q., E. O. Harrington, and S. Rounds, *Apoptosis and lung injury*. Keio J Med, 2005. 54(4): p. 184-9.
- [43] van der Bruggen, C. E., et al., *Bone Morphogenetic Protein Receptor Type 2 Mutation in Pulmonary Arterial Hypertension: A View on the Right Ventricle*. Circulation, 2016. 133(18): p. 1747-60.
- [44] Li, A., et al., *Integrated Bioinformatics Analysis Reveals Marker Genes and Potential Therapeutic Targets for Pulmonary Arterial Hypertension*. Genes (Basel), 2021. 12(9).
- [45] Zeng, H., X. Liu, and Y. Zhang, *Identification of Potential Biomarkers and Immune Infiltration Characteristics in Idiopathic Pulmonary Arterial Hypertension Using Bioinformatics Analysis*. Front Cardiovasc Med, 2021. 8: p. 624714.