

• 论 著 •

狼疮性肾炎患者肾组织差异表达基因筛选及功能分析*

郭文涛¹, 刘瑛琦², 王 希¹, 郜赵伟¹, 李锐成^{1△}

1. 空军军医大学第二附属医院检验科, 陕西西安 710038; 2. 空军军医大学
基础医学院四大队, 陕西西安 710038

摘要:目的 筛选狼疮性肾炎(LN)患者肾组织中差异表达基因(DEGs)并对其进行功能分析。
方法 GSE32591 和 GSE112943 数据集分别包括 LN 肾小管间质、LN 肾小球、LN 肾组织及其各自的正常对照组织的转录组数据; GSE81622 包含 LN 患者及健康对照者外周血单个核细胞(PBMC)转录组数据。利用 GEO2R 在线分析工具筛选 DEGs。利用 DAVID 对筛选的 DEGs 进行基因本体(GO)和京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析。利用 STRING 数据库进行蛋白互作网络(PPI)分析, 并筛选核心 DEGs。分析 LN 肾组织中核心 DEGs 在 LN 患者 PBMC 中的表达变化情况。**结果** LN 肾组织中共筛选出 37 个表达上调基因和 8 个表达下调基因。GO 分析显示, DEGs 主要参与和病毒防御相关的生物过程, 如病毒的响应、I 型干扰素信号通路等, 分子功能包括 RNA 结合、GTP 结合及解旋酶活性等。KEGG 通路分析显示 DEGs 主要参与病毒感染相关通路。PPI 分析筛选出 12 个核心 DEGs: EGR1、FOSB、IFI27、IFI6、IFIT2、IFIT3、IFITM1、IFITM3、MX1、MX2、OAS1、XAF1, 其中除 EGR1 表达下调外($P<0.01$), 其余 DEGs 均表达升高($P<0.01$)。然而, 在 LN 的 PBMC 中, EGR1 表达上调($P<0.01$), FOSB 和 IFITM1 的表达变化差异无统计学意义($P>0.05$), 其他 9 个核心 DEGs 表达上调($P<0.01$), 与在 LN 肾组织中变化一致。**结论** LN 患者肾组织中关键 DEGs 主要与干扰素信号通路相关。

关键词:狼疮性肾炎; 差异表达基因; 生物信息
DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2024.05.007 **中图法分类号:**R34;R593.24+2
文章编号:1673-4130(2024)05-0544-05 **文献标志码:**A

Screening and functional analysis of differentially expressed genes in renal tissues of patients with lupus nephritis*

GUO Wentao¹, LIU Yingqi², WANG Xi¹, GAO ZhaoWei¹, LI Ruicheng^{1△}

1. Department of Clinical Laboratory, the Second Affiliated Hospital of Air Force Medical University, Xi'an, Shaanxi 710038, China; 2. No. 4 Company, School of Basic Medical Sciences, Air Force Medical University, Xi'an, Shaanxi 710038, China

Abstract: Objective To screen differentially expressed genes (DEGs) in renal tissues of patients with lupus nephritis (LN) and to analyze their functions. **Methods** The GSE32591 and GSE112943 datasets included the transcriptome data of LN tubulointerstitium, LN glomerulus, LN renal tissues and their normal control tissues, respectively. GSE81622 included the transcriptome data of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from LN patients and healthy controls. DEGs were screened using online analysis tool GEO2R. DAVID was used to perform Gene ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment analysis of the selected DEGs. Protein-protein interaction network (PPI) analysis was performed using STRING database, and the core DEGs were screened. The expression changes of core DEGs in renal tissues of LN patients in PBMC were analyzed. **Results** A total of 37 up-regulated genes and 8 down-regulated genes were screened in LN renal tissues. GO analysis showed that DEGs were mainly involved in biological processes related to virus defense, such as virus response and type I interferon signaling pathway, and their molecular functions included RNA binding, GTP binding and helicase activity. KEGG pathway analysis showed that DEGs were mainly involved in viral infection-related pathways. PPI analysis identified 12 core

* 基金项目: 陕西省自然科学基金项目(2020JM-315); 唐都医院社会人才基金项目(2021LCYJ049)。
作者简介: 郭文涛, 男, 技师, 主要从事临床免疫学检验相关研究。 △ 通信作者, E-mail: lirc16@163.com。

DEGs: EGR1, FOSB, IFI27, IFI6, IFIT2, IFIT3, IFITM1, IFITM3, MX1, MX2, OAS1, XAF1, among which the expression of EGR1 was down-regulated ($P < 0.01$), and the expression of other DEGs was increased ($P < 0.01$). However, the expression of EGR1 was up-regulated in PBMC of LN ($P < 0.01$), and there was no significant difference in the expression of FOSB and IFITM1 ($P > 0.05$). The expression of other 9 core DEGs was up-regulated ($P < 0.01$), which was consistent with the changes in LN renal tissue. **Conclusion** The key DEGs in renal tissue of LN patients are mainly related to interferon signaling pathway.

Key words: lupus nephritis; differentially expressed genes; bioinformation

系统性红斑狼疮(SLE)是一种多发于中青年女性的自身免疫性疾病,可引起全身各系统各脏器的损伤。其中,SLE 所致肾脏受累,可引起狼疮性肾炎(LN),是 SLE 所引起的最常见器官损伤之一,可表现为血尿、蛋白尿、肾功能不全、免疫复合物沉积等^[1]。LN 所致的严重肾脏损伤是 SLE 患者的主要死亡原因之一。LN 的发病机制目前尚不清楚。本研究利用基因表达数据库(GEO),筛选 LN 患者肾脏组织中差异表达基因(DEGs),同时,关注 DEGs 在 LN 患者外周血单个核细胞(PBMC)中的表达情况,为探讨 LN 发病机制提供理论依据,并为 LN 发掘潜在的治疗靶点。

1 资料与方法

1.1 一般资料 GSE32591 数据集包括如下转录组信息:32 例 LN 肾小管间质和 15 例正常肾小管间质;32 例 LN 肾小球和 14 例正常肾小球;GSE112943 数据集包括 14 例 LN 肾组织和 7 例正常肾组织的转录组信息;GSE81622 数据集包括 15 例 LN 患者 PBMC 和 25 例健康对照 PBMC 的转录组信息。

1.2 方法

1.2.1 DEGs 筛选 利用 GEO2R 分析工具对数据集进行分析,筛选 LN 肾组织中的 DEGs($\log_2FC \geq 1$ 或 ≤ -1 且 $P < 0.01$),对 3 组 DEGs 取交集,得到共有的 DEGs。

1.2.2 基因本体(GO)功能注释和京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析 利用 DAVID 生物信息分析工具(version 6.8, <https://david.ncifcrf.gov/>)对 DEGs 进行 GO 注释和 KEGG 分析,利用 R 软件(version 4.0.2)制作气泡图对 GO 和 KEGG 分析结果进行可视化。

1.2.3 蛋白互作网络(PPI)分析 利用 STRING 在线数据库(<https://www.string-db.org/>)对 DEGs 编码蛋白进行 PPI 构建,筛选联合评分 > 0.9 的高置信度互作节点数据,互作类型或证据来源包括:实验验证、数据库、共表达、基因融合及共定位。利用 K-means 及 MCL 聚类进行 PPI 的 Clusters 分析,筛选核心 DEGs。分析核心 DEGs 在 LN 患者 PBMC 中的表达变化情况。

1.3 统计学处理 DEGs 利用 t 检验的 P 值和差异

倍数进行筛选,筛选标准: $|\log_2FC| \geq 1$ 及 $P < 0.01$ 。对 DEGs 进行 GO 及 KEGG 分析,双侧检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 DEGs 筛选结果 根据 DEGs 筛选标准,分别在 GSE10325 数据集的 LN 肾小管间质、肾小球及 GSE112943 数据集的 LN 肾组织中筛选到 124 345 和 8 633 个 DEGs。取交集后,共筛选到 45 个共有 DEGs,其中 37 个基因表达上调,8 个基因表达下调。见图 1。

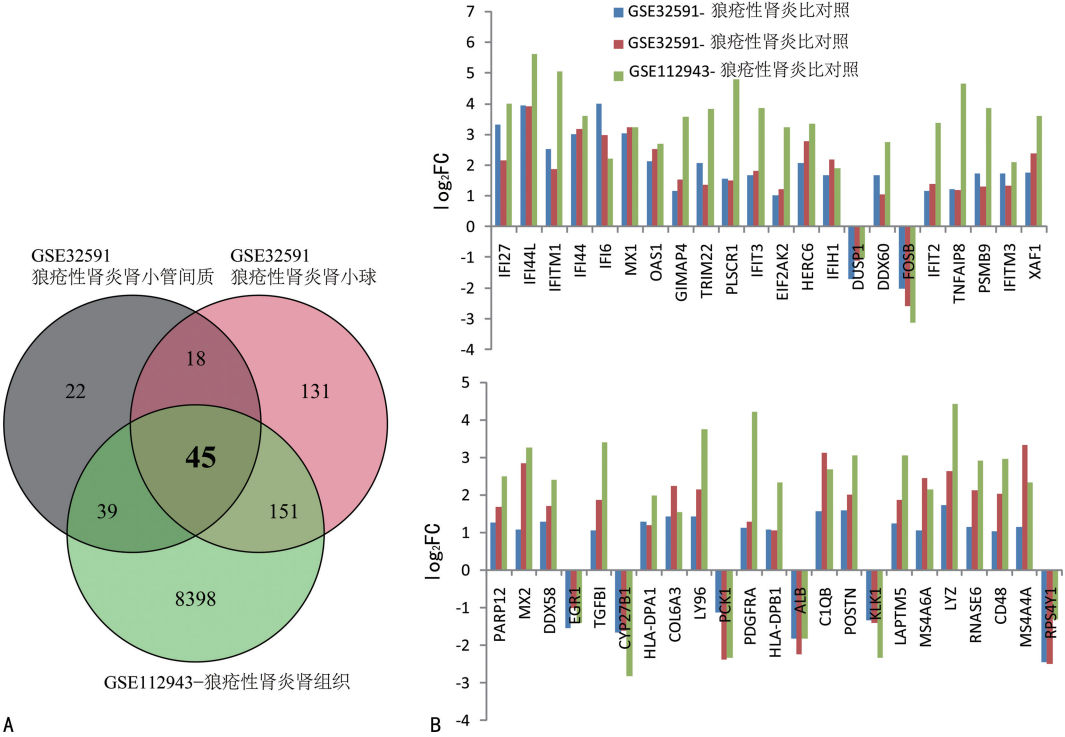
2.2 共有 DEGs 的功能分析 利用 DAVID 对 LN 肾组织中的 45 个 DEGs 进行 GO 和 KEGG 分析。GO 功能注释包括生物学过程(GO_BP)、细胞组成(GO_CC)及分子功能(GO_MF)。结果显示,上述 DEGs 主要参与对病毒的响应、I 型干扰素信号通路、病毒防御、病毒基因组复制负调控、干扰素响应、固有免疫响应等生物学过程;主要位于细胞质、溶酶体膜及细胞外基质;分子功能包括 RNA 结合、GTP 结合、解旋酶活性、MHC II 受体活性。KEGG 通路分析显示,上述 DEGs 主要参与的信号通路包括单纯疱疹病毒感染、麻疹病毒感染、EB 病毒感染、金黄色葡萄球菌感染等。见图 2。

2.3 DEGs 编码蛋白互作分析 通过 PPI 构建和聚类分析,构建 1 个核心 PPI 模块,共包含 12 个基因:早期生长反应蛋白 1(EGR1)、FosB 原癌基因(FOSB)、干扰素 α 诱导蛋白 27(IFI27)、干扰素 α 诱导蛋白 6(IFI6)、干扰素诱导的三角形四肽重复蛋白 2(IFIT2)、干扰素诱导的三角形四肽重复蛋白 3(IFIT3)、干扰素诱导的跨膜蛋白 1(IFITM1)、干扰素诱导的跨膜蛋白 3(IFITM3)、干扰素诱导的 GTP 结合蛋白 Mx1(MX1)、干扰素诱导的 GTP 结合蛋白 Mx2(MX2)、2'5'寡核苷酸合成酶 1(OAS1)、XIAP 相关因子 1(XAF1)。在 12 个核心 DEGs 中,除 FOSB 仅与 EGR1 发生关联外,其余 11 个基因均相互关联。见图 3。

2.4 PPI 核心 DEGs 在 LN 患者 PBMC 中的表达分析 利用 GSE81622 数据集,对 12 个关键 DEGs 在 LN 患者 PBMC 中的表达情况进行分析。与 LN 肾组织中的表达变化情况相一致的基因有 9 个:IFI27、

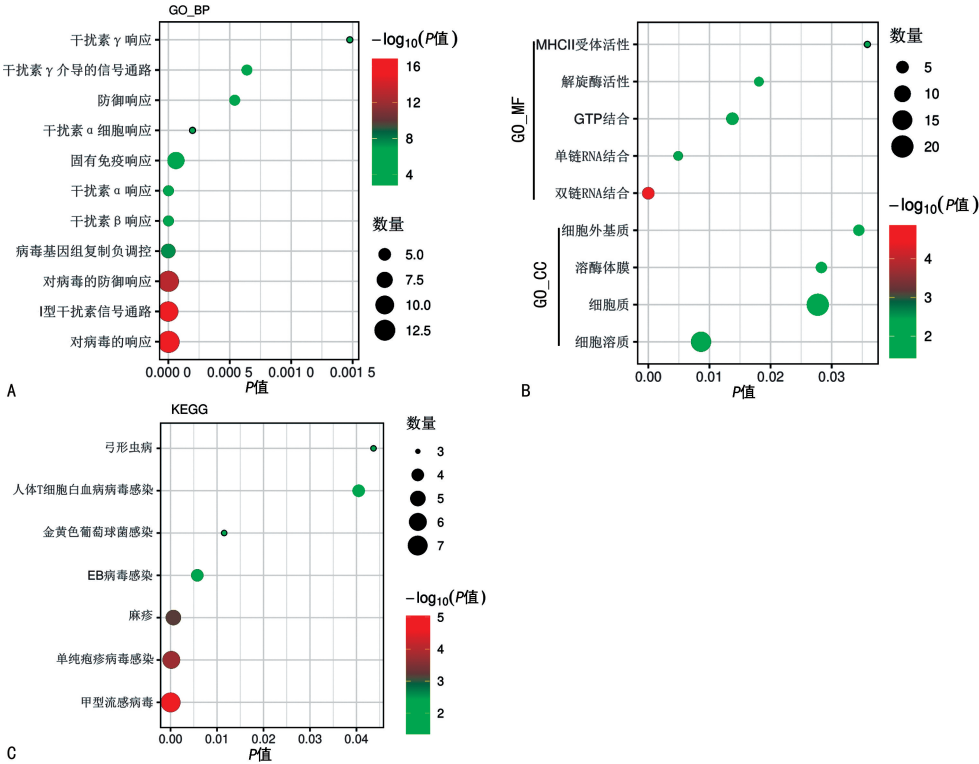
MX1、IFITM3、IFI6、IFIT3、IFIT2 在 LN 患者 PBMC 中表达显著上调($P<0.01$),而且上调倍数大于 2; MX2、OAS1、XAF1 在 PBMC 中表达上调($P<0.01$),上调倍数小于 2。此外,不一致的基因有 3 个:

IFITM1 和 FOSB 在 LN 患者 PBMC 中改变差异无统计学意义($P>0.05$),与 LN 肾组织中的表达变化不一致;EGR1 在 LN 患者 PBMC 中表达上调($P=0.024$),与 LN 肾组织中的表达变化情况相反。见表 1。



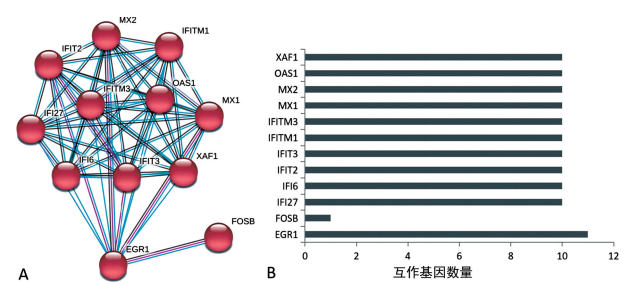
注:A 为 Venn 图显示 DEGs 数量;B 为 45 个共有 DEGs 在 3 组数据集的表达变化情况。

图 1 LN 数据集共有 DEGs 筛选



注:A 为 GO_BP 分析结果气泡图;B 为 GO_CC 及 GO_MF 分析结果气泡图;C 为 KEGG 分析气泡图。

图 2 LN 肾组织 DEGs 的功能分析



注:A为12个核心DEGs;B为核心DEGs的互作基因数量。
图3 LN肾组织DEGs的PPI分析

表1 LN肾组织中12个DEGs在PBMC中的表达变化分析					
基因	log ₂ FC	P	基因	log ₂ FC	P
IFI27	4.835	1.68×10 ⁻¹⁴	XAF1	0.753	0.003
MX1	1.342	2.46×10 ⁻⁸	IFIT3	1.122	0.003
IFITM3	1.572	2.20×10 ⁻⁷	IFIT2	1.017	0.005
IFI6	1.601	1.44×10 ⁻⁵	EGR1	0.907	0.024
MX2	0.797	4.56×10 ⁻⁵	IFITM1	0.275	0.137
OAS1	0.775	6.60×10 ⁻⁴	FOSB	-0.001	0.998

3 讨 论

利用基因表达公共数据库,是筛选疾病相关关键基因的重要手段。本研究利用包含LN肾组织及其正常对照组织转录组数据集,共获得了37个表达上调及8个表达下调DEGs。功能富集分析表明,45个DEGs主要与机体对病毒感染的响应及干扰素信号调控相关。进一步通过PPI分析获得12个核心DEGs,分别为:EGR1、FOSB、IFI27、IFI6、IFIT2、IFIT3、IFITM1、IFITM3、MX1、MX2、OAS1、XAF1。大多数DEGs均为干扰素信号通路相关基因。其中,EGR1在LN肾组织中表达下调,其余11个DEGs均表达上调。

LN是一种自身免疫性疾病,包括病毒感染在内的各种因素引起的免疫调节紊乱(促炎症免疫因素的过度产生和抑炎症免疫因素的抑制)。自身免疫反应和自身抗体的形成既是患者重要的临床特征,也是LN发生发展的重要驱动因素。TRIZZINO等^[2]最近的研究显示,EGR1能够抑制巨噬细胞中促炎症基因的表达,抑制发育中和成熟的巨噬细胞中的炎症增强子的功能,从而削弱其活性和免疫反应。因此,LN肾组织中EGR1表达水平的下调可能导致其对巨噬细胞促炎症反应抑制能力不足,导致过激炎症反应,促进LN发展。有研究报道了EGR1在SLE患者中表达上调^[3]。KOPEC等^[4]研究发现EGR1表达降低与自身免疫性肝病小鼠的肝纤维化损伤相关,提示EGR1在自身免疫病组织损伤过程中发挥重要作用。

FOSB是Fos基因家族成员之一,其编码蛋白是

转录因子复合体AP-1的组成部分,参与调控细胞的增殖及分化。FOSB在SLE中的研究鲜见报道。FOSB在LN肾组织中的表达升高提示LN肾组织中相关细胞的增殖发生异常,此外,LN患者PBMC中FOSB表达无变化。PPI分析显示,FOSB与EGR1之间存在互作,提示可能共同参与调控LN肾组织中的巨噬细胞增殖及活性。

XAF1是XIAP相关因子1,XIAP是X染色体连锁的凋亡抑制蛋白。目前的研究显示,XAF1在促进细胞凋亡过程中发挥重要作用^[5]。在正常情况下,机体内的凋亡细胞会被及时清除,然而,当清除机制发生异常时,凋亡细胞增多便会导致细胞内容物外泄产生自身抗原,从而引发自身免疫性炎症和产生自身抗体。有研究显示,SLE患者体内巨噬细胞对凋亡细胞的吞噬能力降低^[6-7]。因此,XAF1的促细胞凋亡作用,可能会导致自身抗原大量释放,促进自身免疫的发生发展。已有研究发现,XAF1在多种自身免疫性疾病患者中表达异常,包括干燥综合征^[8-9]和系统性硬化^[10]。XIANG等^[11]在盘状红斑狼疮患者中也发现了XAF1的表达变化,表明XAF1在SLE发生发展中作用关键。

干扰素是一类多功能的细胞因子,生物功能广泛,在天然免疫应答中发挥重要作用。IFN分为I、II和III型。干扰素与其受体结合后,可以诱导几百种基因的表达。本文筛选到的核心DEGsIFI27、IFI6、IFIT2、IFIT3、IFITM1、IFITM3、MX1、MX2、OAS1、XAF1均属于干扰素诱导基因,其在LN肾组织中表达水平均升高,并且其中绝大多数基因在LN的PBMC中表达也上调,表明IFN信号通路活性在LN患者中上调,在LN发生发展过程中具有关键作用。KHAMASHTA等^[12]通过随机双盲对照临床研究发现,抗IFN-α单抗Sifalimumab治疗可以明显缓解SLE患者的病情。最近,一种I型干扰素受体抗体药物-Saphnelo获FDA批准,用于治疗正接受标准治疗的中重度成人SLE患者^[13],临床研究数据显示,靶向封闭I型干扰素受体,Saphnelo明显降低SLE疾病活动度^[14-16],其常见不良反应之一即增加了患者带状疱疹感染的风险。由此可见,封闭IFN信号通路活性可能成为LN患者潜在的有效治疗手段,更好的靶点选择有利于增强疗效,降低不良反应。本文筛选的LN肾组织中表达上调的IFN信号相关基因为治疗靶点的选择提供参考。

本研究筛选了LN肾组织中12个关键表达差异基因,并对其功能进行了分析,为LN发生发展分子机制提供理论参考。需要注意的是,LN肾组织中DGEs的表达变化方向(上调/下调)与其在LN患者PBMC中的变化方向并不完全一致,表明LN病理组

织及其微环境与机体循环中的分子信号变化存在显著不同。下一步需要在相关的细胞及 SLE 动物模型中对上核心基因进行功能验证。

参考文献

[1] 王建,孙静静,李振军,等.狼疮性肾炎的临床病理特点及影响肾脏病理损害的危险因素分析[J].国际泌尿系统杂志,2020,40(4):672-675.

[2] TRIZZINO M,ZUCCO A,DELIARD S,et al. EGR1 is a gatekeeper of inflammatory enhancers in human macrophages[J]. Sci Adv,2021,7(3):eaaz8836.

[3] KUMAR S U,KUMAR D T,SIVA R,et al. Dysregulation of signaling pathways due to differentially expressed genes from the B-cell transcriptomes of systemic lupus erythematosus patients-a bioinformatics approach [J]. Front Bioeng Biotechnol,2020,8:276.

[4] KOPEC A K,SULLIVAN B P,KASSEL K M,et al. Toxicogenomic analysis reveals profibrogenic effects of trichloroethylene in autoimmune-mediated cholangitis in mice[J]. Toxicol Sci,2014,141(2):515-523.

[5] LEAMAN D W,CHAWLA-SARKAR M,VYAS K,et al. Identification of X-linked inhibitor of apoptosis-associated factor-1 as an interferon-stimulated gene that augments TRAIL Apo2L-induced apoptosis[J]. J Biol Chem,2002,277(32):28504-28511.

[6] GAIPL U S,MUNOZ L E,GROSSMAYER G,et al. Clearance deficiency and systemic lupus erythematosus (SLE)[J]. J Autoimmun,2007,28(2/3):114-121.

[7] TAS S W,QUARTIER P,BOTTO M,et al. Macrophages from patients with SLE and rheumatoid arthritis have defective adhesion in vitro, while only SLE macrophages have impaired uptake of apoptotic cells[J]. Ann Rheum Dis,2006,65(2):216-221.

[8] YAO Q M,SONG Z Y,WANG B,et al. Identifying key genes and functionally enriched pathways in Sjögren's syndrome by weighted gene co-expression network analy-

sis[J]. Front Genet,2019,10:1142.

[9] BRKIC Z,MARIA N I,VAN HELDEN-MEEUWSEN C G,et al. Prevalence of interferon type I signature in CD14 monocytes of patients with Sjogren's syndrome and association with disease activity and BAFF gene expression[J]. Ann Rheum Dis,2013,72(5):728-735.

[10] SERRANO-FERNÁNDEZ P,MÖLLER S,GOERTSCHES R,et al. Time course transcriptomics of IFNB1b drug therapy in multiple sclerosis [J]. Autoimmunity,2010,43(2):172-178.

[11] XIANG M,CHEN Q,FENG Y,et al. Bioinformatic analysis of key biomarkers and immune filtration of skin biopsy in discoid lupus erythematosus[J]. Lupus,2021,30(5):807-817.

[12] KHAMASHTA M,MERRILL J T,WERTH V P,et al. Sifalimumab,an anti-interferon-α monoclonal antibody,in moderate to severe systemic lupus erythematosus:a randomised, double-blind, placebo-controlled study[J]. Ann Rheum Dis,2016,75(11):1909-1916.

[13] DEEKS E D. Anifrolumab: first approval [J]. Drugs,2021,81(15):1795-1802.

[14] LEE Y H,SONG G G. Anifrolumab for the treatment of active systemic lupus erythematosus: a meta-analysis of randomized controlled trials [J]. Z Rheumatol,2021,80(10):988-994.

[15] CHATHAM W W,FURIE R,SAXENA A,et al. Long-term safety and efficacy of anifrolumab in adults with systemic lupus erythematosus: results of a phase II open-label extension study [J]. Arthritis Rheumatol,2021,73(5):816-825.

[16] MORAND E F,FURIE R,TANAKA Y,et al. Trial of anifrolumab in active systemic lupus erythematosus [J]. N Engl J Med,2020,382(3):211-221.

(收稿日期:2023-07-09 修回日期:2023-10-15)

(上接第 543 页)

[23] SAEZ-LARA M J,ROBLES-SANCHEZ C,RUIZ-OJEDA F J,et al. Effects of probiotics and synbiotics on obesity, insulin resistance syndrome, type 2 diabetes and non-alcoholic fatty liver disease:a review of human clinical trials[J]. Int J Mol Sci,2016,17(6):928.

[24] VITACOLONNA E,MASULLI M,PALMISANO L,et al. Inositols,probiotics, and gestational diabetes:clinical and epigenetic aspects[J]. Nutrients,2022,14(8):1543.

[25] CALLAWAY L K,MCINTYRE H D,BARRETT H L,et al. Probiotics for the prevention of gestational diabetes

mellitus in overweight and obese women: findings from the SPRING double-blind randomized controlled trial[J]. Diabetes Care,2019,42(3):364-371.

[26] SUN Z,SUN X,LI J,et al. Using probiotics for type 2 diabetes mellitus intervention:advances, questions, and potential[J]. Crit Rev Food Sci Nutr,2020,60(4):670-683.

[27] KIM Y A,KEOGH J B,CLIFTON P M. Probiotics, prebiotics, synbiotics and insulin sensitivity [J]. Nutr Res Rev,2018,31(1):35-51.

(收稿日期:2023-09-12 修回日期:2023-11-28)