

IGFBP6 在不稳定颈动脉斑块中的作用：生物信息学分析与实验验证

李玉岩¹, 梁莹莹², 周洁信¹, 车飞¹, 付金霞^{1*}

¹齐齐哈尔医学院附属第二医院神经内科, 黑龙江齐齐哈尔 161006; ²齐齐哈尔医学院附属第二医院心血管内科, 黑龙江齐齐哈尔 161006

[中图分类号] R543.3; R743.3 [文献标志码] A [DOI] 10.11855/j.issn.0577-7402.1011.2023.0912

[声明] 本文所有作者声明无利益冲突

[引用本文] 李玉岩, 梁莹莹, 周洁信, 等. IGFBP6 在不稳定颈动脉斑块中的作用: 生物信息学分析与实验验证[J]. 解放军医学杂志, 2024, 49(6): 701-710.

[收稿日期] 2022-04-30 [录用日期] 2022-07-15 [上线日期] 2023-09-12

[摘要] **目的** 探讨不稳定颈动脉粥样硬化斑块的差异表达基因(DEGs)及其分子相互作用。**方法** 从基因表达数据库(GEO)和欧洲生物信息学研究所数据库下载颈动脉斑块患者的基因表达数据集 GSE41571、GSE118481 和 E-MTAB-2055。采用基因本体生物学过程(GO-BP)富集分析、京都基因与基因组百科全书(KEGG)富集分析、蛋白-蛋白相互作用(PPI)网络、miRNAs/转录因子与靶基因的相互关系及药物-基因相互作用等方法, 分析至少两个数据集中不稳定颈动脉斑块的共调控 DEGs。采用定量实时 PCR(qRT-PCR)和酶联免疫吸附试验(ELISA)检测颈动脉粥样硬化斑块患者 58 例的颈动脉斑块和血浆中部分 DEGs 的表达水平。**结果** GO 富集分析显示, 不稳定颈动脉斑块的 DEGs 主要富集在与炎症反应相关的基因和细胞外基质结构基因; KEGG 富集分析显示, 不稳定颈动脉斑块中上调的 DEGs 富集于细胞外基质受体相互作用、PI3K-Akt、Hippo 信号通路及转化生长因子- β (TGF- β)信号通路, 下调的 DEGs 主要富集于溶酶体、吞噬体及趋化因子过程。PPI 网络分析结果显示, COL1A2、COL4A2、胰岛素样生长因子结合蛋白 6(IGFBP6)、COL4A5、C1QA、CXCL10、CXCL2、CXCR4 和 CSF1R 等可能在 PPI 网络中起重要作用。药物-基因相互作用的预测显示, CSF1R 的药物相互作用最多, CXCL2 受药物拮抗程度最高, IGFBP6 受药物激活程度最高。qRT-PCR 检测结果显示, 与稳定斑块组比较, 不稳定斑块组 IGFBP6 表达水平明显降低($P < 0.001$)。ELISA 法检测结果显示, 不稳定斑块组血浆 IGFBP6 浓度明显低于稳定斑块组($P < 0.0001$)。受试者工作特征曲线分析结果显示, 采用血浆 IGFBP6 水平鉴别不稳定斑块的曲线下面积为 0.894(95%CI 0.810~0.977), 截断值为 142.08 ng/ml。**结论** IGFBP6 可能成为预测不稳定颈动脉斑块的重要生物标志物。

[关键词] 动脉粥样硬化; 卒中; 生物信息学; 胰岛素样生长因子结合蛋白 6

Effect of IGFBP6 in unstable carotid atherosclerotic plaque: bioinformatics analysis and experimental validation

Li Yu-Yan¹, Liang Ying-Ying², Zhou Jie-Xin¹, Che Fei¹, Fu Jin-Xia^{1*}

¹Department of Neurology, ²Department of Cardiovascular Medicine, the Second Affiliated Hospital of Qiqihar Medical University, Qiqihar, Heilongjiang 161006, China

*Corresponding author, E-mail: fujinxia1234@163.com

This work was supported by the Innovation Incentive Projects of Qiqihar Science and Technology Plan (CSFGG-2020148)

[Abstract] **Objective** To investigate the differentially expressed genes (DEGs) and their molecular interactions in unstable carotid atherosclerotic plaques. **Methods** Gene expression datasets related to carotid atherosclerotic plaques (GSE41571, GSE118481, and E-MTAB-2055) were downloaded from Gene Expression Omnibus (GEO) and European Bioinformatics Institute (EBI) ArrayExpress databases. The co-regulated DEGs in at least two datasets of unstable carotid plaques were merged and analyzed

[基金项目] 齐齐哈尔市科技计划创新激励项目(CSFGG-2020148)

[作者简介] 李玉岩, 主治医师, 主要从事神经病学方面的研究

[通信作者] 付金霞, E-mail: fujinxia1234@163.com

using Gene Ontology Biological Process (GO-BP), Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG), Protein-Protein Interaction (PPI) Networks and subnetwork analysis, relationships between miRNAs/transcription factors and target genes, and drug-gene interaction database. Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) were used to detect the expression levels of some DEGs in carotid plaques and plasma from 58 patients with carotid atherosclerosis. **Results** GO enrichment analysis showed that DEGs in unstable carotid atherosclerotic plaques were mainly enriched in genes related to inflammatory response and extracellular matrix structure genes. KEGG enrichment analysis indicated that upregulated DEGs in unstable carotid plaques were enriched in extracellular matrix receptor (ECM-receptor) interaction, PI3K-Akt, Hippo and transforming growth factor- β (TGF- β) signaling pathways, while downregulated DEGs were primarily enriched in lysosomes, phagosomes, and chemokines processes. PPI network analysis suggested that COL1A2, COL4A2, insulin-like growth factor binding protein 6 (IGFBP6), COL4A5, C1QA, CXCL10, CXCL2, CXCR4, and CSF1R may play important roles in PPI networks. Prediction of drug-gene interactions revealed that CSF1R had the most drug interaction, CXCL2 was most antagonized by drugs, and IGFBP6 was most activated by drugs. qRT-PCR showed that the expression level of IGFBP6 in unstable carotid plaques group was significantly lower than that in stable carotid plaques group ($P < 0.001$). ELISA results showed that plasma concentration of IGFBP6 in unstable carotid plaques group was significantly lower than that in stable carotid plaques group ($P < 0.0001$). Receiver operating characteristic (ROC) suggested that the area under the curve (AUC) for plasma IGFBP6 levels to identify unstable plaques was 0.894 (95%CI 0.810-0.977), with a cutoff value of 142.08 ng/ml. **Conclusion** IGFBP6 may become an important biomarker for predicting unstable carotid atherosclerotic plaques.

[Key words] atherosclerosis; apoplexy; bioinformatics; insulin-like growth factor binding protein 6

在发达国家,卒中是导致死亡的第三大原因,也是致残的主要原因之一^[1]。颈动脉粥样硬化斑块是缺血性脑卒中的主要原因之一^[2]。晚期颈动脉粥样硬化可能发展为有破裂倾向的不稳定斑块,这是局部血栓或栓子的主要来源^[3]。预防不稳定斑块的形成对于卒中的预防非常重要^[4]。不稳定斑块具有明显的特征,如纤维帽含量减少、坏死核增加、斑块内出血等。纤维帽与坏死核之间的平衡可能被受损的愈合组织行为和加重的炎性免疫反应所干扰^[5]。有研究显示,诸多基因与不稳定斑块的形成有关,如YKL-40^[6]和干扰素调节因子基因^[7]。然而,目前尚缺乏对不稳定斑块形成的全面和多效性的理解。阐明与易损斑块形成相关的生物学过程和途径,有可能揭示预防卒中的药物靶点。本研究采用差异表达基因(differentially expressed genes, DEGs)筛选、基因本体生物学过程(gene ontology biological process, GO-BP)富集分析、京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)富集分析、蛋白-蛋白相互作用(protein-protein interaction, PPI)分析、转录因子(transcription factor, TF)/miRNA与DEG相互作用关系预测及药物-基因相互作用研究,分析颈动脉斑块患者的基因表达谱数据集,并利用在颈动脉内膜切除术中获得的人类颈动脉斑块验证PPI网络中共调节的DEGs和Hub基因,旨在探索预测不稳定斑块的基因标记,并作为抑制不稳定斑块形成的潜在靶点。

1 资料与方法

1.1 基因数据集选择 从基因表达数据库(GEO,

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GEO>)和欧洲生物信息学研究所(EBI, <https://www.EBI.ac.uk>)数据库下载颈动脉粥样硬化斑块患者基因的芯片数据集。芯片数据的纳入标准:(1)由过去10年发表的稳定和不稳定颈动脉斑块患者的基因表达谱组成;(2)稳定和不稳定斑块根据临床(有症状或无症状)或组织学标准定义^[8];(3)原始数据。排除动物样本、血清或血浆样本及糖尿病患者的数据集。

1.2 基因数据与预处理

1.2.1 数据源 GSE41571和GSE118481下载于GEO数据库, E-MTAB-2055下载于EBI数据库。GSE41571含有5个破裂的颈动脉斑块和6个稳定的颈动脉斑块,在GPL5175[HuEx-1_0-st]Affymetrix人外显子1.0ST阵列[transcript(gene)version]平台上进行检测。以A-MEXP-931-Illumina Affymetrix Human Exon 1.0 ST Array为平台,对E-MTAB-2055中25个破裂斑块和22个稳定斑块进行检测。GSE118481包括10个临床不稳定和6个稳定的颈动脉粥样硬化斑块,在GPL10558 Illumina Human HT-12 V4.0表达芯片平台上进行检测。3个数据集的图谱构建均得到了当地研究伦理委员会的授权。

1.2.2 数据预处理 基因数据集下载后,采用R包^[9]中的affy(版本1.50.0, <http://www.bioconductor.org/packages/release/bioc/html/affy.html>)和芯片数据线性模型(LIMMA)包^[10](版本3.10.3, <http://www.bioconductor.org/packages/2.9/bioc/html/LIMMA.html>)读取GSE41571的原始数据,用LIMMA软件包^[10]读取E-MTAB-2055和GSE118481。采用稳健多阵列平均值(robustmulti-arrayaverage, RMA)(背景校正,归一化

和表达计算)方法处理3个数据集,根据平台提供的注释模式对探针进行注释,放弃不匹配的探针,当多个探针匹配到一个基因符号时,该基因的最终表达定义为多个探针的平均值。

1.3 基因数据的生物信息学分析

1.3.1 共调节 DEGs 的筛选 使用 LIMMA 包(版本 3.30.3)确定 DEGs。对于芯片数据,采用经典贝叶斯方法建立线性模型。使用 Benjamini-Hochberg 方法调整 P 值,然后计算 P 值的错误发现率(FDR)。DEGs 定义为 $FDR < 0.05$ 、 $|\log_2$ 倍数变化(FC)| > 0.585 的基因。共调节 DEGs 是至少两个数据集的交集,用在线绘图工具 VENNY^[11](2.1.0 版, <http://bioinfo.gp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>)进行选择。

1.3.2 GO 和 KEGG 富集分析 通过在线工具数据库 Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery (DAVID)^[12](6.8 版, <https://david-d.ncicfcr.gov/>)进行共调节 DEGs 的 GO-BP^[13]和 KEGG^[14]富集分析。利用 Cytoscape[®]软件(3.2.0 版, <http://www.cytoscape.org/>)的 ClueGO 插件(2.2.6 版, <http://www.apps.cytoscape.org/>)^[15]可视化 GO-BP 和 KEGG 富集的上调和下调 DEGs, 阈值如下: 富集基因数 ≥ 2 和 $P < 0.05$ 。

1.3.3 PPI 网络分析 利用 Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins (STRING)(版本 10.0, <http://string-db.org/>)^[16]数据库预测共调节 DEGs 编码蛋白的 PPI, PPI 阈值 ≥ 0.7 (高置信度),利用 Cytoscape 软件构建 PPI 网络并进行可视化,选择连接度 > 12 的 Hub 基因进行实验验证。

1.3.4 子网模块分析 单个基因往往与其他基因相互作用,以利于它们发挥调控作用。来自同一模块的编码蛋白倾向于充当一个模块来完成相同的生物学角色和功能。Cytoscape 中的 multi-contrast delayed enhancement 插件^[17](版本 1.4.2, <http://apps.cytoscape.org/apps/mcode>)对阈值得分 > 5 的聚类较明显的 PPI 网络进行子网分析。采用 DAVID^[14]进行每个子网模块的 GO 和 KEGG 富集分析。

1.3.5 TF/miRNA 靶调控网络的预测 采用 Web-Gestalt^[18](<http://www.webgestalt.org/option.php>)预测 TFs 或 miRNAs, 通过过表达富集分析(<http://amp.pharm.mssm.edu/enrichr/>)预测 TF 或 miRNA 与显著聚类模块中所有靶向 DEGs 之间的相互作用关系(富集基因计数 ≥ 2 且 $P < 0.05$),利用 Cytoscape 软件构建 miRNAs 或 TFs 靶向调控网络并进行可视化。

1.3.6 药物-基因相互作用的预测 为了探索药物开发中优先靶向的基因,使用药物-基因相互作用数据库^[19](<http://www.dgidb.org/>)中潜在靶向于共调节 DEGs 和调控网络中的基因的药物,所有的药物-基因相互作用都被设定为“all default”,并使用

Cytoscape 软件构建药物-基因相互作用网络。

1.4 颈动脉粥样硬化斑块患者基因表达的实验验证

1.4.1 患者特征及样本采集 选择 2016 年 6 月—2018 年 6 月本院收治的颈动脉狭窄且接受颈动脉内膜剥脱术治疗的患者 58 例。术中获取动脉粥样硬化斑块及血浆,将完整的斑块切成两部分,一部分保存在 4% 多聚甲醛溶液中用于组织学和免疫组化检测,另一部分冷冻在液氮中提取 RNA。根据组织学标准将斑块分为稳定或不稳定斑块。组织学特征采用美国心脏协会的半定量分级标准进行分析。本研究通过齐齐哈尔医学院附属第二医院伦理委员会批准(编号: 2018LL-006),所有患者同意参加该研究。

1.4.2 定量实时 PCR(qRT-PCR) 用 Trizol(Qiagen, 德国)从 10~50 μg 菌斑中提取总 RNA,用 miScript 反转录试剂盒(Qiagen, 德国)反转录成 cDNA。用 miScript SYBR Green PCR 试剂盒(Qiagen, 德国)进行 qRT-PCR。用 RT-PCR 方法在 Light Cycler480 II (Roche Diagnostics Ltd, Rotkreuz, Switzerland)上检测基因表达,在 95 $^{\circ}\text{C}$ 下反应 10 min,然后分别在 95 $^{\circ}\text{C}$ 反应 10 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 反应 15 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 反应 20 s,共 40 个循环。基因表达归一化为参考基因(GAPDH)。用于实验验证的候选基因纳入标准:(1)在 PPI 网络中连接度 > 12 的 Hub 基因;(2)在 3 个数据集中均上调或下调的基因。排除标准:(1)候选基因与动脉粥样硬化的关联没有文献报道;(2)不稳定颈动脉斑块的生物标志物或重要靶点的基因。PCR 引物序列见表 1。

表 1 qRT-PCR 引物序列

Tab.1 Primer sequences for qRT-PCR

基因	引物序列(5'-3')
CSF1R	正义: GGGAAATCCCAGTGATAGAGCC
	反义: TTGGAAGGTAGCGTTGTTGGT
CXCL2	正义: CCAACCACCAGGCTACAGG
	反义: GCGTCACACTCAAGCTCTG
IGFBP6	正义: GAATCCTAAGGAGAGTAAACCCC
	反义: CTGGATTCTCTGTTGGTCTC
GAPDH	正义: TGCACCACCAACTGCTTAGC
	反义: GGCATGGACTGTGGTCATGAC

1.4.3 酶联免疫吸附试验(ELISA)检测血浆胰岛素样生长因子结合蛋白 6(insulin-like growth factor binding protein 6, IGFBP6)水平 采用 ELISA 试剂盒(Cloud Clone Corp., 美国)检测颈动脉粥样硬化患者血浆中 IGFBP6 水平。

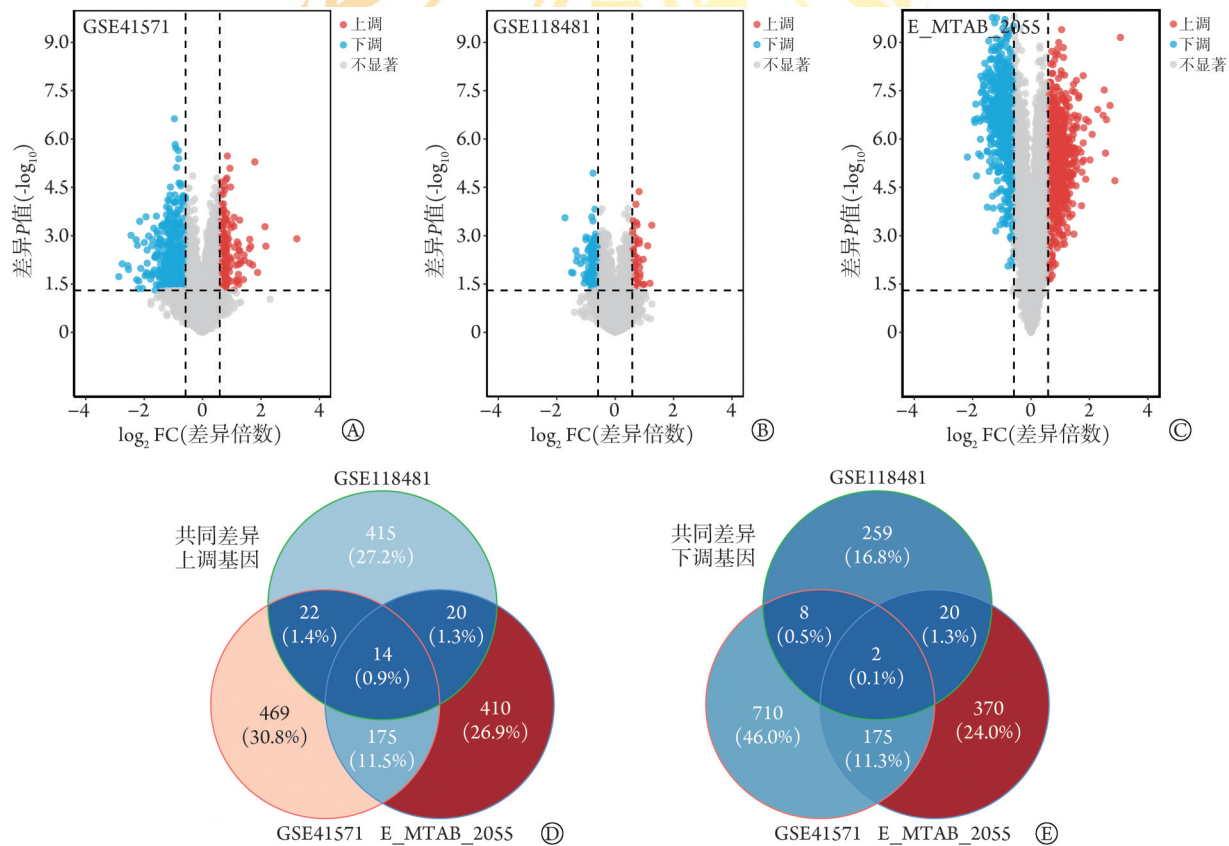
1.5 统计学处理 采用 SPSS 20.0 软件进行统计分析。Kolmogorov-Smirnov 正态性检验确定为正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。对稳定斑块与不稳定斑块的基因表达及 ELISA 检测结果比较采用 t 检验。两组人

口学和危险因素差异比较,分别对枚举数据和测量数据进行 χ^2 检验或不配对 t 检验。应用受试者工作特征(ROC)曲线分析IGFBP6及其相关指标预测不稳定斑块的敏感度和特异度。曲线下面积(AUC)以95%可信区间(CI)计算。根据约登指数确定最佳截断值。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 DEGs和共调节DEGs的鉴定 GSE41571中,在不稳定斑块中鉴定出DEGs 1575个,其中上调680个、下调895个。GSE118481中,共筛选到DEGs 760个,其中上调471个、下调289个。E-MTAB-2055数据集中,共鉴定出DEGs 1186个,其中上调619个、下调567个。在3个数据集中,获得共同差异上调基因14个,共同差异下调基因2个(图1)。

2.2 GO-BP和KEGG富集分析结果 考虑到3个数据集差异基因交集较少,本研究选择数据集两两交集的综合,汇总为共同DEGs 231个和下调DEGs 205个,并进行GO和KEGG富集分析。选取前10条路径,采用气泡图显示GO富集分析结果。GO分子功能(molecular function, MF)分析显示,共上调的DEGs主要富集在细胞外基质结构成分、糖胺聚糖结合、含硫化合物结合等功能过程;共下调的DEGs主要富集于趋化因子活性及免疫球蛋白结合等通路。选取前20条路径,采用气泡图显示KEGG富集分析结果。KEGG富集分析结果显示,共上调的DEGs富集于ECM受体相互作用、PI3K-Akt信号通路、Hippo信号通路及转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)信号通路;共下调的DEGs主要富集于溶酶体、吞噬体以及趋化因子信号通路(图2)。



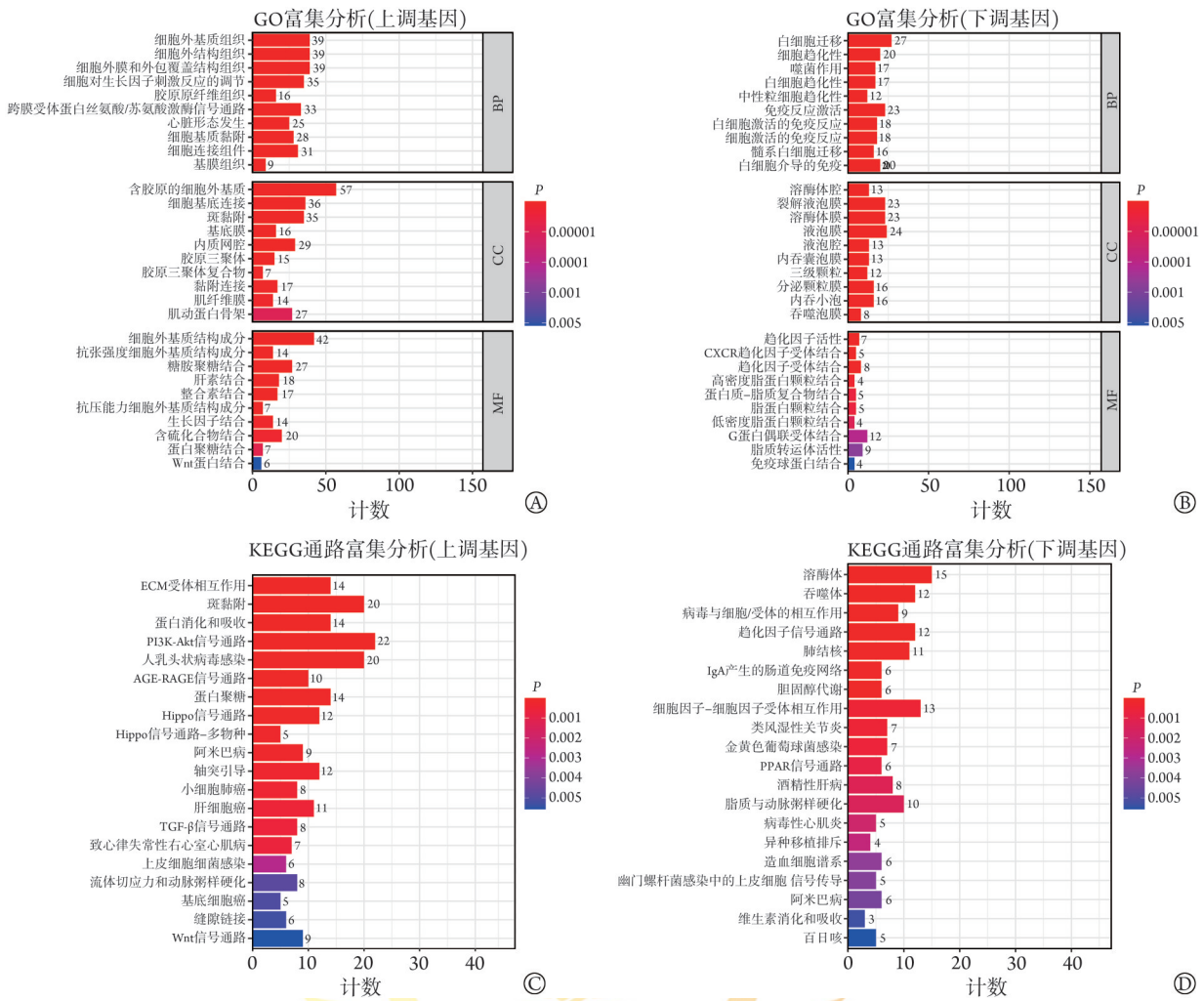
DEGs, 差异表达基因; A. 与GSE41571数据集中稳定斑块比较,在不稳定斑块中鉴定出DEGs 1519个,包括上调662个、下调857个; B. 在GSE118481数据集中筛选出DEGs 730个,其中上调458个、下调272个; C. 在E-MTAB-2055数据集中鉴定出DEGs 1130个,其中上调601个,下调529个; D. 合并3个数据集后,确定14个上调的DEGs; E. 合并3个数据集后,确定2个下调的DEGs

图1 在3个数据集中稳定与不稳定颈动脉粥样硬化斑块中上调和下调基因的火山图

Fig.1 Volcanic maps of up-regulation and down-regulation genes in stable and unstable carotid atherosclerotic plaques in three datasets

2.3 PPI网络分析结果 在PPI调控网络中共鉴定出189个节点和368个相互作用(图3)。此外, PPI网络进一步筛选出3个子网络模块,即模块A、B和C。模块A包含9个下调节点(如IGFBP6、COL1A2、COL4A2和COL4A5等);模块B包含8个上调节点

[如C1QA、CXCL1、CXCL2、CXCR4和集落刺激因子1受体(colony-stimulating factor 1 receptor, CSF1R)]等;模块C包含7个上调节点(如C1QA、CXCL10、CXCL2、CXCR4和CSF1R等)。3个模块中的基因及连通度见表2。此外,模块A中的节点富集于两条



GO. 基因本体论; KEGG. 京都基因和基因组百科全书; A—B. GO 富集分析; C—D. KEGG 通路富集分析; 单个点的大小代表富集程度; 颜色深度代表 P 值

图2 颈动脉粥样硬化斑块差异表达基因的功能富集分析结果

Fig.2 Functional enrichment analysis results of differentially expressed genes in carotid atherosclerotic plaque

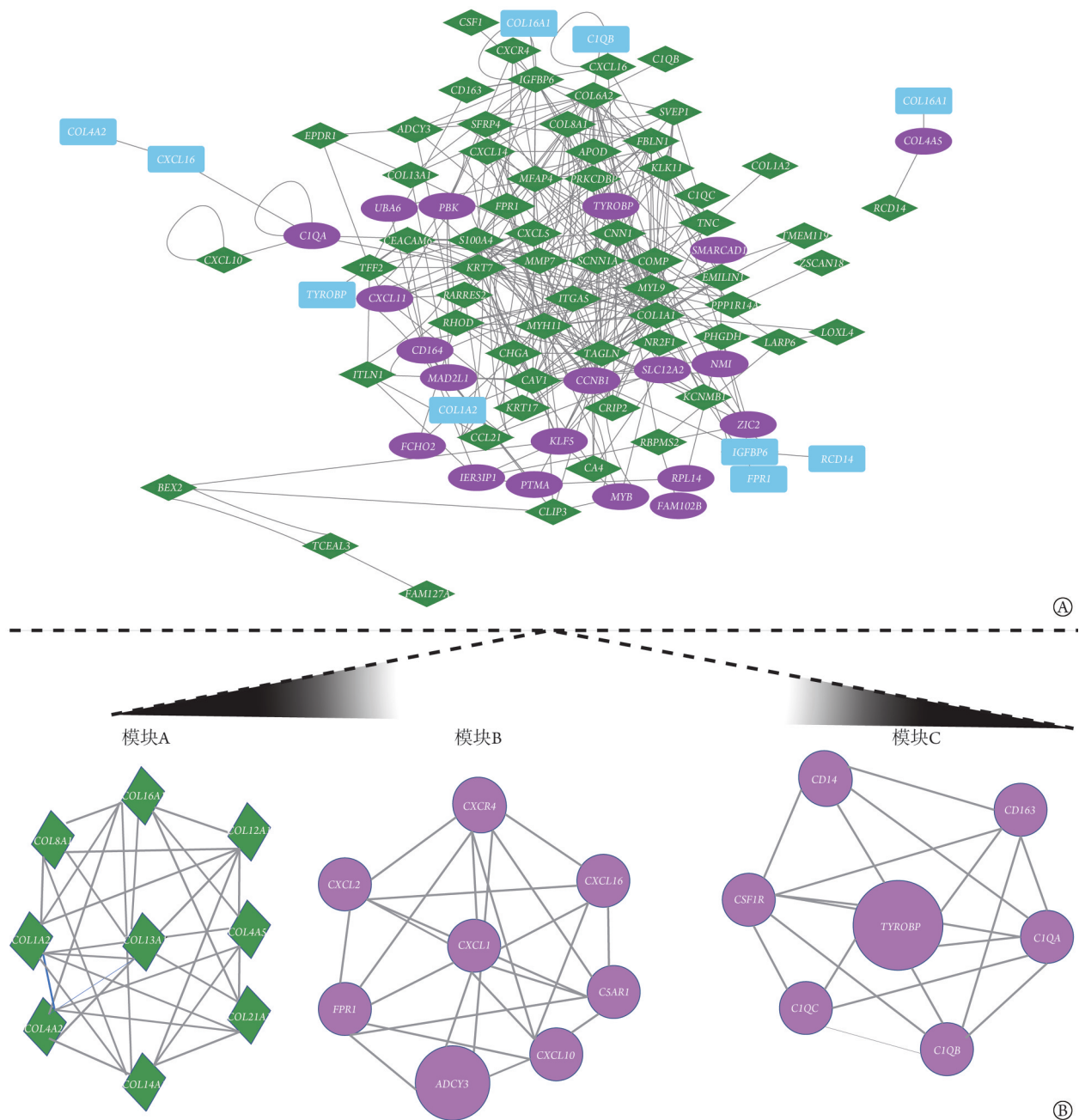
KEGG 通路(ECM-受体相互作用和黏着斑); 模块 B 中的节点富集于两条通路(趋化因子信号通路和细胞因子-细胞因子受体相互作用); 模块 C 中的节点富集于三条通路(防御素应激、炎症应激和经典补体激活通路, 表3)。

2.4 药物-基因相互作用的预测 通过Dgidb数据库鉴定出药物-基因相互作用对 103 对, 包括上调的靶基因 4 个、下调的靶基因 3 个和药物 96 种(图4)。在药物-基因相互作用网络中, CSF1R 受药物抑制程度最高, CXCL2 受药物拮抗程度最高, IGFBP6 受药物

表2 颈动脉粥样硬化斑块差异表达基因的蛋白-蛋白相互作用网络中的子网络

Tab.2 Subnetworks of PPI networks of differentially expressed genes in carotid atherosclerotic plaque

模块 A			模块 B			模块 C		
节点	描述	程度	节点	描述	程度	节点	描述	程度
COL1A2	下调	14	ADCY3	上调	12	TYROBP	上调	17
COL4A2	下调	12	CXCR4	上调	11	CSF1R	上调	10
COL4A5	下调	11	FPR1	上调	11	CD14	上调	9
IGFBP6	下调	11	CXCL10	上调	9	CD163	上调	7
COL16A1	下调	10	CXCL16	上调	8	C1QA	上调	7
COL13A1	下调	9	C1QA	上调	8	C1QB	上调	6
COL21A1	下调	8	CXCL2	上调	7	C1QC	上调	5
COL12A1	下调	7	CSF1R	上调	6			



紫色圆圈代表上调的差异表达基因，绿色菱形代表下调的差异表达基因；节点大小代表某种蛋白质的蛋白质-蛋白质相互作用对的数目；两个节点之间的连线表示两种蛋白质的相互作用；PPI: 蛋白-蛋白相互作用；A. PPI网络的构建；B. PPI子网络模块分析

图3 颈动脉粥样硬化斑块差异表达基因的PPI网络和子网络模块分析

Fig. 3 The analysis on PPI network and sub-network module of differentially expressed genes in carotid atherosclerotic plaque

激活程度最高。

2.5 候选基因在人不稳定颈动脉斑块和血浆中的表达水平 根据斑块的组织学状态，分为稳定斑块组30例和不稳定斑块组28例；两组患者的基线人口学特征、组织学指标及短暂性脑缺血发作、黑蒙和卒中发生率比较差异均无统计学意义($P>0.05$ ，表4)。

选择 *CSF1R*、*CXCL2* 和 *IGFBP6* 作为实验验证的候选基因。qRT-PCR 检测结果显示，与稳定斑块组比较，不稳定斑块组 *IGFBP6* 表达水平明显降低 ($P<0.001$)，*CSF1R*、*CXCL2* 表达水平差异均无统计

学意义($P>0.05$ ，图5)。

2.6 两组颈动脉粥样硬化斑块患者血浆 *IGFBP6* 水平比较 ELISA 法检测结果显示，不稳定斑块组血浆 *IGFBP6* 水平明显低于稳定斑块组 [(113 041±3710) pg/ml vs. (157 359±6152) pg/ml, $P<0.0001$ ，图 6A]。ROC 分析结果显示，采用血浆 *IGFBP6* 水平鉴别不稳定斑块的 AUC 为 0.894(95%CI 0.810~0.977)，最佳临界值为 142.08 ng/ml，敏感度为 1.000，特异度为 0.655(图 6B)。

表3 颈动脉粥样硬化斑块PPI子网络模块中差异表达基因的KEGG和GO-BP富集分析(前5位)

Tab.3 KEGG and Go-BP enrichment analysis of differentially expressed genes in PPI network module in carotid atherosclerotic plaque (top 5)

项目	模块	KEGG通路/BP-top 5	数量	P
KEGG	模块A	hsa04512: ECM—受体相互作用	3	1.59E-02
		hsa04510: 黏着斑	2	4.06E-02
	模块B	hsa04062: 趋化因子信号通路	7	1.42E-05
		hsa04060: 细胞因子—细胞因子受体相互作用	4	3.31E-05
	模块C	hsa05020: 朊病毒疾病	3	4.54E-04
		hsa04610: 补体和凝血级联	3	1.77E-03
BP	模块A	GO: 0007155—细胞黏附	7	6.16E-07
		GO: 0022610—生物黏附	6	8.72E-07
		GO: 0030198—细胞外基质组织	5	2.32E-06
		GO: 0043062—细胞外结构组织	4	6.04E-05
		GO: 0030199—胶原纤维组织	3	8.31E-04
		GO: 0006952—反射反应	8	2.62E-10
	模块B	GO: 0006954—炎症反应	7	2.46E-10
		GO: 0002526—急性炎症反应	7	3.52E-09
		GO: 0009611—伤人反应	6	2.23E-08
		GO: 0006958—补体激活, 经典途径	9	4.82E-07
		GO: 0006952—防御反应	6	1.10E-06
		GO: 0006954—炎症反应	5	4.72E-06
	模块C	GO: 0002526—急性炎症反应	4	7.26E-06
		GO: 0009611—对伤害的反应	5	3.28E-05
		GO: 0006958—补体激活, 经典途径	3	6.62E-05

KEGG. 京都基因和基因组百科全书; GO. 基因本体论; BP. 生物学过程

表4 两组颈动脉粥样硬化斑块患者基线特征比较

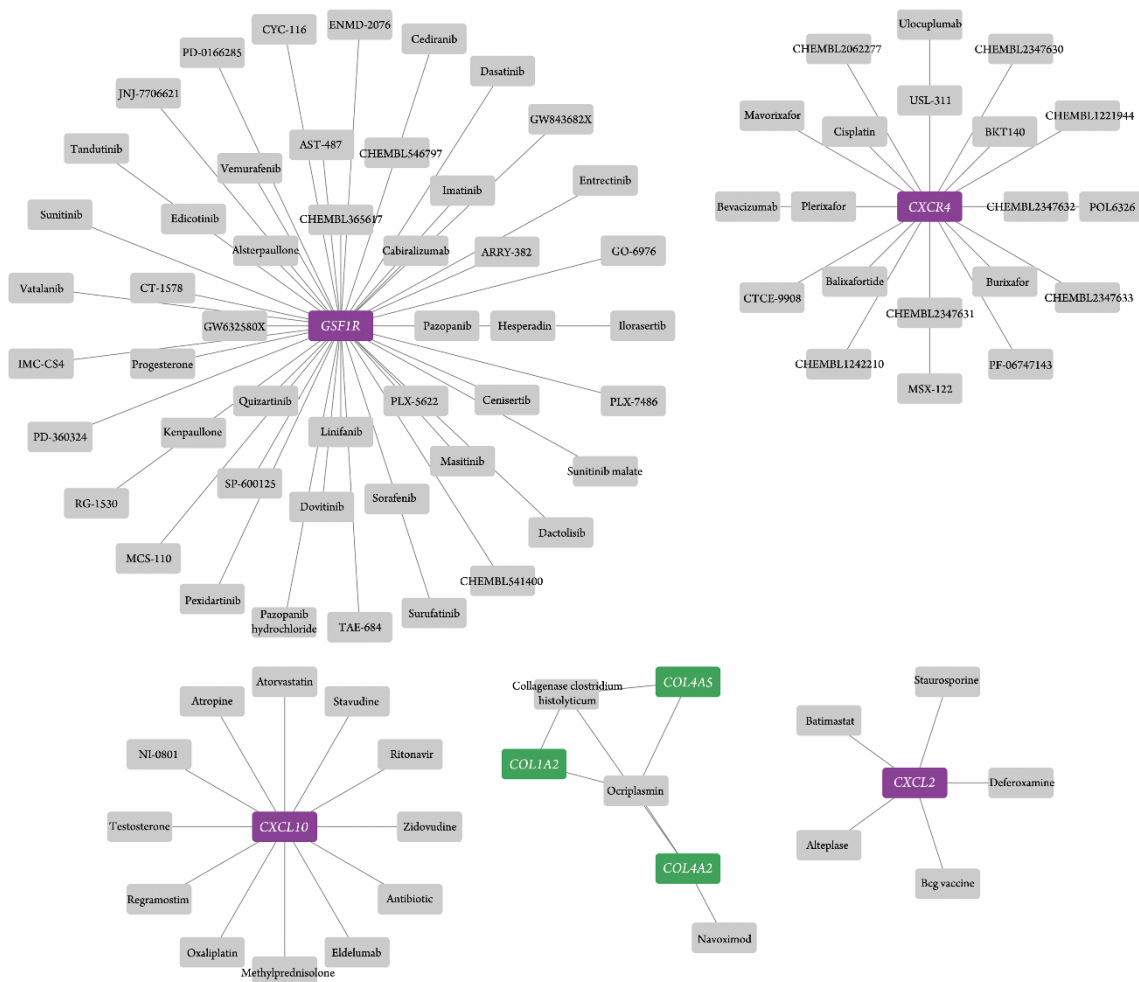
Tab.4 Comparison of baseline data of two groups of the patients with carotid atherosclerotic plaque

临床特征	稳定斑块组 (n=30)	不稳定斑块组 (n=28)
年龄(岁, $\bar{x}\pm s$)	66.8±2.1	67.3±1.9
男[例(%)]	25(83.3)	23(82.1)
吸烟[例(%)]	17(56.7)	15(53.6)
高血压病[例(%)]	15(50.0)	13(46.4)
糖尿病[例(%)]	6(20.0)	9(32.1)
卒中[例(%)]	9(30.0)	8(28.6)
冠心病[例(%)]	5(16.7)	4(14.3)
短暂性脑缺血发作[例(%)]	6(20.0)	5(17.9)
阿司匹林治疗[例(%)]	13(43.3)	10(35.7)
他汀类治疗[例(%)]	11(36.7)	11(39.3)
氯吡格雷治疗[例(%)]	3(10.0)	2(7.1)
Beta受体阻断剂治疗[例(%)]	3(10.0)	4(14.3)
钙通道阻滞剂治疗[例(%)]	10(33.3)	9(32.1)
体重(kg, $\bar{x}\pm s$)	71.5±2.2	72.1±1.9
肌酐($\mu\text{mol/L}$, $\bar{x}\pm s$)	79.1±3.2	81.3±3.9
三酰甘油(mmol/L , $\bar{x}\pm s$)	1.5±0.2	1.7±0.3
总胆固醇(mmol/L , $\bar{x}\pm s$)	4.1±0.2	3.9±0.2
高密度脂蛋白胆固醇(mmol/L , $\bar{x}\pm s$)	1.10±0.03	1.10±0.02
低密度脂蛋白胆固醇(mmol/L , $\bar{x}\pm s$)	2.4±0.1	2.2±0.1

3 讨论

颈动脉粥样硬化是脑卒中的主要病理基础。动脉粥样硬化斑块破裂形成的栓子是脑血管闭塞的主要原因。卒中可能是可预防的, 识别有卒中风险患者的生物标志物及动脉粥样硬化和不稳定斑块的可能治疗靶点, 对于预防脑血管和心血管不良事件至关重要^[20]。基因表达谱分析如芯片分析和RNA测序, 可用来探索DEG和参与动脉粥样硬化的分子机制。测序技术结合生物信息学分析, 可用来定义DEG和生物学过程及转录因子、微小RNA(microRNA, miRNA)和蛋白质的复杂相互作用的关系^[21]。Wang等^[22]通过生物信息学分析, 发现差异表达的Ⅲ型胶原 $\alpha 1$ 链(COL3A1)、I型胶原 $\alpha 2$ 链(COL1A2)、天冬氨酸(ASP)和前血小板基础蛋白可能在不稳定斑块的形成中起关键作用。一项基于显微射线的研究显示, 趋化因子(C-C基元)配体19[chemokine (C-C motif) ligand 19, CCL19]在不稳定颈动脉斑块中表达上调。

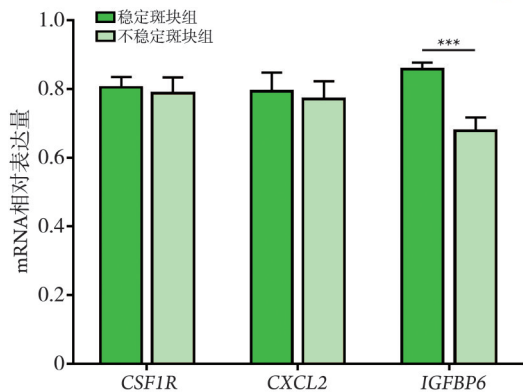
为了确定颈动脉粥样硬化潜在的生物标志物, 本研究利用多种生物信息学方法分析了来自GEO和EBI数据库的3个数据集(包括人类颈动脉粥样硬



紫色矩形表示上调的差异表达基因；绿色矩形表示下调的差异表达基因；灰色矩形表示药物

图4 颈动脉粥样硬化斑块差异基因的药物—基因相互作用网络

Fig.4 Drug-gene interaction network of differentially expressed genes in carotid atherosclerotic plaque



CSF1R. 集落刺激因子1受体基因；CXCL2. 趋化因子配体2基因；IGFBP6. 胰岛素样生长因子结合蛋白6基因；*** $P < 0.001$

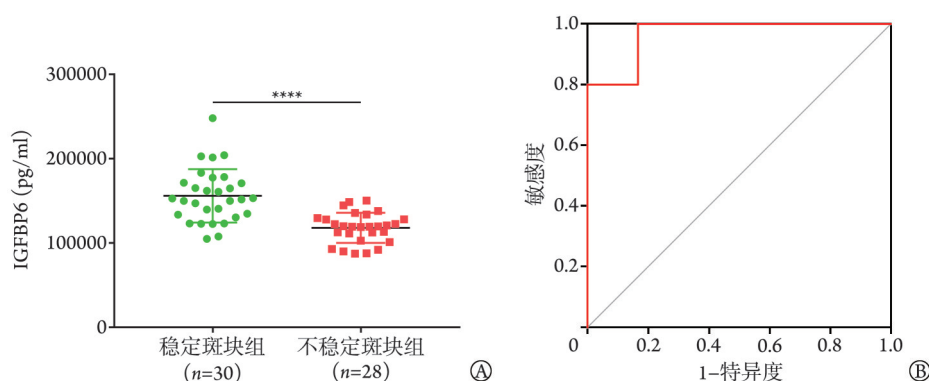
图5 两组颈动脉粥样硬化斑块中3个候选基因CSF1R、CXCL2和IGFBP6 mRNA表达水平

Fig.5 The mRNA expression of CSF1R, CXCL2, and IGFBP6 in two groups of patients with carotid atherosclerotic plaque

化不稳定斑块40例和稳定斑块34例)中的共调节DEGs。通过使用多数据集的合并分析，避免了单个数据集分析中存在的个体偏差。本研究通过排除标

准消除了部分因素的影响，如糖尿病、跨物种差异及非斑块样本，并通过检测颈动脉粥样硬化不稳定斑块的临床标本验证上述共调节DEGs。

本研究在不稳定斑块中鉴定出231个共上调基因和205个共下调基因。表达上调的基因可能参与信号转导、先天性免疫反应和炎症反应等生物学过程，提示斑块的易损性是由免疫-炎症反应调控的复杂过程。这与斑块破裂很大程度上是由未解决的免疫-炎症反应所触发的证据一致^[23-24]。而下调的DEGs主要富集在细胞黏附和ECM组织中。细胞黏附的减少可抑制内皮修复细胞的迁移，从而干扰受损内皮的修复^[25]。细胞黏附相关基因的下调可能是导致不稳定斑块形成的原因。此外，ECM的组织对于维持纤维冠的稳定性必不可少，本研究结果显示，参与ECM组织的下调基因(如COL1A2和COL12A1)与冠状动脉粥样硬化中纤维冠的含量下降有关^[26]。因此，减轻炎症和免疫反应，增强细胞黏附和ECM的组织可能是稳定颈动脉斑块的策略。



IGFBP6. 胰岛素样生长因子结合蛋白6; ROC. 受试者工作特征曲线; A. 两组血浆IGFBP6水平比较; B. ROC曲线; **** $P < 0.0001$

图6 血浆IGFBP6水平预测颈动脉不稳定斑块

Fig.6 Prediction of unstable carotid plaques by plasma level of IGFBP6 protein

本研究差异基因PPI网络及子网络分析结果显示, PPI网络大致可分为3个蛋白模块, 进一步的药物-基因相互作用预测显示, *CSF1R*受药物抑制程度最高, *CXCL2*受药物拮抗程度最高, *IGFBP6*受药物激活程度最高。*CSF1R*具有最多的药物-基因相互作用对, 可能是药物开发的优先靶点。集落刺激因子1 (*CSF1*)/*CSF1R*轴在单核细胞-巨噬细胞系统的存活和分化中起至关重要的作用, 可促进肿瘤相关巨噬细胞的激活^[25]。*CSF1*抑制剂, 包括*CSF1R*及其配体的抑制剂, 已被开发为抗肿瘤和抗炎剂^[26]。斑块中的巨噬细胞通过增加炎症反应和产生蛋白水解基质降解酶, 在破坏斑块稳定方面也起重要作用。使用*CSF1R*抑制剂(已被用于癌症治疗)来稳定斑块是一个有吸引力的方法。

qRT-PCR检测结果显示, 稳定斑块与不稳定斑块中*CSF1R*和*CXCL2*表达差异不明显, 仅*IGFBP6*表达在不稳定斑块中明显低于稳定斑块。*IGFBP6*属于可与胰岛素样生长因子结合的家庭蛋白, 可参与多种疾病, 包括癌症和自身免疫性疾病^[27]; *IGFBP6*在I型和II型糖尿病中的表达下调^[28]。糖尿病和晚期糖基化终产物与易损斑块表型相关^[26]。以上结果提示糖尿病与易损斑块形成有关。此外, *IGFBP6*与内皮细胞和巨噬细胞共定位, 提示*IGFBP6*可能在参与不稳定斑块的內皮细胞和巨噬细胞的活动起关键作用。ELISA分析显示, 不稳定斑块患者血浆*IGFBP6*浓度低于稳定斑块患者。此外, 基于ROC和AUC, 若血浆*IGFBP6*值 < 142.08 ng/ml, 提示颈动脉粥样硬化斑块在组织学检查中更易被归类为不稳定斑块。该临界值敏感度较高, 特异度较低, 可拓宽*IGFBP6*在非选择性人群筛选中的应用。因此, *IGFBP6*可能是预测易损斑块的生物标志物, 也是不稳定斑块形成的重要分子; 能否作为不稳定斑块的临床监测指标, 尚待进一步的大样本试验验证。

总之, *IGFBP6*在不稳定颈动脉粥样硬化斑块和血浆中表达下调, 可能成为预测不稳定颈动脉斑块的生物标志物。

【参考文献】

- [1] Wang G, Kuai D, Yang Y, et al. Screening of potential gene markers for predicting carotid atheroma plaque formation using bioinformatics approaches[J]. Mol Med Rep, 2017, 15(4): 2039-2048.
- [2] Foulkes MA, Wolf PA, Price TR, et al. The Stroke Data Bank: design, methods, and baseline characteristics[J]. Stroke, 1988, 19(5): 547-554.
- [3] 王蓉, 王凤, 陈星宇, 等. 血清 miR-221、miR-210、miR-21-5p 与老年急性脑梗死颈动脉粥样硬化斑块性质相关性及对预后预测价值分析[J]. 临床军医杂志, 2022, 50(12): 1313-1316.
- [4] 杜婧, 丁文波, 武心萍, 等. 基于多因素 Logistic 回归分析评分模型对年轻高血压患者急性脑梗死预测价值[J]. 临床军医杂志, 2022, 50(11): 1183-1187.
- [5] Cochain C, Zerneck A. Macrophages in vascular inflammation and atherosclerosis[J]. Pflugers Arch, 2017, 469(3-4): 485-499.
- [6] Kjaergaard AD, Johansen JS, Bojesen SE, et al. Elevated plasma YKL-40, lipids and lipoproteins, and ischemic vascular disease in the general population[J]. Stroke, 2015, 46(2): 329-335.
- [7] Seneviratne AN, Edsfeldt A, Cole JE, et al. Interferon regulatory factor 5 controls necrotic core formation in atherosclerotic lesions by impairing efferocytosis[J]. Circulation, 2017, 136(12): 1140-1154.
- [8] Salem MK, Butt HZ, Choke E, et al. Gene and protein expression of chemokine (C-C-Motif) ligand 19 is upregulated in unstable carotid atherosclerotic plaques[J]. Eur J Vasc Endovasc Surg, 2016, 52(4): 427-436.
- [9] Ritchie ME, Phipson B, Wu D, et al. limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies[J]. Nucleic Acids Res, 2015, 43(7): e47.
- [10] Gao CH, Yu G, Cai P. ggVennDiagram: an intuitive, easy-to-use, and highly customizable R package to generate VennDiagram[J]. Front Genet, 2021, 12: 706907.
- [11] Wu T, Hu E, Xu S, et al. clusterProfiler 4.0: a universal enrichment tool for interpreting omics data[J]. Innovation (Camb), 2021, 2(3): 100141.

- [12] Gene Ontology Consortium. Gene Ontology Consortium: going forward[J]. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43(Database issue): D1049-D1056.
- [13] Kanehisa M, Goto S. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes[J]. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28(1): 27-30.
- [14] Szklarczyk D, Gable AL, Nastou KC, et al. The STRING database in 2021: customizable protein-protein networks, and functional characterization of user-uploaded gene/measurement sets[J]. *Nucleic Acids Res*, 2021, 49(D1): D605-D612.
- [15] Shannon P, Markiel A, Ozier O, et al. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks[J]. *Genome Res*, 2003, 13(11): 2498-2504.
- [16] Kellman P, Chung YC, Simonetti OP, et al. Multi-contrast delayed enhancement provides improved contrast between myocardial infarction and blood pool[J]. *J Magn Reson Imaging*, 2005, 22(5): 605-613.
- [17] Wagner AH, Coffman AC, Ainscough BJ, et al. DGIdb 2.0: mining clinically relevant drug-gene interactions[J]. *Nucleic Acids Res*, 2016, 44(D1): D1036-D1044.
- [18] Tada H, Nakagawa T, Okada H, et al. Clinical impact of carotid plaque score rather than carotid intima-media thickness on recurrence of atherosclerotic cardiovascular disease events[J]. *J Atheroscler Thromb*, 2020, 27(1): 38-46.
- [19] Tabas I, Lichtman AH. Monocyte-macrophages and T cells in atherosclerosis[J]. *Immunity*, 2017, 47(4): 621-634.
- [20] Tall AR, Yvan-Charvet L. Cholesterol, inflammation and innate immunity[J]. *Nat Rev Immunol*, 2015, 15(2): 104-116.
- [21] Nai W, Threapleton D, Lu J, et al. Identification of novel genes and pathways in carotid atheroma using integrated bioinformatic methods[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 18764.
- [22] Wang H, Liu D, Zhang H. Investigation of the underlying genes and mechanism of macrophage-enriched ruptured atherosclerotic plaques using bioinformatics method[J]. *J Atheroscler Thromb*, 2019, 26(7): 636-658.
- [23] Lee JS, Gotlieb AI. Understanding the role of the cytoskeleton in the complex regulation of the endothelial repair[J]. *Histol Histopathol*, 2003, 18(3): 879-887.
- [24] Libby P, Ridker PM, Hansson GK. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis[J]. *Nature*, 2011, 473(7347): 317-325.
- [25] Cannarile MA, Weisser M, Jacob W, et al. Colony-stimulating factor 1 receptor (CSF1R) inhibitors in cancer therapy[J]. *J Immunother Cancer*, 2017, 5(1): 53.
- [26] Xun Q, Wang Z, Hu X, et al. Small-molecule csf1r inhibitors as anticancer agents[J]. *Curr Med Chem*, 2020, 27(23): 3944-3966.
- [27] Ding H, Wu T. Insulin-Like growth factor binding proteins in autoimmune diseases[J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2018, 9: 499.
- [28] Feldmann B, Jehle PM, Mohan S, et al. Diabetic retinopathy is associated with decreased serum levels of free IGF-I and changes of IGF-binding proteins[J]. *Growth Horm IGF Res*, 2000, 10(1): 53-59.

(责任编辑: 蒋铭敏)

解放军医学杂志®