

基于加权基因共表达网络分析非动脉炎性前部缺血性视神经病变的关键基因

尚孟秋¹, 廖良²

引用: 尚孟秋, 廖良. 基于加权基因共表达网络分析非动脉炎性前部缺血性视神经病变的关键基因. 国际眼科杂志 2022; 22(9): 1517-1522

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (No. 81973909)

作者单位: ¹(100020) 中国北京市, 北京中医药大学; ²(100078) 中国北京市, 北京中医药大学东方医院眼科

作者简介: 尚孟秋, 在读硕士研究生, 研究方向: 眼底病。

通讯作者: 廖良, 毕业于北京中医药大学东方医院, 博士, 副主任医师, 硕士研究生导师, 研究方向: 眼底病. 58273677@qq.com

收稿日期: 2021-12-26 修回日期: 2022-08-12

摘要

目的: 挖掘非动脉炎性前部缺血性视神经病变的关键基因, 为研究非动脉炎性前部缺血性视神经病变的发病机制提供生物信息学支持。

方法: 从 GEO 数据库中下载大鼠 GSE43671 芯片数据集, 使用 R 语言 WGCNA 包对基因进行分析并筛选出与临床表型相关度高的模块基因, 使用 ClusterProfiler 包对特异性模块进行基因本体论分析 (GO) 及京都基因与基因组百科全书分析 (KEGG), 用 Cytoscape 软件筛选模块内关键基因并构建关键基因-miRNA 互作网络。

结果: 采用 WGCNA 方法从 GSE43671 数据集中识别出 22 个模块, 其中蓝色模块相关性系数最高。GO 富集分析结果显示, 模块内基因主要表现在上皮管形态发生等生物过程中, 受体复合体等细胞成分上, 眼晶状体结构组成等分子功能上。KEGG 结果显示, 模块内基因主要与神经活性配体-受体互作信号通路、人乳头瘤病毒信号通路、MAPK 信号通路、PI3K/Akt 信号通路等信号通路有关。通过 PPI 网络和 Cytoscape 软件筛选得到的排名前 10 的关键基因为 Psmb9、Psma7、Map3k14、Psme1、Nfkb1、Rela、Psma5、Relb、Psmb4、Nfkb2; 预测得到 6 个 miRNA 为 miR-383-5p、miR-9a-5p、miR-155-5p、miR-223-3p、miR-495、miR-325-3p。

结论: 使用 WGCNA 方法筛选出非动脉炎性前部缺血性视神经病变的相关通路、关键基因和微小 RNA, 为其发病机制和治疗方法的探索提供理论依据, 但该结论尚待动物实验和细胞实验加以验证。

关键词: 非动脉炎性前部缺血性视神经病变; 加权基因共表达网络; 关键基因

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2022.9.19

Identification of key genes in nonarteritic anterior ischemic optic neuropathy through weighted gene co-expression network analysis

Meng-Qiu Shang¹, Liang Liao²

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 81973909)

¹Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100020, China;

²Department of ophthalmology, Dongfang Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100078, China

Correspondence to: Liang Liao. Department of ophthalmology, Dongfang Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100078, China. 58273677@qq.com

Received: 2021-12-26 Accepted: 2022-08-12

Abstract

• **AIM:** We sought to identify key genes related to nonarteritic anterior ischemic optic neuropathy (NAION) and provide bioinformatics support for elucidating the pathogenesis of NAION.

• **METHODS:** Based on rat GSE43671 dataset, which was acquired from GEO, we identified modular genes with highly correlated clinical phenotype by WGCNA package in the R language. Then Gene Ontology (GO) and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) analysis were performed with ClusterProfiler package. In addition, Cytoscape was used to screen potential key genes and establish miRNA-key genes network.

• **RESULTS:** There were 22 modules identified from the GSE43671 dataset by the WGCNA method, among which the blue module has the highest correlation coefficient. GO enrichment analysis suggested that the genes in the module mainly manifest in the epithelial tube morphogenesis and other biological processes, receptor complex and other cell components, and structural constituent of eye lens and other molecular functions. KEGG suggested that the genes in the module mainly relate to signaling pathways including neuroactive ligand-receptor interaction, human papillomavirus, MAPK and PI3K/Akt. There were 10 key genes screened by PPI network and Cytoscape including Psmb9, Psma7, Map3k14, Psme1, Nfkb1, Rela, Psma5, Relb, Psmb4 and Nfkb2, and 6 miRNA were predicted as miR-383-5p, miR-9a-5p, miR-155-5p, miR-223-3p, miR-495 and miR-325-3p.

• **CONCLUSION:** Using the WGCNA method to screen out the relevant pathways, key genes, and microRNA for NAION, it provides a theoretical basis for exploring pathogenesis and treatment methods of NAION, however, more animal and cell experiments are needed to further validate.

• **KEYWORDS:** nonarteritic anterior ischemic optic neuropathy; weighted gene co-expression network analysis; key gene

Citation: Shang MQ, Liao L. Identification of key genes in nonarteritic anterior ischemic optic neuropathy through weighted gene co-expression network analysis. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2022;22(9):1517-1522

0 引言

非动脉炎性前部缺血性视神经病变 (nonarteritic anterior ischemic optic neuropathy, NAION) 的发病率约为 2.3/100000~10.2/100000^[1], 临床上常以急性视力下降和视野缺损为主要症状。NAION 可导致严重视功能损害, 但目前临床上尚无特效治疗方法^[2], 主要通过改善视网膜血液循环以提高患者视功能; 且 NAION 发病机制尚未明确, 其分子机制仍待进一步研究。生物信息学通过联系计算机与自然科学, 能够解释复杂的生物机体, 为研究疾病的生物学过程及分子机制提供新思路。加权基因共表达网络分析 (weighted gene coexpression network analysis, WGCNA) 是依据基因与基因间的互作关系构建的加权网络^[3], 在处理大量样本的复杂数据时存在优势, 现已应用于癌症、心衰等多种疾病^[4]。本研究中使用 WGCNA 方法筛选出与 NAION 临床特征高度相关的模块, 并对模块内进行通路富集分析与关键基因筛选, 并通过关键基因预测相关微小 RNA (micro ribonucleic acid, miRNA), 从而为阐明 NAION 的发病机制提供有力支持。

1 材料和方法

1.1 数据预处理与加权基因共表达网络构建 从基因表达数据库 GEO (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) 下载芯片 GSE43671, 芯片平台为 GPL6294, 其中包含 18 只 NAION 模型大鼠及 18 只空白对照组大鼠视网膜组织中的基因表达谱。利用 R 软件 (4.0.3) 内的 limma 包对原始数据标准化数据、基因名称注释、构建表达矩阵等预处理。使用 R 语言中的 WGCNA 包对预处理后的基因表达谱进行加权基因共表达分析: (1) 应用 hclust 函数对样本聚类, 剔除离群样本; (2) 应用 pickSoftThreshold 函数筛选合适的软阈值以构建无尺度网络, 设定拟合指数为 $R^2 \geq 0.85$; 随后, 用 blockwiseModules 函数通过动态树剪切算法对模块聚类, 要求最小簇基因数 30 个, 合并相似模块的阈值为 0.25。

1.2 特异性模块识别与模块内基因相关性分析 对每个模块进行主成分分析 (principle component analysis, PCA), 将模块特征基因值 (module eigengene, ME) 即模块的第一主成分^[5]与表型性状相关联, 与性状相关性 R 最高且 $P \leq 0.05$ 的模块即为组织特异性模块, 计算基因显著性 (gene significance, GS) 和模块成员 (module membership, MM), 对模块内基因进行筛选, 范围设置为 $MM > 0.8$ 且 $|GS| > 0.2$ 。

1.3 富集分析 使用 R 语言的 clusterProfiler 包对特异性模块进行基因本体论分析 (GO) 和京都基因与基因组百科全书分析 (KEGG) 富集分析。以 $P < 0.05$ 表示富集的通路有统计学意义。

1.4 筛选核心基因与 miRNA 预测 将特异性模块内符合筛选范围的基因导入在线数据库 STRING (<https://cn.stringdb.org/cgi/network.pl>), 选择综合分数大于 0.9 的主要蛋白, 构建蛋白互作网络 (protein-protein interaction, PPI), 将结果导入 Cytoscape 软件, 使用软件内 cytohubba 插件, 基于最大集团中心性 (maximal clique centrality, MCC)^[6] 筛选排名前 10 的关键基因。将获得的关键基因导入 TargetScan 数据库^[7] 预测靶向 miRNA, 用 Cytoscape 绘制 miRNA-关键基因网络图。

2 结果

2.1 加权基因共表达模块构建 将高度设定为 45, 未发现离群样本, 纳入所有样本进行分析, 见图 1A。当拟合指数 R^2 为 0.85 时, 选择合适的软阈值为 9, 见图 1B。使用动态剪切树算法分割模块并构建网络图, 见图 1C, 在 GSE43671 数据集中共识别出 22 个模块, 见图 1D。绘制模块相关性热图, 见图 2A, 根据模块与性状间的相关系数选择特异性模块, 22 个模块中蓝色模块相关性系数最高 ($cor = 0.79, P < 0.01$), 见图 2B。计算蓝色模块内基因的 |GS| 和 MM 值并绘制散点图, 设置 $MM > 0.8, |GS| > 0.2$ 对蓝色模块内的基因进行初步筛选, 最终纳入 1380 个基因进行后续关键基因的筛选。

2.2 富集分析 将蓝色模块的全部 1958 个基因纳入分析, GO 分析共得到富集分析通路 130 条, 包括生物学过程 (biological process, BP) 93 条、细胞组分 (cellular component, CC) 34 条、分子功能 (molecular function, MF) 3 条, 排名前 10 的通路信息见表 1; KEGG 分析共富集得到通路 18 条, 主要集中在神经信号传递通路、人乳头瘤病毒感染通路、MAPK 通路、PI3K/Akt 通路等, 排名前 10 的通路见表 2, 应用 R 语言 GOplot 包绘制 GO 分析可视化图, ggplot2 包绘制 KEGG 可视化图 (图 3)。

2.3 关键基因筛选及 miRNA 预测 基于 Cytoscape 软件中的 cytohubba 插件, 关键基因为 MCC 算法排名前 10 的基因, 分别为 Psmb9、Psm7、Map3k14、Psm1、Nfkb1、Rela、Psm5、Relb、Psm4、Nfkb2, 共预测得到 6 个 miRNA 靶点, 分别为 rno-miR-383-5p、rno-miR-9a-5p、rno-miR-155-5p、rno-miR-223-3p、rno-miR-495、rno-miR-325-3p (表 3), 使用 R 语言的 ggcorrplot 包绘制关键基因的相关性图 (图 4A), 表明关键基因间存在正相关关系, 使用 cytoscape 软件绘制 miRNA-关键基因网络图 (图 4B)。

3 讨论

目前公认的 NAION 诱发因素为视盘血灌注压降低和危险视盘结构^[8], 现已证实的血管危险因素包括高血压、夜间低血压、糖尿病等, 同时可能与高脂血症、贫血、吸烟、服用部分药物等因素有关^[9-10]。但目前 NAION 的病理机制尚未完全明确, 且临床上缺乏有效的治疗药物。因此, 开展 NAION 分子机制的研究有助于 NAION 的治疗。

与传统的转录组差异基因分析方法相比, WGCNA 算法能够在基因相互关系的基础上引入加权值, 更充分地利

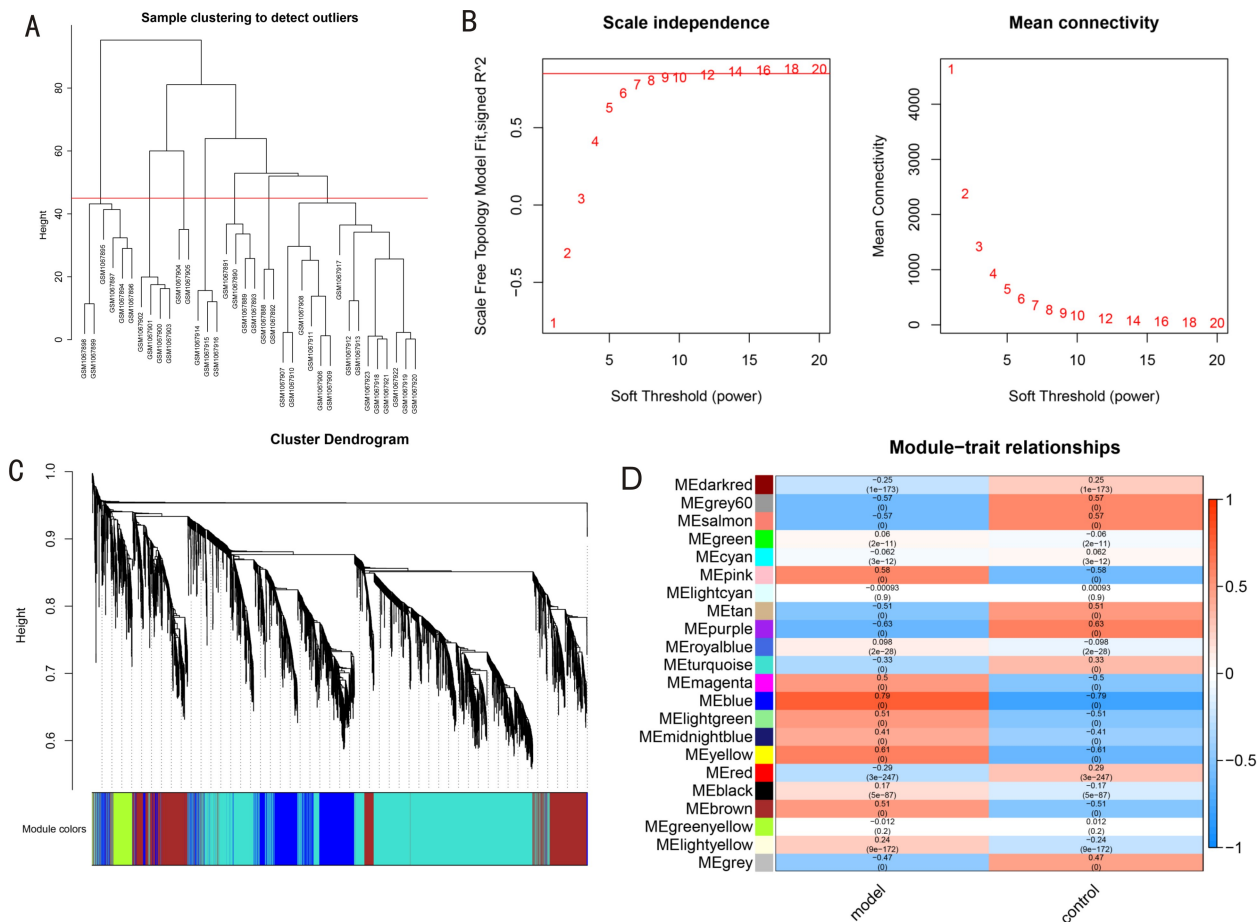


图 1 WGCNA 分析 NAION 相关模块 A: 样本聚类; B: 选定最佳软阈值; C: 基因共表达网络分析, 确定共表达数据模块; D: 各模块特征与性状间的相关系数, 括号中的数字为相应的 P 值。

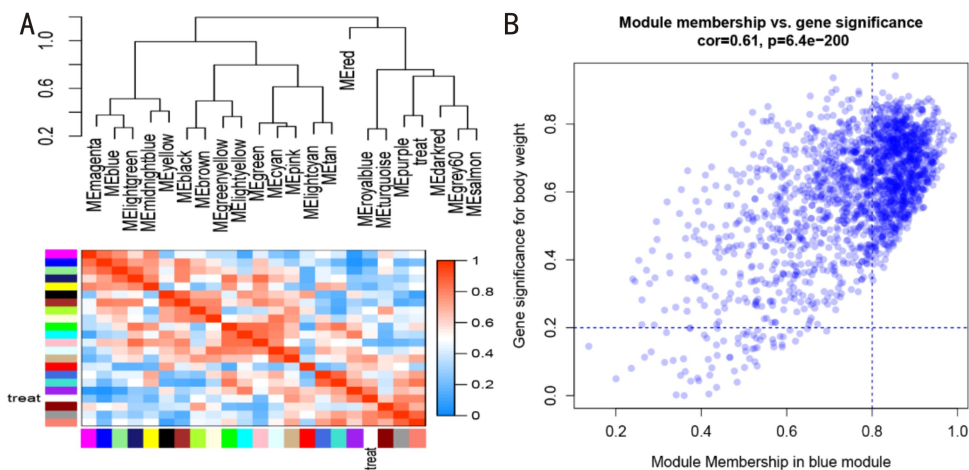


图 2 WGCNA 分析 NAION 相关模块 A: 模块聚类及相关性热图; B: GS 与 MM 的相关性, cor 为两者间的绝对相关系数。

用基因信息, 从而构建出了更具有生物学意义的共表达网络, 更贴近生物体内的真实情况。本研究通过 WGCNA 方法分析 GSE43671 数据集, 共获得 22 个模块, 其中蓝色模块相关性最为显著, 对蓝色模块内基因进行 GO 与 KEGG 富集分析, 结果显示这些基因主要富集于 MAPK 通路、PI3K/Akt 通路等。PI3K/Akt 是经典的抗凋亡、促存活信号通路, 也是保护视网膜神经节细胞 (RGCs) 功能的重要通路。有研究表明 PI3K/Akt 通路可以通过激活下游 mTOR 分子, 通过调控自噬以保护视神经^[11]。Husain 等^[12] 学者研究表明 PI3K/Akt 通路可抑制 RGCs 的凋亡, 其机制与促进下游 NF- κ B 活化, 引起其调控的促凋亡基

因的凋亡有关^[13]。MAPK 信号通路包含 ERK、JNK、SAPK 以及 P38 MAPK 共 4 条途径, 在细胞增殖、炎症、凋亡等多种生物过程中发挥重要调节作用。Foxton 等^[14] 学者证明 P38 MAPK 介导了视网膜神经节细胞轴突远端运输丢失。Produit-Zengaffinen 等^[15] 学者发现将 JNK 抑制剂注射进入缺血再灌注大鼠的玻璃体腔内, 结果显示 RGCs 凋亡率显著下降。Yang 等^[16] 证明 MAPK 通路级联反应会打破轴突能量平衡, 引起 ATP 减少以及钙离子积累, 最终激活钙蛋白, 使轴突破裂。以上实验证明 MAPK 信号通路对 NAION 有重要作用。

通过 cytohubba 插件对特异性模块内的基因进行筛

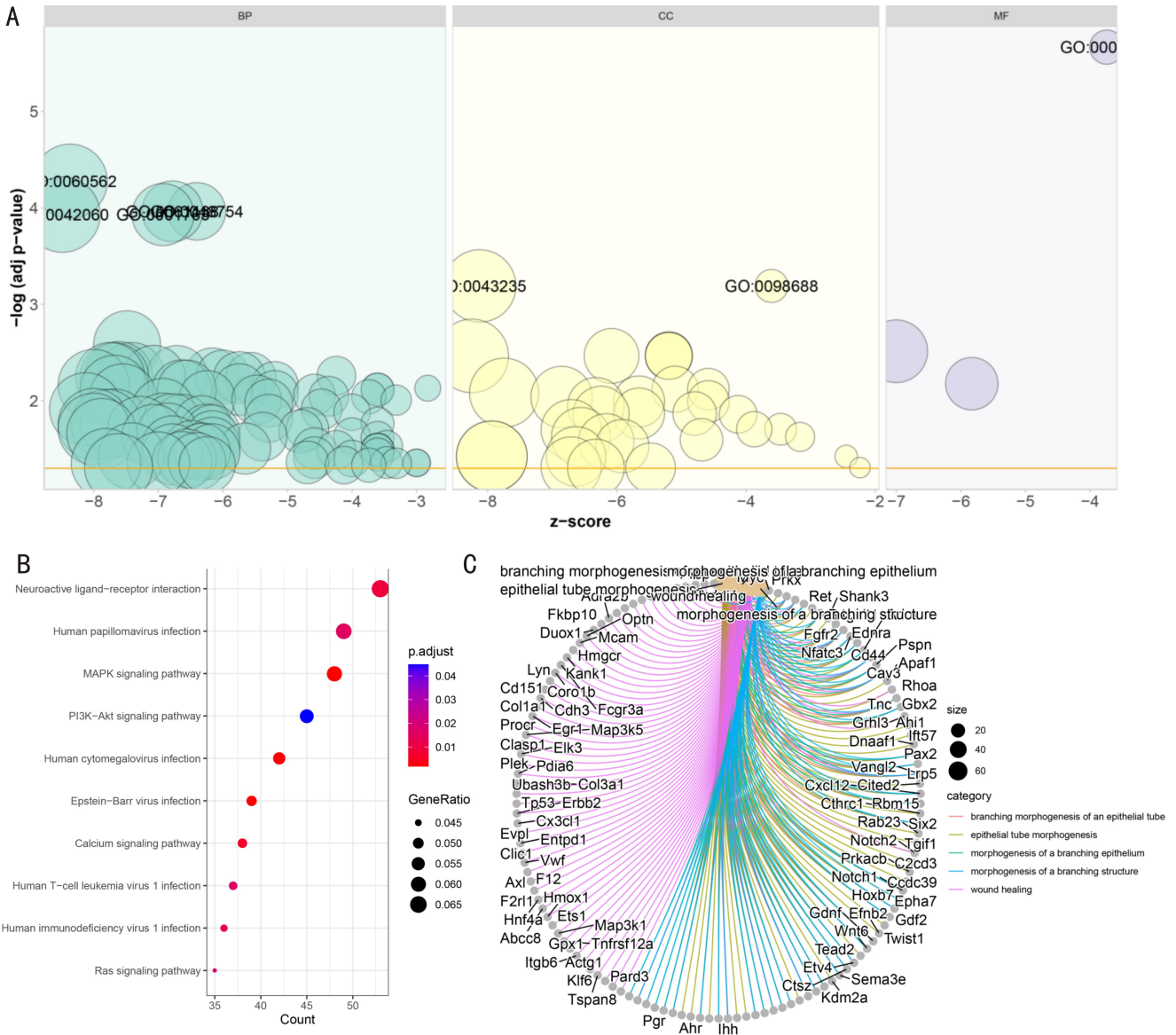


图3 GO及KEGG富集分析图 A:GO富集分析气泡图;B:KEGG富集分析气泡图;C:GO富集分析网络图。

表1 GO富集分析排名前10通路

ID号	通路类别	通路名称	调整后P值	基因数
GO:0005212	MF	眼晶状体的结构组成	2.15×10^{-6}	14
GO:0060562	BP	上皮管的形态发生	5.30×10^{-5}	70
GO:0048754	BP	上皮管的分支形态发生	0.000108	41
GO:0061138	BP	分支上皮的形态发生	0.000108	46
GO:0042060	BP	创伤愈合	0.000117	72
GO:0001763	BP	分支结构的形态发生	0.000117	48
GO:0043235	CC	受体复合体	0.000644	66
GO:0098688	CC	浦肯野细胞突触的平行纤维	0.000644	13
GO:0009612	BP	对机械刺激的反应	0.002594	56
GO:0050839	MF	细胞黏附分子	0.003065	49

选,得出关键基因,关键基因中 Rela、Relb 均为 NF- κ B 蛋白的亚基,Nfkb1、Nfkb2 则分别调控 NF- κ B 蛋白的亚基 P50 与 P52,NF- κ B 能够在能量平衡、炎症及凋亡中发挥多向性转录调节作用。Ando 等^[17]学者在体外实验中证明 NF- κ B 可降低 RGCs 的凋亡率。

miRNA 是一类由 21~24 个 RNA 构成的非编码蛋白

单链 RNA,其功能主要是将沉默的 mRNA 翻译成蛋白质,以此调节细胞活动,其在调控基因表达、细胞周期、细胞增殖等生物过程中起到重要作用。本文通过 Target Scan 数据库共预测到 6 个 miRNA,其中部分 miRNA 在神经细胞的保护作用或其 在眼科相关疾病中的作用已得到证实^[18]。Wang 等^[19]学者通过实验证明 miR-155-5p 可以促

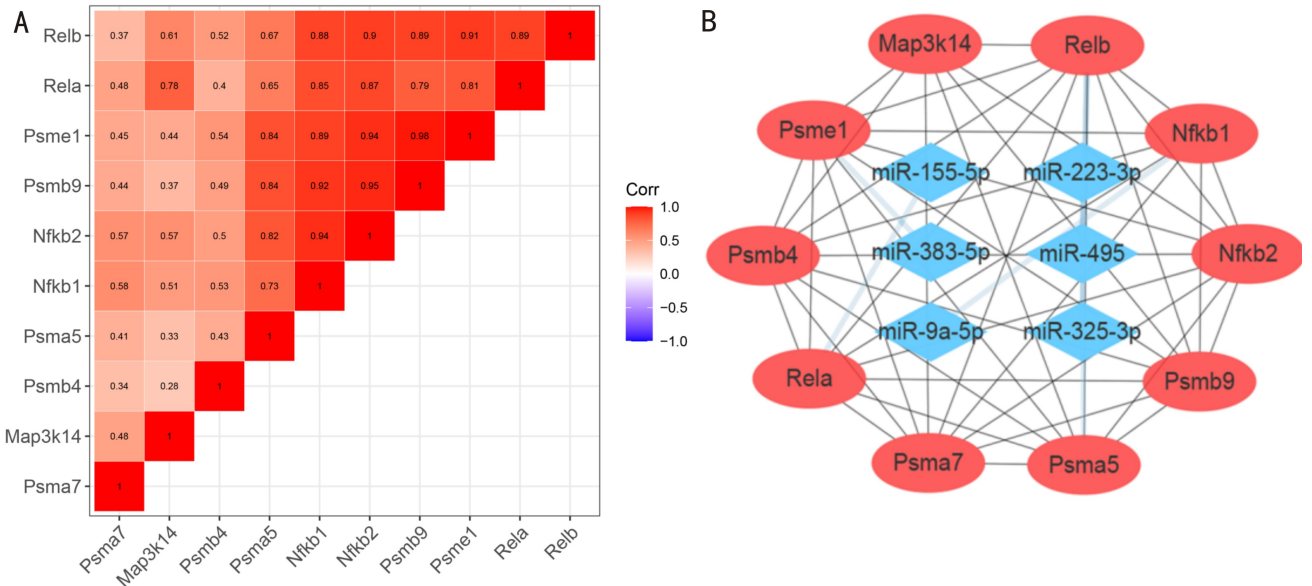


图4 关键基因分析及 miRNA 预测 A:关键基因相关性热图;B:关键基因-miRNA 网络图。

表2 KEGG 富集分析排名前10 通路

ID 号	通路名称	调整后 P 值	基因数
rno04080	神经活性配体-受体相互作用	0.00907	53
rno05165	人乳头瘤病毒感染	0.015334	49
rno04010	MAPK 信号通路	0.001784	48
rno04151	PI3K/Akt 信号通路	0.044846	45
rno05163	人巨细胞病毒感染	0.001804	42
rno05169	人疱疹病毒第四型感染	0.001804	39
rno04020	钙离子信号通路	0.00619	38
rno05166	人 T 细胞白血病病毒 1 感染	0.016603	37
rno05170	人类免疫缺陷病毒感染	0.012083	36
rno04014	Ras 信号通路	0.016383	35

表3 关键基因及 miRNA 预测

基因名称	MCODE 评分	miRNA
Psmb9	6.533333	无
Psma7	6.533333	无
Map3k14	7	无
Psmc1	6.533333	miR-383-5p
Nfkb1	7	miR-9a-5p
Rela	6.805556	miR-155-5p
Psma5	6.805556	miR-223-3p
Relb	6.533333	miR-495, miR-325-3p
Psmb4	6.533333	无
Nfkb2	6.533333	无

进 Wistar 大鼠的神经修复,其机制可能与 cAMP/PKA 通路有关;miR-9a-5p 的上调可抑制 ATG5 介导的自噬活动^[20],减轻大脑中动脉闭塞导致的神经节细胞损伤;miR-495 可以通过 Gria2 蛋白减轻神经元损伤^[21];miR-383 可调控 PI3K/Akt 信号通路的表达,Jiang 等^[22]发现 miR-383 上调会上调 PRDX3 表达,引起高糖诱导的视网膜色素上皮细胞活力下降,导致细胞凋亡和活性氧形成。miR-325-3p 在多种疾病的发展进程中起作用,有研究表明上调 miR-325-3p 可抑制血管内皮细胞焦亡^[23],过表达 miR-325-3p 可通过使

MAPK 通路失活来减少氧糖剥夺/复氧(OGD/R)诱导的神经元凋亡^[24]。

综上所述,本研究将 WGCNA 方法应用到 NAION 以研究其基因表达,并筛选获得关键基因,构建 miRNA-关键基因网络,为研究 NAION 的发病机制和治疗方法提供了新见解。但本研究同时也存在样本量少且缺乏基础实验等不足之处,下一步还需进行动物实验和细胞实验加以验证。

参考文献

- 1 周歆,任美侠,闵捷,等.非动脉炎性前部缺血性视神经病变患者的明适应负向波变化特点分析.眼科新进展 2020;40(4):373-376,384
- 2 Berry S, Lin WV, Sadaka A, et al. Nonarteritic anterior ischemic optic neuropathy: cause, effect, and management. *Eye Brain* 2017;9:23-28
- 3 Langfelder P, Horvath S. WGCNA: an R package for weighted correlation network analysis. *BMC Bioinformatics* 2008;9:559
- 4 Jia RK, Zhao HX, Jia MW. Identification of co-expression modules and potential biomarkers of breast cancer by WGCNA. *Gene* 2020;750:144757
- 5 Langfelder P, Horvath S. Eigengene networks for studying the relationships between co-expression modules. *BMC Syst Biol* 2007;1:54
- 6 Li CZ, Xu JC. Feature selection with the Fisher score followed by the Maximal Clique Centrality algorithm can accurately identify the hub genes of hepatocellular carcinoma. *Sci Rep* 2019;9(1):17283
- 7 Agarwal V, Bell GW, Nam JW, et al. Predicting effective microRNA

target sites in mammalian mRNAs. *Elife* 2015;4:e05005

8 Dehghani A, Alemzadeh - Ansari MH, Masjedi M, *et al.* Anterior ischemic optic neuropathy in a patient with erectile dysfunction: tadalafil as an offending medication. *J Res Pharm Pract* 2018;7(3):164-167

9 Morrow MJ. Ischemic optic neuropathy. *Continuum (Minneapolis)* 2019;25(5):1215-1235

10 Liu B, Zhu LX, Zhong JX, *et al.* The association between phosphodiesterase type 5 inhibitor use and risk of non-arteritic anterior ischemic optic neuropathy: a systematic review and Meta-analysis. *Sex Med* 2018;6(3):185-192

11 曹丽静, 卢文胜. 川芎嗪对高血压大鼠氧化应激及视网膜神经节细胞损伤的影响. *中国临床药理学杂志* 2020;36(5):525-527

12 Husain S, Ahmad A, Singh S, *et al.* PI3K/Akt pathway: a role in δ -opioid receptor-mediated RGC neuroprotection. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2017;58(14):6489-6499

13 Xu Y, Yang BY, Hu YG, *et al.* Wogonin prevents TLR4-NF- κ B-mediated neuro-inflammation and improves retinal ganglion cells survival in retina after optic nerve crush. *Oncotarget* 2016;7(45):72503-72517

14 Foxton R, Osborne A, Martin KR, *et al.* Distal retinal ganglion cell axon transport loss and activation of p38 MAPK stress pathway following VEGF-A antagonism. *Cell Death Dis* 2016;7(5):e2212

15 Produit-Zengaffinen N, Favez T, Pournaras CJ, *et al.* JNK inhibition reduced retinal ganglion cell death after ischemia/reperfusion *in vivo* and after hypoxia *in vitro*. *Adv Exp Med Biol* 2016;854:677-683

16 Yang J, Wu ZH, Renier N, *et al.* Pathological axonal death through a

MAPK cascade that triggers a local energy deficit. *Cell* 2015;160(1-2):161-176

17 Ando A, Yamazaki Y, Kaneko S, *et al.* Cytoprotection by nipradilol, an anti-glaucomatous agent, via down-regulation of apoptosis related gene expression and activation of NF- κ B. *Exp Eye Res* 2005;80(4):501-507

18 Mead B, Tomarev S. The role of miRNA in retinal ganglion cell health and disease. *Neural Regen Res* 2022;17(3):516-522

19 Wang TY, Li B, Wang ZJ, *et al.* miR-155-5p promotes dorsal root ganglion neuron axonal growth in an inhibitory microenvironment via the cAMP/PKA pathway. *Int J Biol Sci* 2019;15(7):1557-1570

20 Wang N, Yang L, Zhang HX, *et al.* microRNA-9a-5p alleviates ischemia injury after focal cerebral ischemia of the rat by targeting ATG5-mediated autophagy. *Cell Physiol Biochem* 2018;45(1):78-87

21 Caputo D, Colantoni A, Lu L, *et al.* A regulatory circuitry between Gria2, miR-409, and miR-495 is affected by ALS FUS mutation in ESC-derived motor neurons. *Mol Neurobiol* 2018;55(10):7635-7651

22 Jiang YY, Sang YZ, Qiu QH. microRNA-383 mediates high glucose-induced oxidative stress and apoptosis in retinal pigment epithelial cells by repressing peroxiredoxin 3. *Am J Transl Res* 2017;9(5):2374-2383

23 严文艳, 陈燕, 杨娟, 等. 褪黑素通过 miR-325-3p/消皮素 D 途径调控脂多糖诱导的血管内皮细胞焦亡. *世界临床药物* 2021;42(8):631-637,647

24 Yi S, Zhang CQ, Li N, *et al.* miR-325-3p protects neurons from oxygen-glucose deprivation and reoxygenation injury via inhibition of RIP₃. *Dev Neurosci* 2020;42(2-4):83-93