

基于基因共表达网络分析氧诱导小鼠视网膜新生血管模型免疫相关靶基因

袁琳慧, 刘新

引用: 袁琳慧, 刘新. 基于基因共表达网络分析氧诱导小鼠视网膜新生血管模型免疫相关靶基因. 国际眼科杂志, 2024, 24(6): 857-863.

基金项目: 2023年度大连市第三人民医院科研启动专项基金计划(No.2023ky002)

作者单位: (116033) 中国辽宁省大连市第三人民医院眼科

作者简介: 袁琳慧, 博士, 副主任医师, 研究方向: 眼底病。

通讯作者: 刘新, 硕士, 主任医师, 教授, 研究方向: 眼底外科。
740846386@qq.com

收稿日期: 2023-07-19 修回日期: 2024-04-24

摘要

目的: 通过生物信息学方法探究氧诱导小鼠视网膜新生血管(OIR)模型中与免疫相关的关键基因以及免疫细胞浸润水平。

方法: 从 GEO 数据库获取基因芯片数据集, 采用 R 语言环境中“limma”包获得差异表达基因(DEGs), 并进行 GO 功能富集和 KEGG 通路分析, 基于 CIBERSORT 算法进行数据集免疫细胞浸润分析, 通过加权基因共表达网络分析(WGCNA)筛选与免疫相关基因模块中的 DEGs, 利用 STRING 在线数据库及 Cytoscape 软件构建蛋白质互作(PPI)网络, 利用 cytoHubba 模块筛选出最终的靶基因。

结果: 筛选出 467 个表达具有显著差异性的基因, 其中 270 个基因表达上调, 197 个基因表达下调。免疫浸润分析结果显示仅辅助型 T 细胞 2(Th2 cells)高表达, 且差异具有显著性($P < 0.05$)。WGCNA 分析后, 与免疫最相关模块中差异基因为 66 个, 构建 PPI 网络后利用插件筛选出 5 个关键基因, 即血管性血友病因子(vWF)、血管内皮生长因子 A(VEGF-A)、Serping1、凋亡诱导因子 1(AIF1)以及信号传导蛋白和转录激活物(STAT3)。

结论: 采用生物信息学的方式进行 OIR 模型的免疫细胞浸润分析及筛选出与免疫相关的关键基因, 可为视网膜新生血管性疾病的进一步研究与诊疗提供依据。

关键词: 氧诱导视网膜新生血管; 生物信息学; 免疫浸润; 蛋白质互作网络; 差异基因; 免疫细胞; 小鼠

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2024.6.04

Analysis of immune related target genes in oxygen induced mouse retinal neovascularization model based on gene co-expression network

Yuan Linhui, Liu Xin

Foundation item: 2023 Special Scientific Research Fund of Dalian No.3 People's Hospital (No.2023ky002)

Department of Ophthalmology, Dalian No.3 People's Hospital, Dalian 116033, Liaoning Province, China

Correspondence to: Liu Xin. Department of Ophthalmology, Dalian No.3 People's Hospital, Dalian 116033, Liaoning Province, China. 740846386@qq.com

Received: 2023-07-19 Accepted: 2024-04-24

Abstract

• **AIM:** To identify immune-related key genes and the extent of immune cell infiltration in a oxygen-induced retinopathy (OIR) model by bioinformatics method.

• **METHODS:** Microarray data were obtained from the GEO database, differentially expressed genes (DEGs) were identified using the “limma” R package, GO function enrichment and KEGG pathway analysis were conducted, and immune cell infiltration based on the CIBERSORT algorithm was analyzed. Weighted gene co-expression network analysis (WGCNA) was used to screen DEGs in the immune-related gene module, constructing a protein-protein interaction (PPI) network using STRING online database and Cytoscape software, and further screening final target genes using the cytoHubba plug-in.

• **RESULTS:** A total of 467 DEGs were screened, including 270 up-regulated and 197 down-regulated genes. Helper T cell 2 (Th2 cells), an immune cell type, exhibited significantly high expression levels ($P < 0.05$). WGCNA analysis identified 66 differential genes in modules most closely related to immunity. After constructing the PPI network, 5 key genes were screened through plug-ins: von Willebrand factor (vWF), vascular endothelial growth factor A (VEGF-A), Serping1, apoptosis inducing factor 1 (AIF1) and signal transducers and activators of transcription 3 (STAT3).

• **CONCLUSION:** The findings of this study provide valuable insights into immune cell infiltration in OIR as well as key genes related to immunity through bioinformatics analysis, which can serve as a reference for further research and treatment of retinal neovascular diseases.

• **KEYWORDS:** oxygen-induced retinal neovascularization; bioinformatics; immune infiltration; protein-protein interaction network; differential genes; immune cells; mice

Citation: Yuan LH, Liu X. Analysis of immune related target genes in oxygen induced mouse retinal neovascularization model based on gene co-expression network. Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci), 2024, 24(6): 857-863.

0 引言

视网膜缺血、缺氧是视网膜新生血管产生的主要原因,而视网膜新生血管是影响视网膜血管性疾病进展以及患者视力的重要原因之一。氧诱导小鼠视网膜新生血管(oxygen-induced retinopathy, OIR)模型是目前经典且成熟的研究视网膜新生血管的动物模型之一,可通过该模型探究影响视网膜新生血管的病因、发展以及治疗的关键因素^[1-2]。视网膜拥有高度复杂、精密的保护系统,使之避免受到免疫系统的攻击,并被认为是免疫特权组织^[3-5]。视网膜通过物理屏障与免疫系统隔离,即由视网膜血管内皮细胞和视网膜色素上皮细胞紧密连接形成的血-视网膜屏障(BRB),因此细胞和分子不能自由进入视网膜。BRB还在眼内隔室中隔离视网膜抗原,从而避免T细胞活化,这种现象被称为免疫忽视^[3,6-8]。视网膜新生血管的产生与视网膜免疫特权的丧失有关,包括BRB的分解和视网膜免疫抑制特性的变化。因此,本研究利用公共数据库(GEO)中的OIR小鼠视网膜细胞的转录谱分析结果,采用生物信息学分析的方法探索影响视网膜新生血管发生发展的免疫相关的靶点以及免疫细胞,为视网膜新生血管性疾病提供新的诊疗思路。

1 材料和方法

1.1 材料 本研究使用 GEO (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) 数据集为 GSE130400、GPL10787 平台,更新于 2021-04-29。该数据集包括高氧处理后 12、17、28 d 的小鼠视网膜组织样本测序结果各 13 个以及相应的正常氧含量组 12、17、28 d 的小鼠视网膜组织样本测序结果各 14 个。根据既往研究结果,高氧处理 17 d, OIR 模型小鼠(高氧组)视网膜新生血管与正常小鼠(正常氧含量组)相比差异最为明显^[1],所以本研究选取 17 d 时高氧组和正常氧含量组的样本分别为实验组和对照组。

1.2 方法

1.2.1 差异表达基因分析 在 R 语言环境下,利用“limma”包对数据集中实验组和对照组的差异表达基因(differentially expressed genes, DEGs)进行鉴定,差异阈值选取 $|\log_2FC| > 1$ 且 $FDR < 0.05$ ^[9]。

1.2.2 GO 功能注释和 KEGG 信号通路富集分析 将 1.2 筛选得到的 DEGs 导入 DAVID 6.8 数据库,依据 GO (gene ontology) 数据库对其进行生物学功能注释,并利用 KEGG (Kyoto encyclopedia of genes and genomes) 通路数据库进行信号通路富集^[10]。

1.2.3 免疫浸润 CIBERSORT 分析 CIBERSORT 基于基因表达数据对免疫相关通路进行分析,从而对特定免疫细胞浸润进行考察^[11]。本研究在 R 语言环境中运用 CIBERSORT 算法计算样本免疫浸润程度。参考表达矩阵为文献^[12]中的 `srep40508-s1` 文件。

1.2.4 加权基因共表达分析 采用 R 语言加权基因共表达分析(weighted gene co-expression network analysis, WGCNA) 包计算,剔除低表达(< -1)和方差较小的低波动基因(< 0.2),模块相似性的阈值为 0.2。筛选出最佳软阈值 β , 鉴定共表达模块,对各个模块与免疫细胞分数间的相关性进行分析^[13]。选取免疫浸润分数差异最显著的模块。

1.2.5 蛋白质互作分析和关键基因的筛选 将免疫浸润分数差异最显著的模块与 DEGs 取交集后的结果进行蛋白质互作 (protein-protein interaction, PPI) 分析,采用 STRING 在线数据库,去除没有相互作用的孤立点,得到 PPI 网络^[14],将该网络导入 Cytoscape 软件,使用 cytoNCA 插件分析网络中各基因的相关性^[15],使用 CytoHubba 插件筛选出总网络中相关性最强的 10 个基因^[16]。根据 cytoNCA 和 cytoHubba 的结果交互选出关键(hub)基因。

2 结果

2.1 差异表达基因 根据 $|\log_2FC| > 1$ 且 $FDR < 0.05$ 的标准,实验组和对照组相比共有 467 个基因差异表达显著,其中 270 个基因表达上调,197 个基因表达下调,见图 1。

2.2 GO 功能注释和 KEGG 信号通路富集分析 对 DEGs 进行 GO 和 KEGG 富集分析,并对前 20 个最密集的通路进行可视化分析,见图 2。

2.3 免疫浸润 CIBERSORT 分析 采用免疫浸润 CIBERSORT 分析对免疫细胞占比进行可视化分析,见图 3A、B。对实验组和对照组中免疫细胞分数进行统计学检验,与对照组相比,实验组中辅助型 T 细胞 2 (Th2 cells) 高表达,差异具有显著性($P < 0.05$),见图 3C。

2.4 WGCNA 剔除离群值后进行样本聚类见图 4A,利用欧式距离进行层级聚类见图 4B。根据算法 $\log_{nd} = ka - \log k$ 选择,当软阈值取 8 时可使 $R^2 > 0.8$ 并且逐渐稳定,此时共表达网络符合无尺度网络分布,见图 4C。对共表达模块进行鉴定并合并相似模块后得到 9 个共表达模块,见图 4D。对各个模块与免疫细胞分数间的相关性进行可视化分析,见图 5。当 $P < 0.05$ 时,选取相关性系数最高的模块为中心模块,该模块与 Th2 cells 相关性系数最高(0.45),因此选择该模块用于后续分析,该模块中的成员与基因显著性的相关性可视化呈现见图 6。

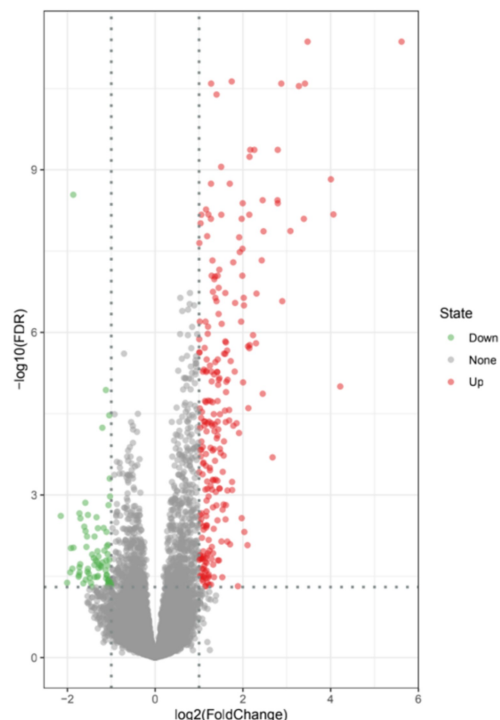


图1 差异表达基因分析 红点表示基因表达上调,绿点表示基因表达下调。

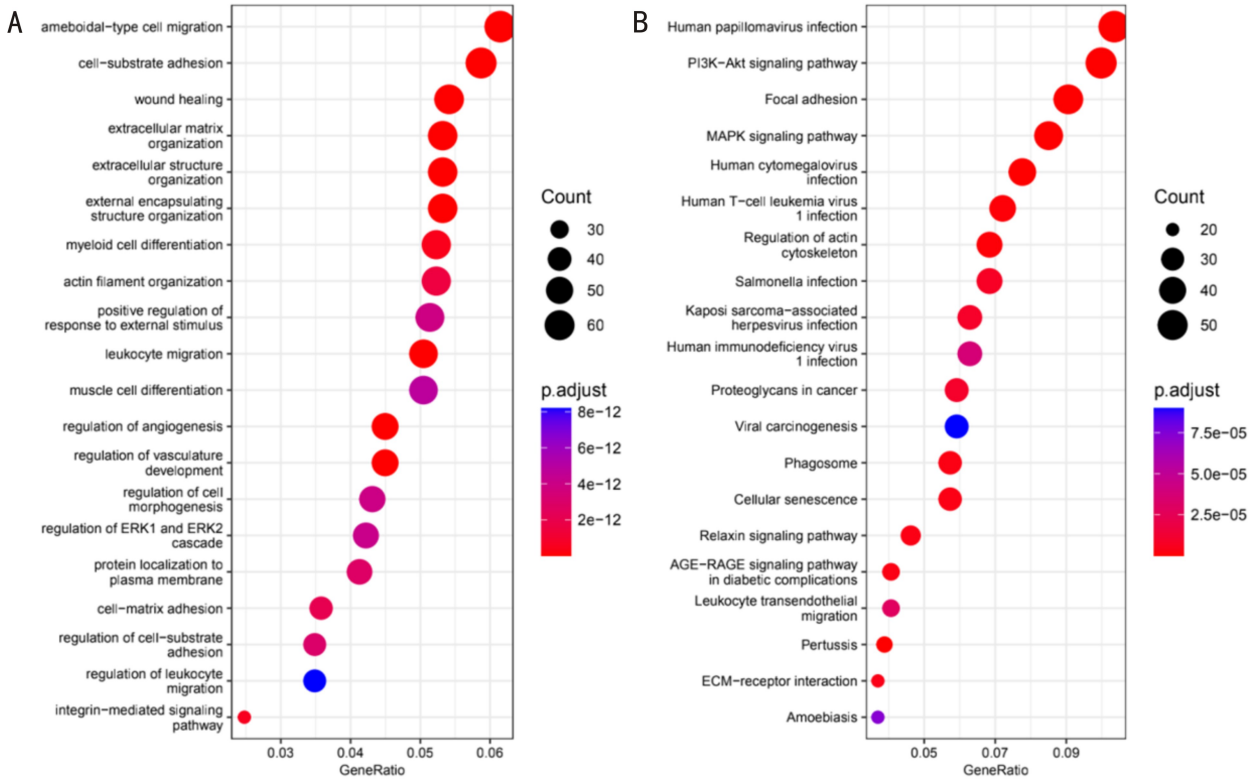


图2 GO和KEGG富集分析 A:GO富集分析;B:KEGG富集分析。

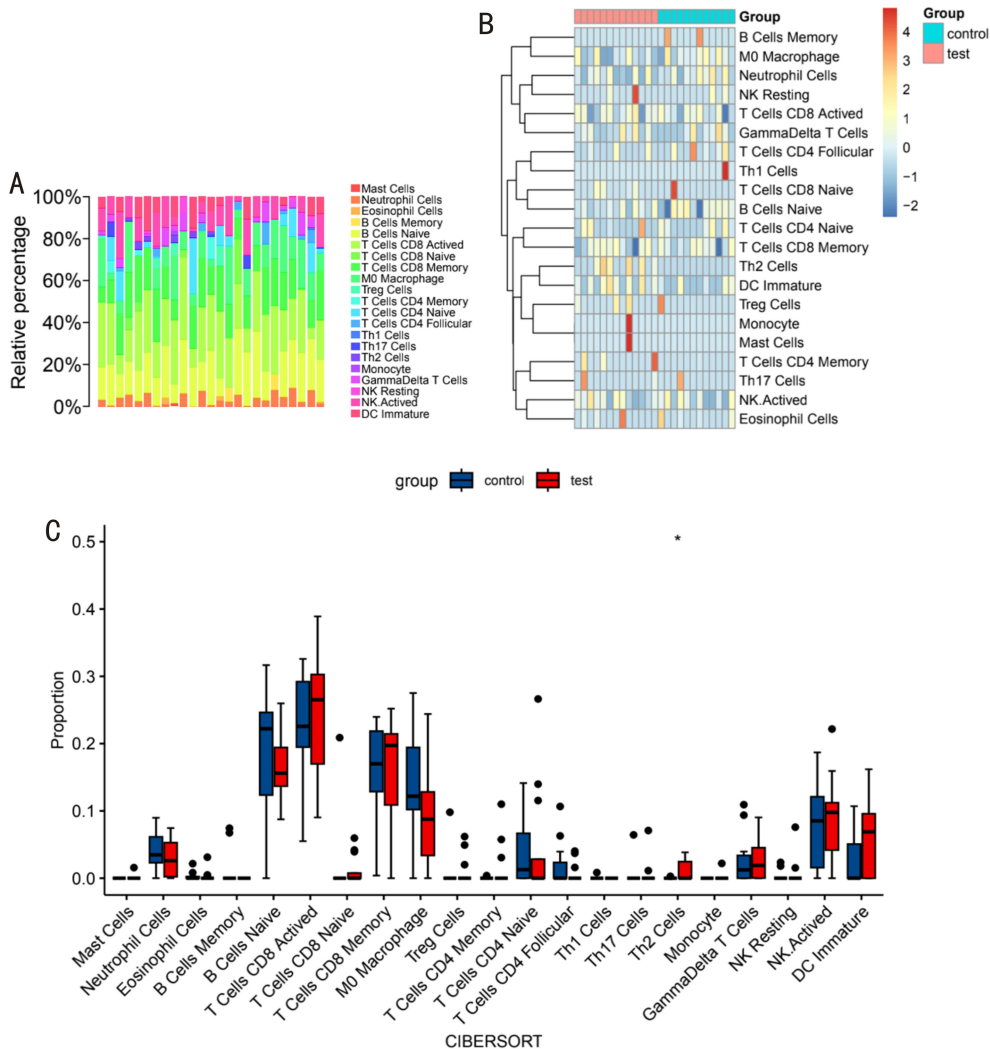


图3 免疫浸润CIBERSORT分析 A:CIBERSORT堆叠图,21种免疫细胞占比;B:免疫浸润差异热图,21种免疫细胞分别在实验组和对照组中的占比;C:CIBERSORT差异箱线图,21种免疫细胞分别在实验组和对照组中的表达量箱线图,* $P < 0.05$ vs 对照组。

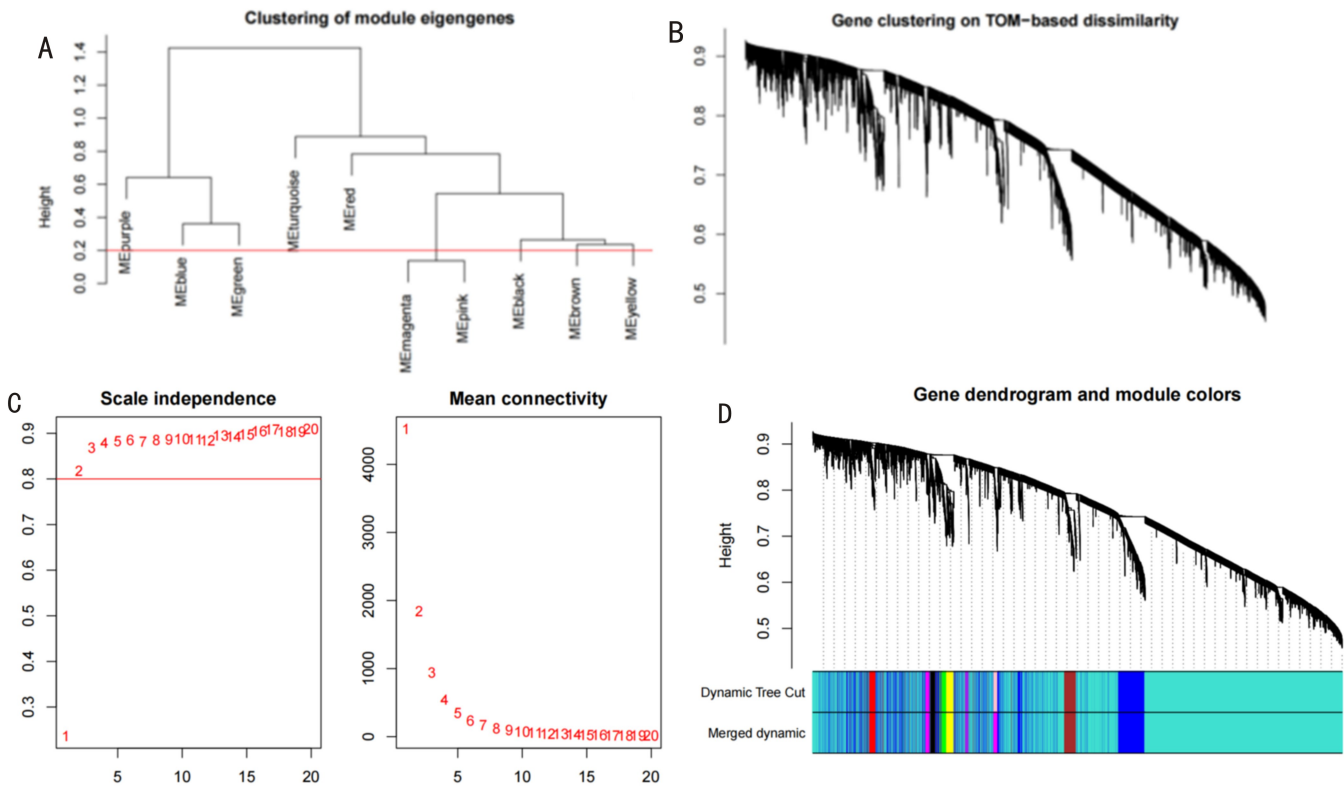


图4 WGCNA结果 A:样本聚类剔除分离群值;B:样本层级聚类树状图;C:软阈值筛选;D:基因模块树状图与共表达模块。

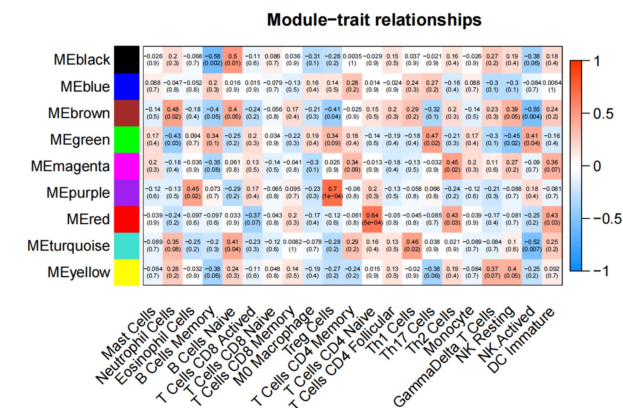


图5 共表达模块与免疫细胞分数的相关性热图。

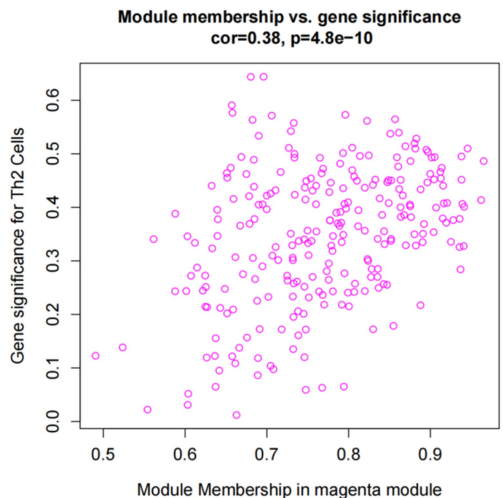


图6 关键模块基因相关性与其基因显著性散点图。

这66个基因进行PPI分析,代入STRING数据库中,得到PPI网络,见图7。利用cytoNCA插件筛选出相关性前10的核心基因,见图8。利用CytoHubba插件筛选出相关性最强的前10个基因,见图9。两种算法的结果交互最终筛选出5个关键基因,即血管性血友病因子(von Willebrand factor, vWF)、血管内皮生长因子A(vascular endothelial growth factor, VEGF-A)、Serping1、凋亡诱导因子1(AIF1)以及信号传导蛋白和转录激活物(signal transducers and activators of transcription 3, STAT3)。

3 讨论

视网膜新生血管是许多致盲性眼病的共同发病机制,如增殖性糖尿病视网膜病变(proliferative diabetic retinopathy, PDR)、视网膜静脉阻塞(retinal vein occlusion, RVO)、早产儿视网膜病变(retinopathy of prematurity, ROP)等^[17]。OIR模型是公认的视网膜新生血管动物模型,既往研究通过蛋白质组学分析发现了潜在的信号通路以及诊疗靶点,但病理性视网膜新生血管的产生机制尚不明确^[18-19]。

本研究通过筛选目标基因集中OIR模型(实验组)与对照视网膜组织的DEGs,对DEGs进行富集分析发现,DEGs多富集于细胞迁移、病毒/细菌感染、白细胞黏附、血管形成、细胞外调节蛋白激酶(ERK)以及丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)相关信号通路,这些功能富集通路均与免疫以及血管形成密切相关^[20-22]。通过免疫浸润分析发现实验组Th2细胞表达显著增多。Th2细胞是一种能够分泌Th2型细胞因子[如白介素(IL)-4、IL-5、IL-10、IL-13等]的T细胞亚群,属于CD4⁺T细胞。这些细胞因子能够促进Th2细胞增

2.5 PPI分析与关键基因的筛选 将 Memagesta 模块中的基因与2.1中的DEGs取交集,筛选出差异基因66个。将

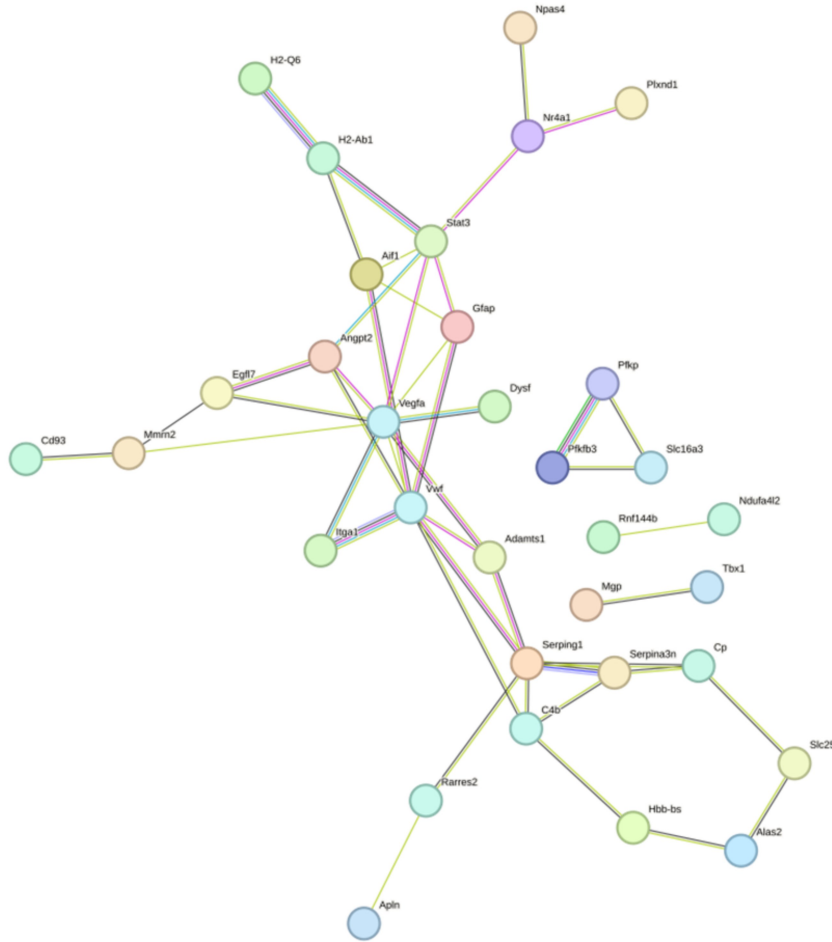


图 7 PPI 网络。

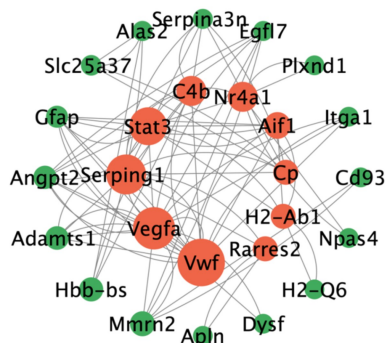


图 8 cytoNCA 插件可视化 各基因在共表达基因网络中的关键性与节点大小有关,节点越大则在网络中关键性越大。

殖,并抑制 Th1 细胞增殖,同时辅助 B 细胞活化,发挥体液免疫的作用^[23]。研究表明,Th1/Th2 细胞介导的免疫反应以及失衡参与糖尿病视网膜病变 (diabetic retinopathy, DR) 的发病^[24-25]。

本研究进一步通过 WGCNA 的方法筛选得到与差异表达免疫细胞相关的 DEGs,最后通过 PPI 分析得到与差异表达免疫细胞相关的关键基因,即 vWF、VEGF-A、Serping1、AIF1 以及 STAT3。vWF 是一种主要由内皮细胞合成的多聚糖蛋白,参与血小板黏附和聚集,并作为血浆中凝血因子 VIII 的载体。vWF 水平的增加反映了内皮细胞的激活或损伤,但血浆中 vWF 水平与 DR 病情的严重程度并无明显相关性,vWF 仅仅是血管内皮细胞损伤的证据,

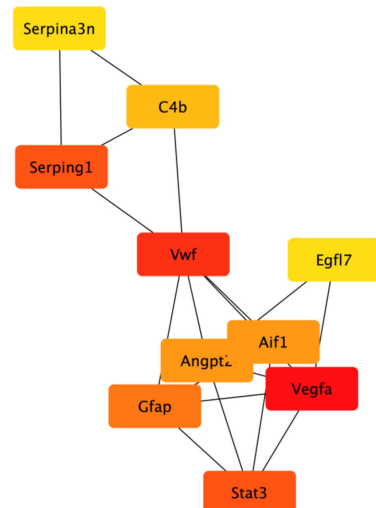


图 9 CytoHubba 插件筛选相关性前 10 的关键基因 各基因在共表达基因网络中的关键性与颜色深浅有关,颜色深提示基因关键。

vWF 水平的持续升高可能反映微血管病变的持续存在^[26]。vWF 可作为判断视网膜是否存在微血管损伤的潜在预测指标。VEGF-A 已被证实是影响视网膜新生血管的重要关键因子,研究证明抗 VEGF 治疗可消退视网膜新生血管^[27],并已应用于临床治疗视网膜新生血管以及脉络膜新生血管类疾病,如 DR、ROP、湿性年龄相关性黄斑变性 (wet age-related macular degeneration, wARMD)、息肉

样脉络膜血管病变 (polypoidal choroidal vasculopathy, PCV) 以及 RVO 等。Serping1 被认为对年龄相关性黄斑变性 (age-related macular degeneration, ARMD) 新生血管具有预测作用^[28]。由于 Serping1 在免疫反应中的特殊作用, Serping1 结合其他相关指标可在疾病早期有效鉴别成人隐匿性自身免疫性糖尿病 (LADA) 与 2 型糖尿病 (T2DM)^[29]。AIF1 是一种细胞骨架结合蛋白, 主要定位于细胞膜和细胞骨架, 具有促进细胞膜运动与 RAC 激活; 促进血管平滑肌细胞及 T 淋巴细胞增殖, 促进淋巴细胞迁移, 巨噬细胞激活; 重塑肌动蛋白细胞骨架; 参与活化小胶质细胞/巨噬细胞状态, 被广泛用作大脑和其他组织中的小胶质细胞/巨噬细胞的标记物等, 在小胶质细胞、T 淋巴细胞及外周血单核细胞中表达^[30-31]。AIF1 在机体的血管性疾病、移植排斥反应、炎症反应、自身免疫性疾病以及癌症中发挥重要作用^[32]。STAT3 广泛参与细胞增殖、分化、凋亡以及炎症等过程。STAT3 可通过激活 NF- κ B 相关信号通路促进各种炎性因子的表达, 促进新生血管性疾病中新生血管的形成及发展, 加速疾病进程, 加重疾病的严重程度, 其中包括各种癌症、DR 以及 ROP 等^[33-35]。

综上, 本研究筛选出 OIR 模型中 5 个免疫相关的靶基因, 并发现 OIR 模型中 Th2 细胞的免疫浸润水平显著增加。vWF、VEGF-A、Serping1、AIF1 以及 STAT3 可作为视网膜新生血管类疾病诊断和治疗的潜在靶点。本研究通过生物信息学手段, 利用 WGCNA 的方法, 筛选出免疫浸润差异模块中差异表达基因, 比既往的生物信息学研究^[36-37]所筛选的差异基因更有针对性, 聚焦于免疫相关的这一模块深入研究, 目的基因研究意义以及研究方向更明确。然而, 仍需要进一步研究来确认靶基因与免疫浸润之间的关系, 并确定靶基因和免疫浸润谱在视网膜新生血管性疾病发生发展中的作用。

参考文献

[1] 曹晖, 胡宏慧, 许迅, 等. 视网膜新生血管动物模型的制备. 眼科新进展, 2003, 23(5): 335-337.

[2] Zhou YD, Tan W, Zou JL, et al. Metabolomics analyses of mouse retinas in oxygen-induced retinopathy. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2021, 62(10): 9.

[3] Forrester JV, Xu H, Lambe T, et al. Immune privilege or privileged immunity? Mucosal Immunol, 2008, 1(5): 372-381.

[4] Streilein JW, Ma NL, Wenkel H, et al. Immunobiology and privilege of neuronal retina and pigment epithelium transplants. Vis Res, 2002, 42(4): 487-495.

[5] Avichezer D, Grajewski RS, Chan CC, et al. An immunologically privileged retinal antigen elicits tolerance. J Exp Med, 2003, 198(11): 1665-1676.

[6] Forrester JV, Xu HP. Good news-bad news: the Yin and Yang of immune privilege in the eye. Front Immun, 2012, 3: 338.

[7] Forrester JV, Xu HP, Kuffová L, et al. Dendritic cell physiology and function in the eye. Immunol Rev, 2010, 234(1): 282-304.

[8] Liu SY, Wang ZT, Zhu RH, et al. Three differential expression analysis methods for RNA sequencing: limma, EdgeR, DESeq2. J Vis Exp, 2021(175): 34605806.

[9] Zhang CJ, Zheng YX, Li X, et al. Genome-wide mutation profiling and related risk signature for prognosis of papillary renal cell carcinoma. Ann Transl Med, 2019, 7(18): 427.

[10] Kawada JI, Takeuchi S, Imai H, et al. Immune cell infiltration landscapes in pediatric acute myocarditis analyzed by CIBERSORT. J Cardiol, 2021, 77(2): 174-178.

[11] Chen ZY, Huang AF, Sun JY, et al. Inference of immune cell composition on the expression profiles of mouse tissue. Sci Rep, 2017, 7: 40508.

[12] Langfelder P, Horvath S. WGCNA: an R package for weighted correlation network analysis. BMC Bioinform, 2008, 9(1): 559.

[13] von Mering C, Huynen M, Jaeggi D, et al. STRING: a database of predicted functional associations between proteins. Nucleic Acids Res, 2003, 31(1): 258-261.

[14] Liu YS, Jin J, Chen YS, et al. Integrative analyses of biomarkers and pathways for adipose tissue after bariatric surgery. Adipocyte, 2020, 9(1): 384-400.

[15] Zhou S, Lu HC, Xiong M. Identifying immune cell infiltration and effective diagnostic biomarkers in rheumatoid arthritis by bioinformatics analysis. Front Immunol, 2021, 12: 726747.

[16] Yoshida A, Yoshida S, Ishibashi T, et al. Intraocular neovascularization. Histol Histopathol, 1999, 14(4): 1287-1294.

[17] Vähätupa M, Nättinen J, Jylhä A, et al. SWATH-MS proteomic analysis of oxygen-induced retinopathy reveals novel potential therapeutic targets. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2018, 59(8): 3294-3306.

[18] Kim SJ, Jin J, Kim YJ, et al. Retinal proteome analysis in a mouse model of oxygen-induced retinopathy. J Proteome Res, 2012, 11(11): 5186-5203.

[19] Vähätupa M, Järvinen TAH, Uusitalo-Järvinen H. Exploration of oxygen-induced retinopathy model to discover new therapeutic drug targets in retinopathies. Front Pharmacol, 2020, 11: 873.

[20] Serra AM, Waddell J, Manivannan A, et al. CD11b+ bone marrow-derived monocytes are the major leukocyte subset responsible for retinal capillary leukostasis in experimental diabetes in mouse and express high levels of CCR5 in the circulation. Am J Pathol, 2012, 181(2): 719-727.

[21] Chibber R, Ben-Mahmud B, Chibber S, et al. Leukocytes in diabetic retinopathy. Curr Diabetes Rev, 2007, 3(1): 3-14.

[22] Portillo JC, Lopez Corcino Y, Miao YL, et al. CD40 in retinal Müller cells induces P2X7-dependent cytokine expression in macrophages/microglia in diabetic mice and development of early experimental diabetic retinopathy. Diabetes, 2017, 66(2): 483-493.

[23] 曹雪涛. 医学免疫学. 6版. 北京: 人民卫生出版社, 2013: 90-91, 110-113, 145-147.

[24] Takeuchi M, Sato T, Tanaka A, et al. Elevated levels of cytokines associated with Th2 and Th17 cells in vitreous fluid of proliferative diabetic retinopathy patients. PLoS One, 2015, 10(9): e0137358.

[25] Cao YL, Zhang FQ, Hao FQ. Th1/Th2 cytokine expression in diabetic retinopathy. Genet Mol Res, 2016, 15(3): 27525838.

[26] Paton RC, Passa P, Canivet J. Von Willebrand factor, diabetes mellitus and retinopathy. Horm Metab Res Suppl, 1981, 11: 55-58.

[27] Uemura A, Fruttiger M, D'Amore PA, et al. VEGFR1 signaling in retinal angiogenesis and microinflammation. Prog Retin Eye Res, 2021, 84: 100954.

[28] Ponard D, Gaboriaud C, Charignon D, et al. SERPING1 mutation update: mutation spectrum and C1 Inhibitor phenotypes. *Hum Mutat*, 2020,41(1):38-57.

[29] 秦雯, 张佳俐, 夏宁. 成人隐性自身免疫性糖尿病早期血浆 SERPING1 的变化及意义. *天津医药*, 2014,42(5):458-461.

[30] Ito D, Imai Y, Ohsawa K, et al. Microglia-specific localisation of a novel calcium binding protein, Iba1. *Mol Brain Res*, 1998,57(1):1-9.

[31] De Leon-Oliva D, Garcia-Montero C, Fraile-Martinez O, et al. AIF1: function and connection with inflammatory diseases. *Biology*, 2023,12(5):694.

[32] 黄欣媛, 陈正望. Daintain/AIF-1:一个疾病相关的多功能炎症因子. *现代生物医学进展*, 2010,10(14):2768-2772.

[33] Marrero B, He C, Oh HM, et al. Persistent activation of STAT3 pathway in the retina induced vision impairment and retinal degenerative

changes in ageing mice. *Adv Exp Med Biol*, 2019,1185:353-358.

[34] Cai YH, Zhang XB, Xu XG, et al. Effects of puerarin on the retina and STAT3 expression in diabetic rats. *Exp Ther Med*, 2017,14(6):5480-5484.

[35] Li J, Yu SS, Lu X, et al. The phase changes of M1/M2 phenotype of microglia/macrophage following oxygen-induced retinopathy in mice. *Inflamm Res*, 2021,70(2):183-192.

[36] Xie RL, Nie HY, Xu YX. Identification of hub genes for glaucoma: a study based on bioinformatics analysis and experimental verification. *Int J Ophthalmol*, 2023,16(7):1015-1025.

[37] Li P, Wang L, Liu Q, et al. Bioinformatics and *in vitro* study reveal the roles of microRNA-346 in high glucose-induced human retinal pigment epithelial cell damage. *Int J Ophthalmol*, 2023,16(11):1756-1765.

国际眼科杂志中文版 (IES) 近 5 年影响因子趋势图

