

网络出版时间:2024-04-11 21:52:10 网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20240410.1008.004

生物信息学分析及实验验证探索抗中性粒细胞胞质抗体相关性血管炎炎症应答候选基因及分子机制

张冬梅^{1,2}, 张妍楠^{1,2}, 秦建华^{1,2}, 欧三桃^{1,2}, 吴蔚桦^{1,2}

摘要 **目的** 通过生物信息学方法及实验验证探索抗中性粒细胞胞质抗体(ANCA)相关性血管炎炎症应答候选基因及潜在的分子机制,为治疗 ANCA 相关性血管炎潜在炎症靶标提供科学的理论依据。**方法** 从 GEO 数据库检索获得 GSE108109 芯片数据,利用 R 语言相关程序包处理、分析并筛选出差异基因。利用 DAVID 在线网站进行京都基因与基因组百科全书(KEGG)和基因本体(GO)富集分析,并通过 STRING 网站构建炎症候选基因编码蛋白的相互作用网络。进一步通过 miRWalk 和 DIANA-LncBase 数据库预测并构建内源性竞争性 RNA(ceRNA)调控网络,并从网络中筛选出关键基因绘制 ROC 曲线。纳入西南医科大学附属医院确诊并经肾穿刺活检证实的 ANCA 相关性血管炎患者肾组织标本进行验证,以非 ANCA 相关性血管炎患者肾组织标本(IgA 肾病、微小病变型肾病)为对照组。对收集到的肾组织标本进行免疫组化染色,并通过免疫组化染色半定量分析计算平均光密度,进一步验证生信分析筛选出的关键基因的表达情况,同时将关键基因的平均光密度值与炎症指标进行 Pearson 线性相关性分析。**结果** 共筛选出差异表达基因 846 个,其中 444 个基因表达明显上调,402 个基因表达明显下调。通过 KEGG 和 GO 富集分析获得了与炎症调控相关的重要差异表达基因,其中 CSF1R 和 TNFRSF1B 为首次在 ANCA 相关性血管炎中报道的差异基因。同时构建了包括 KCNQ1OT1-hsa-miR-125a-5p-TNFRSF1B 在内的多条内源性竞争 RNA(ceRNA)调控轴。收集到 ANCA 相关性血管炎标本 15 例,IgA 肾病标本 6 例,微小病变型肾标本 3 例。肾穿组织标本的免疫组化结果提示 CSF1R、TNFRSF1B 在 ANCA 相关性血管炎肾组织表达较对照组均有升高,对 ANCA 组患者临床数据做 Pearson 相关性分析,得出 CSF1R 的表达量与中性粒细胞计数含量呈正相关($r=0.587$),TNFRSF1B 的表达量和血清 C 反应蛋白含量呈正相关($r=0.646$)。**结论** 通过生物信息学的方法筛选出 CSF1R 和 TNFRSF1B 等参与炎症调节的关键基因,构建了严密的 ceRNA 调控网络,并通过

免疫组化验证了 CSF1R 和 TNFRSF1B 在 ANCA 血管炎中的表达较对照组升高。为深入探究 ANCA 相关性血管炎发生发展的炎症分子机制及发掘新的炎症治疗靶点提供科学的理论依据。

关键词 ANCA 相关性血管炎;生物信息学分析;CSF1R;TNFRSF1B;炎症;内源性竞争 RNA

中图分类号 R 593.2

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2024)04-0581-09
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.04.004

抗中性粒细胞胞质抗体(antineutrophil cytoplasmic antibody, ANCA)相关性血管炎是一类由 ANCA 导致的以小血管壁炎症和纤维素样坏死为特征的一类系统性自身免疫性疾病。ANCA 相关性血管炎的核心发病机制是 ANCA 导致中性粒细胞过度激活,释放炎症细胞因子、活性氧和裂解酶,从而损伤血管内皮细胞^[1]。既往对 ANCA 相关性血管炎炎症应答机制并不完全清楚,新近兴起的基于 NCBI-基因表达综合(gene expression omnibus, GEO)数据库等资源的生信分析方法为进一步探索 ANCA 相关性血管炎炎症应答机制提供了可能。该研究拟综合使用 GEO 数据库、DAVID 6.8 在线平台对 ANCA 相关性血管炎差异表达基因进行筛选、京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)和基因本体(gene ontology, GO)富集分析以及识别这些差异基因编码的蛋白质之间的相互作用及通路关系,最终筛选出 ANCA 相关性血管炎炎症表达候选基因,并通过 miRWalk 和 DIANA-LncBase 数据库预测并构建内源性竞争性 RNA(competing endogenous RNAs, ceRNA)调控网络,为进一步进行验证试验提供科学基础,为治疗 ANCA 相关性血管炎提供新的思路和靶点。

1 材料与方法

1.1 ANCA 相关性血管炎微阵列数据集采集及下载 从 GEO 数据库中下载 ANCA 相关性血管炎基因表达谱。筛选条件如下:①关键词:ANCA 相关性血管炎;②条目类型:系列(series);③研究类型:

2024-01-30 接收

基金项目:四川省卫生健康委员会医学科技项目(编号:21PJ099)

作者单位:¹西南医科大学附属医院肾病内科,泸州 646000

²四川省肾脏疾病临床研究中心,泸州 646000

作者简介:张冬梅,女,住院医师;

吴蔚桦,男,副主任医师,硕士生导师,责任作者,E-mail:12390369@qq.com

表达谱分析;④ 属性:组织;⑤ 物种:人类;⑥ 肾脏组织定位:肾小球。

1.2 筛选差异表达基因 利用 R 软件(版本:4.0.2)进行数据的预处理。使用 R 软件的 limma 软件包进行差异表达基因的筛选。将 P 值小于 0.05 且 logFC(差异倍数)的绝对值大于 1 作为筛选差异表达基因的条件,当同时满足上述条件是认为差异基因的表达具有统计学意义。利用 ggplot2 软件包制作差异表达基因的火山图。利用 pheatmap 软件包(版本:1.0.12)制作前 50 个差异表达基因的热图。

1.3 差异基因富集分析 利用 DAVID 6.8 (<https://david.ncifcrf.gov/>) 在线平台对所有差异表达基因进行 GO 和京都基因与基因组百科全书通路(KEGG Pathway)富集分析。设置 $P < 0.05$ 。利用在线绘图工具(<http://www.bioinformatics.com.cn>)将富集分析结果进行可视化,结果分别以柱状图及气泡图展示。

1.4 炎症应答相关差异基因的 PPI 网络构建 通过上述富集分析,鉴别出富集在炎症应答集群中的差异表达基因。利用 STRING (<http://string-db.org/>) 来识别这些差异基因编码的蛋白质之间的相互作用及通路关系,并利用作图软件 Cytoscape 将结果进行可视化(版本:3.7.1)。

1.5 预测炎症应答相关基因微小 RNA (microRNA, miRNA) 使用在线数据库 miRWalk 3.0 预测富集在炎症应答集群中的差异表达基因的 miRNA。筛选出同时在 TargetScan 和 miRDB 数据库中存在的 miRNA,建立 mRNA-miRNA 相互作用网络,并利用作图软件 Cytoscape 将结果可视化(版本:3.7.1)。

1.6 构建炎症相关基因 ceRNA 网络 使用 DIANA-LncBase v.2 数据库筛选与上述 miRNA 相互关联的长非编码 RNA(long non-coding RNA, lncRNA)。筛选条件如下:① miRNA 与 lncRNA 相互作用经过免疫沉淀法证实;② lncRNA 富集在肾脏;③ 评分(pr. score) > 0.9 。在 miRNA-mRNA 和 lncRNA-miRNA 相互作用的基础上,建立了 ceRNA 调控网络,利用在线绘图工具(<http://www.bioinformatics.com.cn>)将结果进行可视化,结果以对冲图展示。

1.7 关键基因疗效评价 通过上述 PPI 分析及 ceRNA 调控网络构建,筛选出富集在炎症应答集群中的关键差异表达基因 CSF1R 和 TNFRSF1B。通过在线绘图工具(<http://www.bioinformatics.com.cn>)

绘制关键基因的 ROC 曲线。ROC 曲线采用敏感性、特异性和 ROC 曲线下面积(area under the curve, AUC)进行解释,以此来评估关键基因区分对照组和 ANCA 相关性血管炎患者的效能。

1.8 关键差异基因的验证 经检索本院 LIS 系统及病理诊断系统,纳入 2013 年 1 月-2022 年 3 月在西南医科大学附属医院就诊的患者,其中 ANCA 相关性血管炎 15 例,微小病变型肾病 3 例,IgA 肾病 15 例,所有患者均按照肾活检诊断要求行 HE、PAS、Masson 染色及电镜诊断。在光镜下重新阅片,评估间质炎症细胞浸润程度,对照组为 HE 染色光镜下观察无明显炎症细胞浸润者纳入研究:微小病变性肾病 3 例,IgA 肾病 6 例,实验组为 15 例 ANCA 相关性血管炎。以上病例均为初诊,取材时未行糖皮质激素及免疫抑制剂治疗。选择合适的切片进行免疫组织化学染色,烤片 1 h 后依次进行脱蜡、水化,使用 3% H_2O_2 抑制内源性过氧化物酶,用枸橼酸钠缓冲液在微波炉中进行抗原修复,5% 牛血清白蛋白(BSA)常温封闭 1 h,弃去封闭液后加入一抗稀释液,切片置于湿盒中放 $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱过夜。次日使用磷酸盐缓冲液(PBS)清洗后继续予以二抗稀释液孵育,室温孵育 30 min 后用 PBS 清洗,加入二氨基联苯胺(DAB)显色,显微镜下观察效果,苏木精复染细胞核,脱水透明后中性树脂封片,通风处晾干于明场显微镜下观察拍摄。同时将 ANCA 组的平均光密度值(mean optical density, MOD)值与临床炎症指标(包括白细胞计数、中性粒细胞计数、C 反应蛋白)做 Pearson 相关性分析。

1.9 统计学处理 使用 SPSS(Version:26.0)进行统计学分析,符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间两两比较采用 t 检验,非参数检验采用卡方检验,多组间比较采用单因素方差分析,相关性分析采用 Pearson 线性相关分析,并用 Graphpad prism (Version:8.0.1)绘制图片。

2 结果

2.1 ANCA 相关性血管炎差异基因的筛选结果

基于上述筛选条件,收集并下载了数据集 GSE108109。该数据集平台为 GPL19983,其中包括 6 个对照组标本和 15 个 ANCA 相关性血管炎标本。通过 R 语言对数据集 GSE108109 进行标准化预处理(图 1A)。利用 R 软件的 limma 软件包,总共得到差异表达基因(DEGs)846 个,其中 444 个基因表达明显上调,402 个基因表达明显下调。火山图展

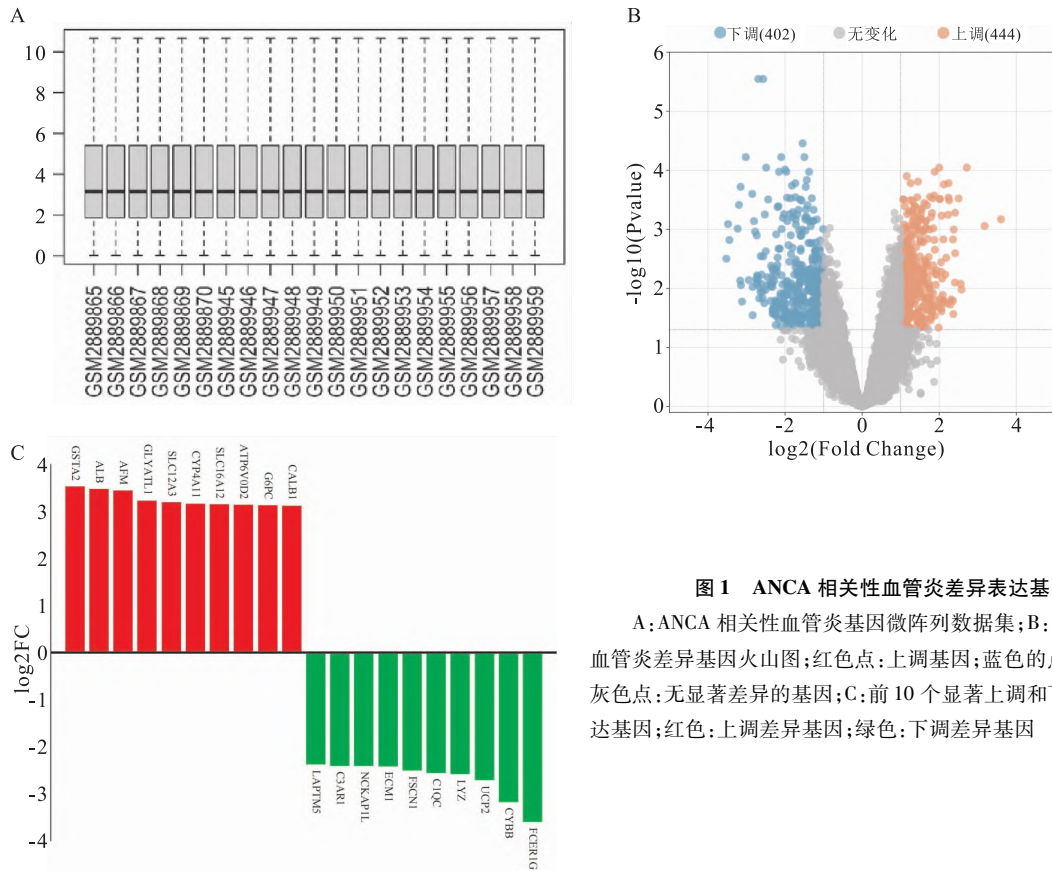


图 1 ANCA 相关性血管炎差异表达基因

A: ANCA 相关性血管炎基因微阵列数据集; B: ANCA 相关性血管炎差异基因火山图; 红色点: 上调基因; 蓝色的点: 下调基因; 灰色点: 无显著差异的基因; C: 前 10 个显著上调和下调的差异表达基因; 红色: 上调差异基因; 绿色: 下调差异基因

示了差异基因的表达水平(图 1B)。前 10 个差异显著的上调基因是 FCER1G、CYBB、UCP2、LYZ、C1QC、FSCN1、ECM1、NCKAP1L、C3AR1。前 10 个差异显著的下调基因是 GSTA2、ALB、AFM、GLYATL1、SLC12A3、CTP4A11、SLC16A12、ATP6V0D2、CALB1、EGF(图 1C)。使用 pheatmap 软件包绘制了前 50 个差异表达基因的热图(图 2)，每一行代表一个独立的基因;每一列代表一个独立的样本。层次聚类分析表明,根据 mRNA 表达的不同模式可以将对照组和 ANCA 相关性血管炎患者进行区分。

2.2 差异基因富集分析 利用 DAVID 在线分析工具对 ANCA 相关性血管炎数据集(GSE108109)中差异表达基因进行 KEGG 富集分析,其结果见图 3A。KEGG 分析显示差异表达基因主要富集在补体途径、抗坏血酸和藻酸盐代谢、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸代谢、蛋白质消化和吸收、细胞色素 P450 对异种物质的代谢、癌症中的蛋白聚糖、耶尔森菌感染、戊糖和葡萄糖醛酸转化、色氨酸代谢、精氨酸和脯氨酸代谢、破骨细胞分化、金黄色葡萄球菌感染、丁酸盐代谢、药物-细胞色素 P450 代谢、百日咳、糖尿病

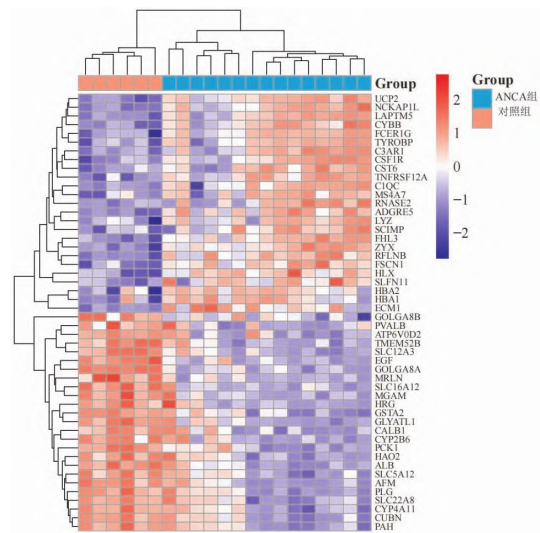


图 2 ANCA 相关血管炎前 50 个差异表达基因热图

并发症中的 AGE-RAGE 信号通路、甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢途径等。同时,对所有差异表达基因的细胞组成、生物过程和分子功能进行了富集分析,结果见图 3B,发现其主要富集于炎症反应、血管生成、细胞迁移的正调节、细胞形状调节、外源代谢过程、血红素结合、跨膜转运蛋白活性、蛋白质结合等。

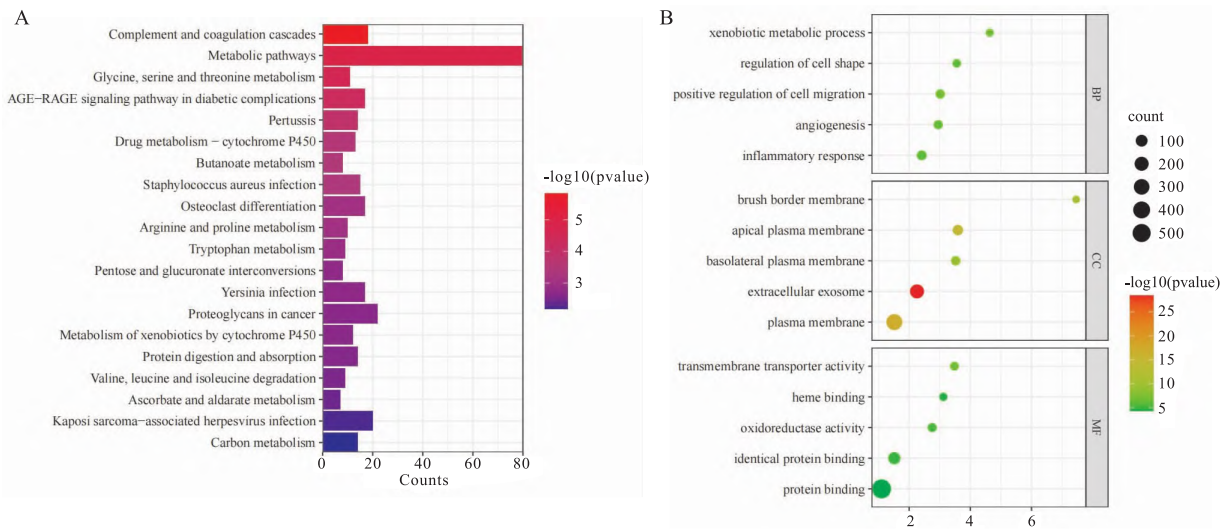


图3 ANCA 相关性血管炎差异表达基因富集分析

A: ANCA 相关性血管炎 KEGG 富集分析; B: ANCA 相关性血管炎 GO 富集分析

2.3 炎症应答相关差异基因的 PPI 网络构建 通过 GO 富集分析,共得到 37 个富集在炎症应答生物学过程的差异表达基因。利用 STRING (<http://string-db.org/>) 构建炎症应答差异基因表达产物的 PPI 网络。去除孤立的节点,并利用 Cytoscape 软件可视化,结果如图 4 所示。该网络包含了 34 个关键基因,分别是 CSF1R、HDAC5、SEMA7A、NRROS、CSF1、C5AR1、PTGER3、ITGB2、TNFRSF11B、FPR3、TNF、RELA、PIK3CG、KNG1、RELB、C3、PYCARD、CD97、C3AR1、CCR1、LYN、TGFB1、ANXA1、CD180、CYBB、FOS、TNFRSF1B、LYZ、HCK、BMP2、VNN1、AXL、NOX4、TLR7。这些差异表达基因可能是调控炎症反应及参与炎症应答的关键候选基因。

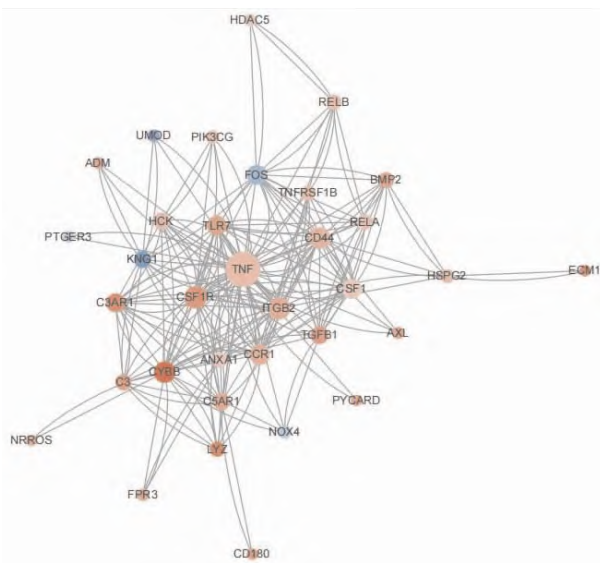


图4 炎症应答相关差异表达基因 PPI 相互作用网络

2.4 miRNA 及 ceRNA 网络构建 共有 19 个 miRNA (如 hsa-miR-22-3p、hsa-let-7e-5p、hsa-miR-92a-3p 和 hsa-miR-331-3p)、2 个下调基因 (PTGER3 和 FOS)、7 个上调基因 (TNFRSF1B、CSF1R、ADGRE5、HDAC5、CD180、AXL 和 SEMA7A) 在 mRNA-miRNA 相互作用网络中 (图 5)。通过 DIANA-LncBase v. 2 数据库筛选并构建 ceRNA 调控网络,该网络包含 12 个 miRNA (如 hsa-miR-22-3p、hsa-miR-125a-5p 和 hsa-miR-331-3p)、5 个上调差异表达基因 (ADGRE5、AXL、CSF1R、HDAC5 和 TNFRSF1B),同时包括了 19 个 lncRNA (如 KCNQ1OT1、XIST、NEAT1、CASC7 和 MALAT1 等)。值得注意的是,这许多相互作用的调控轴中包括 KCNQ1OT1-hsa-miR-125a-5p-TNFRSF1B (图 6)。

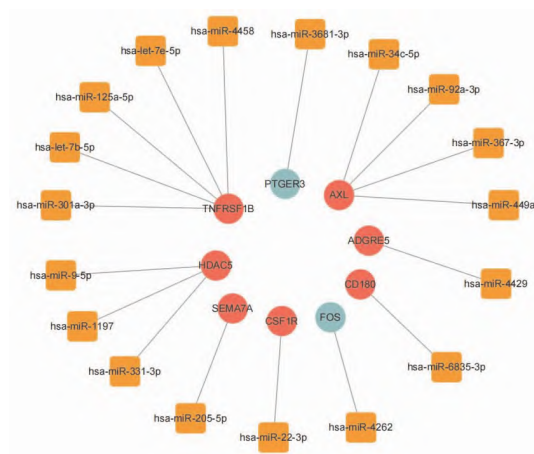


图5 miRNA-mRNA 预测网络图

方形: miRNA; 圆圈: 差异基因; 红色: 上调基因; 绿色: 下调基因; 线条: miRNA 和差异基因之间的相互调控网络

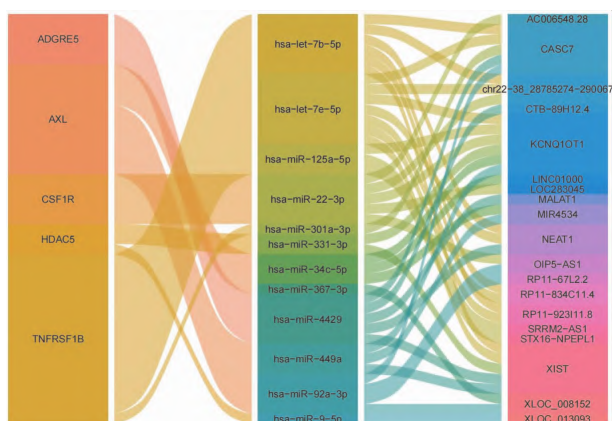


图6 lncRNA-miRNA-基因调控对冲图

表1 MCC方法筛选关键炎症应答差异表达基因

排序	基因名称	得分
1	TNF	2 058
2	CSF1R	1 854
3	ITGB2	1 718
4	CCR1	1 716
5	C3AR1	1 584
6	CYBB	1 472
7	TLR7	1 082
8	HCK	726
9	CD44	396
10	CSF1	276
11	FOS	160
12	C5AR1	145
13	TGFB1	132
14	BMP2	122
15	C3	32
16	LYZ	26
17	KNG1	14
17	TNFRSF1B	14
17	RELA	14
20	RELB	10

2.5 关键炎症应答基因的筛查及疗效评价

用 Cytoscape 中的 cytohubba 插件筛选关键炎症应答基因。利用 MCC 算法筛选出富集在炎症应答集群中的关键差异表达基因,结果如表 1 所示。在 PUBMED 在线网站上搜索与 ANCA 相关性血管报道较少的基因作为新的候选炎症应答差异表达基因,最终筛选出 CSF1R 和 TNFRSF1B 这两个基因。通过在线绘图工具 (<http://www.bioinformatics.com.cn>) 绘制两个关键基因的 ROC 曲线,计算曲线下面积。两个差异基因 CSF1R 和 TNFRSF1B 的曲线下面积均大于 0.9 (图 7)。说明这两个基因的表达模式可以将对照组和 ANCA 相关性血管炎患者区分开来。

2.6 关键差异表达基因的验证 通过免疫组化染色检测关键炎症应答基因在 ANCA 相关性血管炎患者肾脏组织中的表达,与上述生物信息学分析结

果一致,相比于对照组,CSF1R 和 TNFRSF1B 在 ANCA 相关性血管炎患者中均显著表达,见图 8A、8B。计算各组关键基因的平均光密度值,ANCA 相关性血管炎组 CSF1R 平均光密度值为 0.0636 ± 0.0200 , TNFRSF1B 平均光密度值为 0.0516 ± 0.0257 , IgA 肾病组 CSF1R 平均光密度值为 0.0379 ± 0.0063 , TNFRSF1B 平均光密度值为 0.0245 ± 0.0055 ,微小病变组 CSF1R 平均光密度值为 0.0277 ± 0.0078 , TNFRSF1B 平均光密度值为 0.0234 ± 0.0076 , ANCA 相关性血管炎组的两个关键基因的平均光密度值均较对照组明显升高,差异均有统计学意义 ($P <$

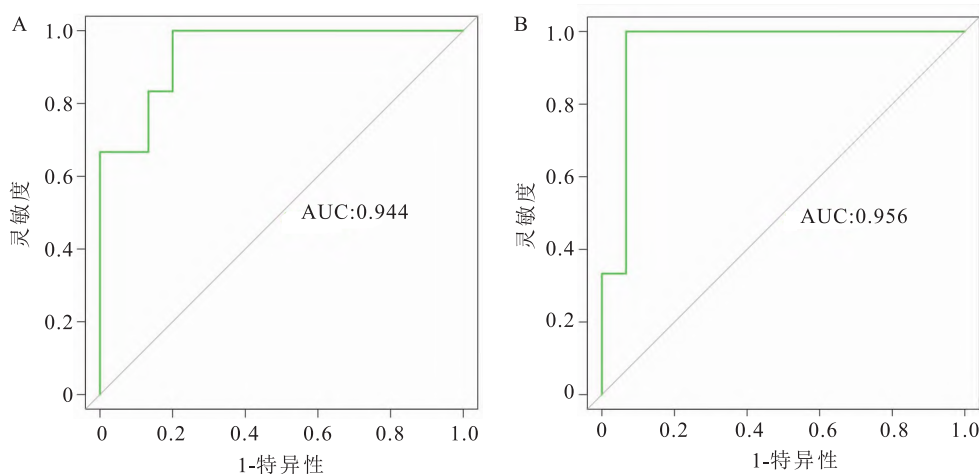


图7 CSF1R 和 TNFRSF1B 的 ROC 曲线

A:CSF1R 的 ROC 曲线;B:TNFRSF1B 的 ROC 曲线

0.05),见图8C。同时将 ANCA 组患者的 MOD 值与临床炎症指标(包括白细胞计数、中性粒细胞计数、C 反应蛋白)做 Pearson 相关性分析,发现 CSF1R 组的表达量与中性粒细胞计数含量呈正相关($r = 0.587, P < 0.05$),TNFRSF1B 组的表达量和血清 C

反应蛋白含量呈正相关($r = 0.646, P < 0.05$),见图9。

3 讨论

ANCA 相关性血管炎是一类由抗中性粒细胞胞

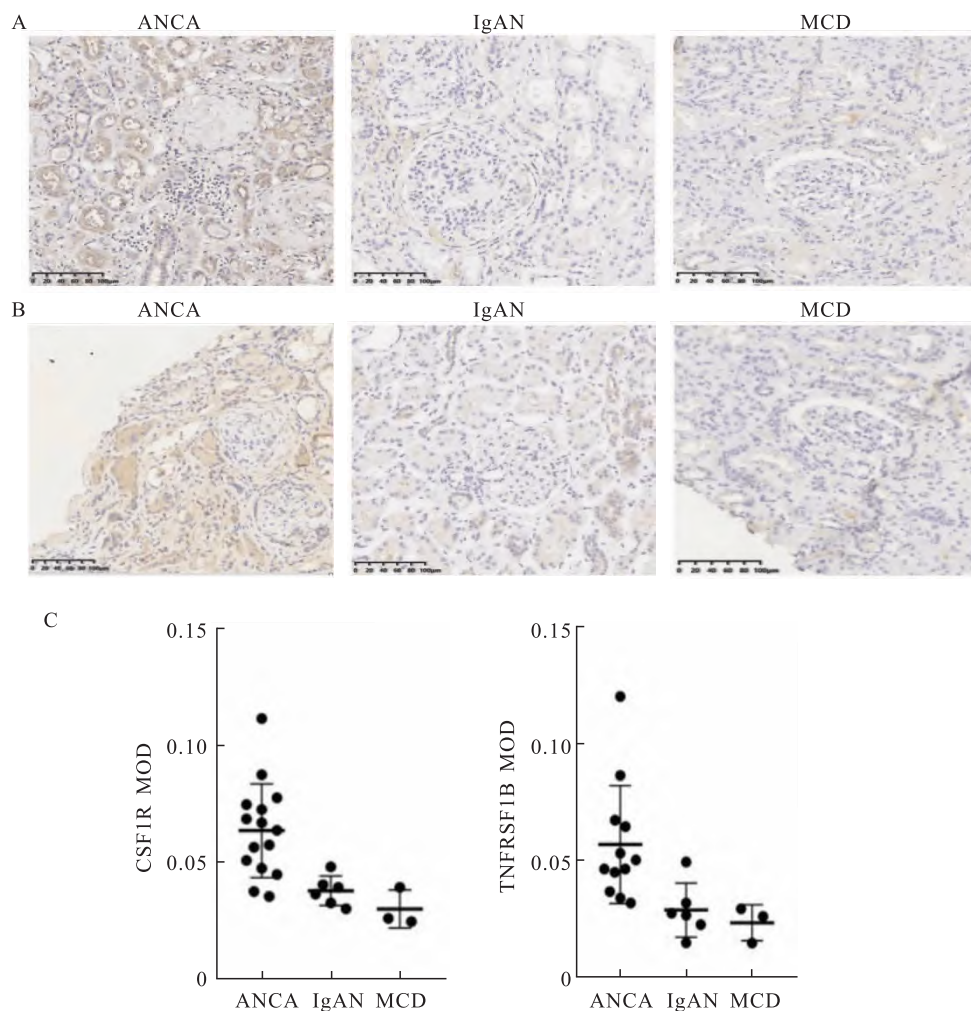


图8 对照组与 ANCA 组肾组织的 IHC 染色结果图 ×400

A:CSF1R 抗体标记;B:TNFRSF1B 抗体标记; C:CSF1R 和 TNFRSF1B 在各组的平均光密度

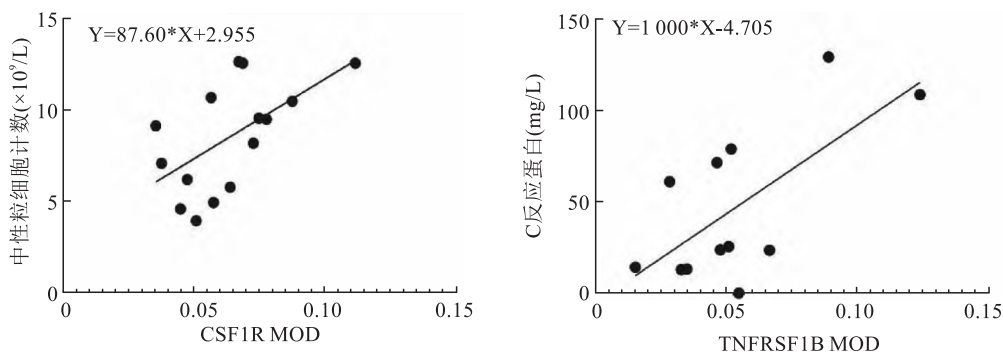


图9 ANCA 组 CSF1R、TNFRSF1B 的 MOD 与炎症指标的相关性分析

质抗体介导的慢性自身免疫性疾病。近来研究证实 ANCA 可通过免疫系统过度激活、释放炎症细胞因子溶解酶等机制致病^[2]。AAV 的发生和多种免疫细胞相关,目前已经有针对 B 细胞、T 细胞和补体^[3-4]的新型药物,除此之外,针对中性粒细胞、单核-巨噬细胞及其相关衍生因子也是当下治疗的研究热点之一^[5]。

本研究通过分析 GSE108109 芯片数据集,筛选出 846 个差异表达基因,其中 444 个基因表达上调,402 个基因表达下调。在 KEGG 信号通路分析中,发现差异基因主要富集在补体和凝血级联反应、金黄色葡萄球菌感染、氨基酸代谢等信号通路。在 GO 生物功能分析中,发现许多参与炎症调控的重要差异表达基因,包括 CSF1R、HDAC5、SEMA7A、NRROS、CSF1、C5AR1、PTGER3、ITGB2、TNFRSF11B、FPR3、TNF、RELA、PIK3CG、KNG1、RELB、C3、PYCARD、CD97、C3AR1、CCR1、LYN、TGFB1、ANXA1、CD180、CYBB、FOS、TNFRSF1B、VNN1、AXL、NOX4、TLR7。因此本研究进一步构建了这些炎症调控相关差异基因的 ceRNA 调控互作网络,通过 MCC 算法筛选出富集在炎症应答集群中的关键差异表达基因 CSF1R 和 TNFRSF1B,并发现了包括 KCNQ10T1-hsa-miR-125a-5p-TNFRSF1B 在内的多条调控轴。同时在 ANCA 相关性血管炎患者肾脏组织上对两个关键基因的表达进行验证,其与生信分析结果一致,证实了 CSF1R 和 TNFRSF1B 在 ANCA 相关性血管炎患者肾脏中的表达较对照组均显著升高。

CSF1R 是由 CSF1R 基因编码的一种细胞表面蛋白,通过与配体 CSF1 和 IL-34 结合,参与调节巨噬细胞稳态,在先天免疫和炎症中扮演重要角色。CSF1R 最主要配体是 CSF1,在肿瘤、炎症等病理状态下,机体 CSF1 的水平显著上升,募集巨噬细胞向炎症部位移动,控制组织的稳态和修复^[6-7]。募集巨噬细胞后,局部的 CSF1 显著增多以促进巨噬细胞成熟^[8]。Lenzo et al^[9]认为在稳态条件下和某些炎症反应中,CSF1R 信号在相对较晚的阶段控制巨噬细胞谱系的发展。越来越多的研究证实在 ANCA 相关性血管炎中存在众多与巨噬细胞极化相关的标志物。对 AAV 患者的体外和组织学研究显示,CD206 和 CD163 的表达显著增加,这些标志物与选择性激活的巨噬细胞(M2)相关^[10]。活化的巨噬细胞可能释放多种炎症细胞因子,包括 IL-6、IL-8 等^[11-12],从而调节 ANCA 相关性血管炎的炎症反

应。本研究中 GO 分析证实 CSF1R 富集在炎症调节生物作用中,同时 ROC 曲线证实 CSF1R 的差异表达可以将正常人和 AAV 患者进行区分。在后续的实验观察到,在 ANCA 相关性血管炎肾活检标本中,CSF1R 的表达量较对照组明显升高。因此推测 CSF1/CSF1R 通路很可能通过调控巨噬细胞产生的级联反应,从而促进炎症的发生,故运用 CSF1R 抑制剂可能成为 ANCA 相关性血管炎潜在的治疗策略。

TNFRSF1B 是肿瘤坏死因子受体超家族(TNFRSF)的成员之一,又称肿瘤坏死因子受体 2(TNFR2),是 TNF- α 的主要受体之一,参与组织再生的调控。由于 TNF- α 的促炎作用,抗 TNF- α 的药物被用于治疗炎症和自身免疫性疾病。然而,抗肿瘤坏死因子药物仍具有局限性,可能是因为其通过两种不同的 TNF 受体(TNFR1 和 TNFR2)实现多效性生物学功能。TNFR1 主要介导 TNF 促凋亡和促炎功能,而 TNFR2 激活后募集 TRAF2、cIAP1/cIAP2^[13]、HOIP^[14]形成 TNFR2 信号复合物(SC),有利于免疫调节和组织再生。TNFR2 在体内外可促进调节性 T 细胞(regulatory T cells, Treg)的分化和功能,提示 TNFR2 是一个关键的免疫调节因子。因此,选择靶向 TNFR2 而不靶向 TNF- α 更为重要。研究表明 TNF-TNFR2 信号通路可抑制 Th2 和 Th17 的极化缓解气道过敏炎症^[15],反之,TNF/TNFR2 信号通路受损可增强 Th2 和 Th17 极化,加重过敏性气道炎症^[16]。许多 T 细胞和 ANCA 相关血管炎关系密切^[17-18]。在活动性 ANCA 相关血管炎中,Th17 相关的 CCL20 表达升高,而 Th2 相关的 CCL22 血浆趋化因子表达降低^[19],这两种细胞因子均涉及免疫调节和炎症过程。结合本研究结果分析,TNFR2 在 ANCA 相关性血管炎患者中表达显著升高,其相关通路信号激活,可能促进炎症的进展。因此,TNFR2 抑制剂可能会改善 ANCA 相关性血管炎的炎症反应,成为 ANCA 相关性血管炎治疗的新选择。

本研究还进一步构建了炎症相关基因 ceRNA 网络。其中值得注意的是 KCNQ10T1-hsa-miR-125a-5p-TNFRSF1B 调控轴。lncRNA KCNQ10T1 具有调节炎症的作用,可通过 miR-381-3p/ETS2 轴调控 ARDS 小鼠的炎症反应^[20],也可通过 I κ B α 抑制内膜增生血管平滑肌细胞的炎症和增殖^[21]。miR-125a-5p 参与调节巨噬细胞的激活和炎症反应^[22],通过 miR-125a-5p/TRAF6/TAK1 轴促进巨噬细胞 M2 极化,可改善脂多糖(LPS)诱导的炎症^[23]。已

有研究^[24]证实过表达 miR-125a-5p 可抑制 TNFRSF1B,促进破骨细胞分化。因此,根据 ceRNA 调控网络推测在 ANCA 相关性血管炎中,TNFRSF1B 可能受到 KCNQ1OT1-hsa-miR-125a-5p-TNFRSF1B 轴的调节,这需要进一步研究证实。

综上所述,本研究通过生物信息学分析揭示了 ANCA 相关性血管炎中炎症应答候选基因及可能的分子机制。筛选出 CSF1R 和 TNFRSF1B 这两个参与炎症调节的关键基因,并通过不同的数据库构建出严密的 ceRNA 调控网络,同时进一步证实了 CSF1R 和 TNFRSF1B 在 ANCA 相关性血管炎患者肾脏组织中表达明显升高。这些结果将有助于阐明 ANCA 相关性血管炎发生、发展的炎症相关分子机制,并为 ANCA 相关性血管炎的治疗提供全新的潜在的靶点。

参考文献

- [1] Falk R J, Terrell R S, Charles L A, et al. Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies induce neutrophils to degranulate and produce oxygen radicals *in vitro* [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1990,87(11):4115-9.
- [2] Alba M A, Jennette J C, Falk R J. Pathogenesis of ANCA-associated pulmonary vasculitis [J]. *Semin Respir Crit Care Med*, 2018,39(4):413-24.
- [3] Wynn T A, Barron L. Macrophages: master regulators of inflammation and fibrosis [J]. *Semin Liver Dis*, 2010,30(3):245-57.
- [4] Wikman A, Fagergren A, Gunnar O J S, et al. Monocyte activation and relationship to anti-proteinase 3 in acute vasculitis [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2003,18(9):1792-9.
- [5] Ohlsson S, Wieslander J, Segelmark M. Circulating cytokine profile in anti-neutrophilic cytoplasmic autoantibody-associated vasculitis: prediction of outcome? [J]. *Mediators Inflamm*, 2004,13(4):275-83.
- [6] Rojo R, Raper A, Ozdemir D D, et al. Deletion of a *Csf1r* enhancer selectively impacts CSF1R expression and development of tissue macrophage populations [J]. *Nat Commun*, 2019,10(1):3215.
- [7] Stanley E R, Chitu V. CSF-1 receptor signaling in myeloid cells [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2014,6(6):a021857.
- [8] Irvine K M, Andrews M R, Fernandez-Rojo M A, et al. Colony-stimulating factor-1 (CSF-1) delivers a proatherogenic signal to human macrophages [J]. *J Leukoc Biol*, 2009,85(2):278-88.
- [9] Lenzo J C, Turner A L, Cook A D, et al. Control of macrophage lineage populations by CSF-1 receptor and GM-CSF in homeostasis and inflammation [J]. *Immunol Cell Biol*, 2012,90(4):429-40.
- [10] Popat R J, Hakki S, Thakker A, et al. Anti-myeloperoxidase antibodies attenuate the monocyte response to LPS and shape macrophage development [J]. *JCI Insight*, 2017,2(2):e87379.
- [11] Matsumoto K, Suzuki K, Yoshimoto K, et al. Longitudinal immune cell monitoring identified CD14(++) CD16(+) intermediate monocyte as a marker of relapse in patients with ANCA-associated vasculitis [J]. *Arthritis Res Ther*, 2020,22(1):145.
- [12] Wikman A, Fagergren A, Gunnar O J S, et al. Monocyte activation and relationship to anti-proteinase 3 in acute vasculitis [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2003,18(9):1792-9.
- [13] Rothe M, Pan M G, Henzel W J, et al. The TNFR2-TRAF signaling complex contains two novel proteins related to baculoviral inhibitor of apoptosis proteins [J]. *Cell*, 1995,83(7):1243-52.
- [14] Borghi A, Haegman M, Fischer R, et al. The E3 ubiquitin ligases HOIP and cIAP1 are recruited to the TNFR2 signaling complex and mediate TNFR2-induced canonical NF-kappaB signaling [J]. *Biochem Pharmacol*, 2018,153:292-8.
- [15] Peng J, Li X M, Zhang G R, et al. TNF-TNFR2 signaling inhibits Th2 and Th17 polarization and alleviates allergic airway inflammation [J]. *Int Arch Allergy Immunol*, 2019,178(3):281-90.
- [16] Li X M, Chen X, Gu W, et al. Impaired TNF/TNFR2 signaling enhances Th2 and Th17 polarization and aggravates allergic airway inflammation [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2017,313(3):L592-601.
- [17] Wang Y, Zhang S, Zhang N, et al. Reduced activated regulatory T cells and imbalance of Th17/activated Treg cells marks renal involvement in ANCA-associated vasculitis [J]. *Mol Immunol*, 2020,118:19-29.
- [18] Martinez V L, Draibe J, Quero M, et al. Exploring frequencies of circulating specific Th17 cells against myeloperoxidase and proteinase 3 in ANCA associated vasculitis [J]. *Int J Mol Sci*, 2019,20(23):5820.
- [19] Eriksson P, Andersson C, Cassel P, et al. Increase in Th17-associated CCL20 and decrease in Th2-associated CCL22 plasma chemokines in active ANCA-associated vasculitis [J]. *Scand J Rheumatol*, 2015,44(1):80-3.
- [20] Jiang X, Yu M, Zhu T, et al. *Kcnq1ot1/miR-381-3p/ETS2* axis regulates inflammation in mouse models of acute respiratory distress syndrome [J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2020,19:179-89.
- [21] Ye B, Wu Z H, Tsui T Y, et al. lncRNA KCNQ1OT1 suppresses the inflammation and proliferation of vascular smooth muscle cells through I κ B α in intimal hyperplasia [J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2020,20:62-72.
- [22] Banerjee S, Cui H, Xie N, et al. miR-125a-5p regulates differential activation of macrophages and inflammation [J]. *J Biol Chem*, 2013,288(49):35428-36.
- [23] Wang W, Guo Z H. Downregulation of lncRNA NEAT1 ameliorates LPS-induced inflammatory responses by promoting macrophage M2 polarization *via* miR-125a-5p/TRAF6/TAK1 axis [J]. *Inflammation*, 2020,43(4):1548-60.
- [24] Sun L, Lian J X, Meng S. MiR-125a-5p promotes osteoclastogenesis by targeting TNFRSF1B [J]. *Cell Mol Biol Lett*, 2019,24:23.

Identification of inflammatory response genes in ANCA-associated vasculitis by bioinformatics analysis and experimental validation

Zhang Dongmei^{1,2}, Zhang Yannan^{1,2}, Qin Jianhua^{1,2}, Ou Santao^{1,2}, Wu Weihua^{1,2}

(¹Dept of Nephrology, The Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000;

²Sichuan Clinical Research Center for Nephropathy, Luzhou 646000)

Abstract Objective To explore the candidate genes and potential molecular mechanisms of anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA)-associated vasculitis by bioinformatics and experimental validation, and to provide a scientific theoretical basis for the treatment of potential inflammatory targets for ANCA-associated vasculitis. **Methods** The GSE108109 chip data was retrieved from the Gene Expression Omnibus (GEO) database, and the differential genes were processed, analyzed and screened using the R language related program package. Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) and gene ontology (GO) enrichment analysis was carried out using DAVID online network cable, and the interaction network of the protein encoded by the selected genes of inflammatory syndrome was constructed through STRING website. Further endogenous competitive RNA (ceRNA) regulatory network was predicted and constructed through miRWalk and DIANA-LncBase databases, and key genes were screened from the network to draw ROC curve. The renal biopsy samples of patients with ANCA-associated vasculitis confirmed by our hospital were collected as the experimental group, and the renal biopsy samples of IgA nephropathy and micro-adaptive nephropathy were collected as the control group. Immunohistochemical staining was performed on the collected renal biopsy samples, and the average optical density was calculated by semi-quantitative analysis of immunohistochemical staining to further verify the expression of the key genes screened by the bioinformatics analysis. Pearson linear correlation analysis was performed between the average optical density results and the clinical inflammatory data of patients. **Results** 846 differential genes were screened, of which 444 genes were significantly up-regulated and 402 genes were significantly down-regulated. Through KEGG and GO analysis, important differentially expressed genes related to inflammation regulation were obtained. Among them, CSF1R and TNFRSF1B, two differentially expressed genes never reported in ANCA-associated vasculitis, attracted our attention. At the same time, we constructed multiple ceRNA regulatory axes including KCNQ1OT1-hsa-miR-125a-5p-TNFRSF1B. There were 15 samples of ANCA-associated vasculitis, 6 samples of IgA nephropathy, and 3 samples of micropathological kidney. Immunohistochemical results of renal biopsy specimens showed that the expression of CSF1R and TNFRSF1B in ANCA-associated vasculitis kidney tissue was higher than that in the control group. Pearson correlation analysis of clinical data of patients in ANCA group showed that the expression of CSF1R was positively correlated with the content of neutrophil count ($r=0.587$), and the expression of TNFRSF1B was positively correlated with the content of serum C-reactive protein ($r=0.646$). **Conclusion** Key genes related to inflammatory regulation such as CSF1R and TNFRSF1B were investigated by bioinformatics methods, and a rigorous ceRNA regulatory network was constructed. The expression of CSF1R and TNFRSF1B in ANCA vasculitis was higher than that in the control group through immunohistochemistry. The results provides a scientific theoretical basis for the molecular mechanism of inflammation, and laid a good foundation for new therapeutic targets of ANCA-related vasculitis for inflammation.

Key words ANCA-associated vasculitis; bioinformatics analysis; CSF1R; TNFRSF1B; inflammation; competing endogenous RNAs