

全基因组测序探索多系统萎缩患者外周血液中铁死亡相关核心基因及其药物靶点

韩亚, 张政, 张亚恒

(河南科技大学第二附属医院神经内科, 河南 洛阳 471003)

摘要 **目的** 探讨多系统萎缩(MSA)患者血液中差异表达的铁死亡相关基因,寻找诊断和治疗的新方向。**方法** 收集MSA患者血液标本进行高通量全基因组测序分析,对数据进行整理并筛选差异表达的长链非编码RNA(lncRNAs)及信使RNA(mRNAs)基因。进一步筛选铁死亡相关基因后进行基因本体论(GO)富集分析并构建蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络,使用Cytoscape的MCODE插件筛选关键基因模块。构建铁死亡相关竞争性内源性RNA(ceRNA)网络,对网络中的mRNA基因进行基因药物关联性分析。最后利用PCR验证目标基因。**结果** 共筛选出铁死亡相关mRNA基因34个。筛选核心模块和构建ceRNA网络发现2个网络中均存在MAPK14和MTF1基因。药物基因预测发现MAPK14具有众多药物治疗靶点。实时PCR结果表明MAPK14基因在MSA外周血液中显著上调,诊断性能良好。**结论** 铁死亡相关基因在MSA患者外周血中存在差异表达,这些差异表达的基因可能与脂质代谢异常和氧化应激途径相关。其中,核心基因MAPK14在调控网络中发挥重要作用,并且是一个良好的潜在药物治疗靶点和诊断标志物。

关键词 多系统萎缩; 血液; 铁死亡; 竞争内源性RNA; 生物标志物

中图分类号 741.02 文献标志码 A 文章编号 0258-4646(2024)09-0821-06

网络出版地址 <https://link.cnki.net/urlid/21.1227.R.20240909.1652.004>

DOI: 10.12007/j.issn.0258-4646.2024.09.010

Analysis of ferroptosis hub genes in the peripheral blood of patients with multiple system atrophy and their drug targets by whole genome sequencing

HAN Ya, ZHANG Zheng, ZHANG Yaheng

(Department of Neurology, The Second Affiliated Hospital and College of Clinical Medicine of Henan University of Science, Luoyang 471003, China)

Abstract **Objective** To analyze the differentially expressed ferroptosis genes in the blood of patients with multiple system atrophy (MSA), and to find a new direction for diagnosis and treatment. **Methods** Blood samples were collected from patients with MSA and subjected to high-throughput whole-genome sequencing analysis. The data were processed, and differentially expressed lncRNA and mRNAs genes were screened. Ferroptosis genes were further screened for gene ontology (GO) enrichment analysis and protein-protein interaction network construction. The MCODE plugin in Cytoscape was used to screen key gene modules. A ferroptosis competing endogenous RNA (ceRNA) network was constructed, and gene-drug association analysis was performed on the mRNAs genes in the network. **Results** A total of 34 ferroptosis mRNAs genes were identified. Hub modules and ceRNA network construction revealed that both networks contained MAPK14 and MTF1. Predictive drug gene analysis revealed that MAPK14 had numerous drug treatment targets. PCR results showed that MAPK14 mRNA expression was significantly upregulated in MSA group compared with healthy control group. **Conclusion** Ferroptosis genes are differentially expressed in the peripheral blood of patients with MSA, and these differentially expressed genes may be related to abnormal lipid metabolism and oxidative stress pathways. Among these, the hub gene MAPK14 may play an important role in the regulatory network and is an excellent potential drug therapeutic target and diagnostic marker.

Keywords multiple system atrophy; blood; ferroptosis; competing endogenous RNA; biomarker

多系统萎缩(multiple system atrophy, MSA)是一种以自主神经衰竭、帕金森症状和共济失调3种临床

症状为主的神经退行性疾病^[1]。MSA的组织病理学标志为错误折叠和聚集的 α -突触核蛋白^[2]。与同样为 α -突触核蛋白病的帕金森病(Parkinson disease, PD)不同,目前尚无有效的方法可治疗或改善MSA的症状。研究^[1]显示60% MSA患者在确诊后5年需要使用轮椅。高致残率和死亡率使MSA诊治措施的研究成为紧迫而未满足的需求。

基金项目:河南省医学科技攻关计划(联合共建)项目(LHGJ20200598)

作者简介:韩亚(1987-),女,主治医师,硕士。

通信作者:张政, E-mail: zhangzheng990193@163.com

收稿日期:2023-08-03

网络出版时间:2024-09-10 15:44:06

MSA的发病机制可能与神经元铁稳态改变、线粒体功能障碍、髓鞘和营养支持功能衰竭以及神经炎症等相关^[3],其中以铁稳态改变的机制最为引人注目。研究^[4-5]证实铁可以促进 α -突触核蛋白的聚集,保守的铁螯合可减轻 α -突触核蛋白的病理和神经退行性变进程。可见铁失衡在MSA的发生和发展中扮演了重要角色。近年来关于铁失衡所致的一种调节细胞死亡的新模式被提出。本研究通过检测MSA患者外周血液中铁死亡相关基因变化来揭示MSA铁死亡相关机制,希望能发现新的早期诊治的生物标志物。

1 材料与方法

1.1 一般资料

选取2020年10月至2022年5月于我院确诊的13例MSA患者作为MSA组。所有患者符合《MSA诊断标准中国专家共识》的诊断标准,同时纳入13例无神经系统疾病的健康体检老年人作为健康对照组。排除存在任何其他神经退行性疾病和凝血障碍者。所有参与者签署书面知情同意书,本研究获得河南科技大学第二附属医院伦理委员会批准。入组24 h内在空腹状态下收集外周血,随机抽取3例MSA和健康对照组作为全基因组测序组,根据标准化方案为每位患者采集一份外周血(PAXgene)样本,其余20例入组患者被选为验证组,使用抗凝EDTA管抽取外周血。将收集的血液储存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中备用。

1.2 RNA提取、文库制备和测序

采用PAXgeneTM RNA系统从全血中提取RNA。采用Agilent 4200 TapeStation(美国安捷伦科技公司)确认RNA样品的质量,Qubit测量RNA的数量(美国Life Technologies公司)。本研究使用的样品都具有极佳的纯度($A_{260}/A_{280} \geq 1.9$, $A_{260}/A_{230} \geq 2$),没有明显的退化迹象($RIN \geq 9$)。使用TruSeq链状mRNA文库制备试剂盒(美国圣地亚哥Illumina公司)生成mRNA-seq文库。这些试剂盒通过片段化RNA物种、连接接头和执行逆转录生成高质量的cDNA文库,用于测序。对样品进行了索引(或条形码化),允许在所有泳道上以等摩尔量汇集单个文库,从而最大限度地减少运行变化的潜在技术偏差。

1.3 RNA-seq数据的生物信息学分析

采用FastQC版本0.11.7对fastq读数进行了质量

检查。通过运行CutAdapt(V2.5)过滤掉了质量差的读取和适配器序列。使用RNA-SeQC进行RNA-seq特异性质量控制。评估总读段数、读深、平均读长、整个基因的平均覆盖率、鉴定的基因数量、PCR重复率、核糖体含量和外显子/内含子,以确认文库和测序的质量。采用STAR版本38.2.6a将原始读数与GRCh1参考基因组对齐。使用htseq版本0.11.0计算映射到基因的读取次数。

1.4 基因注释和差异表达基因的鉴定

对数据集的基因名进行注释并识别长链非编码RNA(long non-coding RNA, lncRNA)。将mRNA与铁死亡基因取交集后得到铁死亡相关mRNAs(ferroptosis mRNA, FR-mRNA)。对MSA样本和健康样本中的FR-mRNA和lncRNA分别进行差异表达分析。当FR-mRNA和lncRNA的 $P < 0.05$,错误发现率(false discovery rate, FDR) < 0.05 和 $|\log_2 FC| \geq 1$ 时认定为铁死亡差异表达基因(ferroptosis differentially expressed genes, FR-DEG)和差异表达lncRNAs(differentially expressed lncRNA, DE-lncRNA)。

1.5 铁死亡相关基因富集分析及核心模块

使用metascape数据库对FR-mRNA进行基因本体论(gene ontology, GO)富集分析,并构建蛋白质-蛋白质相互作用(protein-protein interaction, PPI)网络,利用成熟的MCODE算法寻找网络中的密集联结的蛋白质群(核心模块),并对每个群的生物功能进行注释。

1.6 预测铁死亡相关微RNA(microRNA, miRNA)并构建竞争性内源性RNA(competing endogenous RNA, ceRNA)网络

使用miRcode数据库预测与DE-lncRNAs的相互作用的miRNA。将预测到的miRNA与PEREZ-SORIANO等^[6]研究中的miRNA取交集获得共有miRNA,再使用TargetScan、miRTarBase和miRDB数据库分别预测与共有miRNA相关的mRNA,只有被上述3个数据库全部预测到的mRNA才能被提取。将预测靶点与FR-DEG相交,利用相交后获得的miRNA、lncRNAs和mRNA构建ceRNA网络。使用Cytoscape软件(3.7.0版)对调控网络进行可视化。

1.7 铁死亡基因相关药物预测

利用DGIdb数据库(<https://dgidb.genome.wustl.edu>)对ceRNA网络中的药物基因进行预测并使用

Cytoscape进行可视化。

1.8 铁死亡基因的验证

由于高通量测序技术进行测序分析病例较少,为了提高结果的可靠性,将对关键的铁死亡相关基因进行PCR检测。当样品DNA的A260/A280为1.8~2.0时,认为已达到所要求的纯度。使用赛默飞世尔科技RevertAid第1链cDNA合成试剂盒(赛默飞世尔科技,美国马萨诸塞州沃尔瑟姆公司)将总RNA逆转录成cDNA,并根据标准方案使用SYBR Premix Ex Taq(中国大连塔卡拉公司)进行实时PCR。RNA引物序列如下:正向5'-CCAAGCCATGAGGCAAGAA A-3',反向5'-CTTCTCCAGCAAGTCGACAG-3'。以GAPDH为内参。使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法对PCR结果进行定

量。所有实验均额外设置2个副孔一并进行。

2 结果

2.1 一般资料比较

结果显示对照组和MSA组年龄、性别、高血压、糖尿病、吸烟、饮酒等方面均无统计学差异($P < 0.05$),见表1。

2.2 差异表达基因的鉴定

利用高通量测序技术对3例MSA和3例对照组外周血样本进行全基因分析共检测到34 087个mRNA表达谱。通过基因重注释分类和差异表达基因分析后分别鉴定出lncRNA基因66个和Fe-mRNA基因34个。

表1 入组人群临床特征

Tab.1 Clinical characteristics of the enrolled population

Clinical data	Control (n = 13)	MSA (n = 13)	P
Age (year)	66.85 ± 7.95	67.32 ± 6.34	0.87
Male [n (%)]	7 (53.84)	8 (61.54)	0.50
Hypertension [n (%)]	6 (46.15)	9 (69.23)	0.21
Diabetes [n (%)]	3 (23.07)	5 (38.46)	0.34
Coronary heart disease [n (%)]	3 (23.07)	1 (7.69)	0.11
Hyperlipidaemia [n (%)]	8 (61.54)	5 (38.46)	0.22
Smoke [n (%)]	3 (23.07)	4 (30.77)	0.50
Drink [n (%)]	4 (30.77)	5 (38.46)	0.50

2.3 关键模块识别和富集分析

利用Metascape数据库对Fe-mRNA进行分析,发现其主要富集于铁死亡、单羧酸代谢过程、炎症反应的调节和脂质代谢过程的调节。该数据库自动构建PPI网络后利用MCODE共筛选出2个核心模块。核心模块基因的注释结果显示其主要功能涉及铁死亡、单羧酸代谢过程和脂肪酸代谢过程。这再次证明了铁死亡相关基因主要通过干扰氧化和脂肪代谢过程来促进疾病的发生和发展。对核心模块中的蛋白进行可视化后发现这些模块中的核心蛋白都包含MAPK14和MTF1,其中MAPK14处于核心模块的核心位置,为该模块的核心蛋白,见图1。

2.4 构建CeRNA网络。

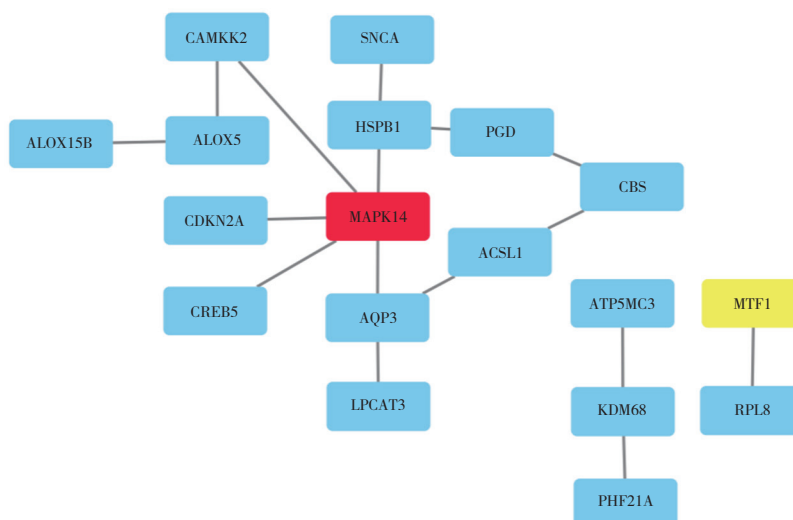
通过miRcode数据网站预测分析显示,66个差异表达的lncRNA共靶向了824个miRNA,与参考文献[6]发现的309个差异表达miRNA取交集后共获

得36个共同miRNA;使用TargetScan、miRTarBase和miRDB 3个数据库共同预测发现36个共同miRNA可靶向658个mRNA,取预测到的mRNA与FR-DEG的交集可获得3个共有的mRNA。利用上述预测结果构建lncRNA-miRNA-mRNA网络(图2)。在网络中有7个lncRNA节点,3个mRNA节点和2个miRNA节点,在3个mRNA中也包含有MAPK14和MTF1。

2.5 MSA的潜在治疗药物

基于铁死亡相关基因的ceRNA网络使用基因-药物相互作用数据的DGIdb数据库(<https://www.dgldb.org/>)来识别铁死亡相关基因的潜在治疗药物,并证明药物和基因之间的相互作用。73种潜在药物被鉴定为可靶向MAPK14和MTF1 2个基因。其中,MAPK14具有丰富的靶向药物(图3),并且部分药物为MAPK14的特异性抑制药物。

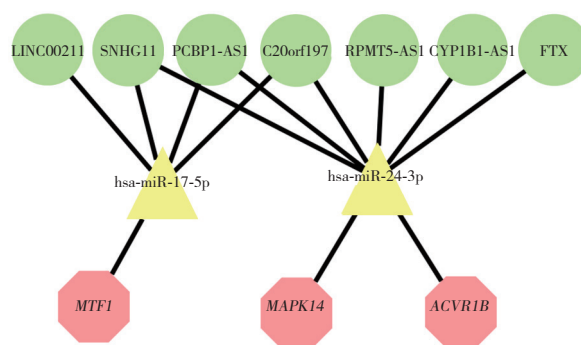
2.6 基因验证



The red and yellow squares represent the MAPK14 and MTF1, respectively.

图1 PPI网络核心模块

Fig.1 Core module of PPI network



Each node represents a gene, and each edge represents an interaction between genes. The mRNA, miRNA, and lncRNA are represented by hexagons, triangles, and circles, respectively.

图2 lncRNA-miRNA-mRNA网络

Fig.2 lncRNA-miRNA-mRNA network

铁死亡相关基因MAPK14不仅在网络模块中处于关键位置,还被发现在ceRNA网络中发挥作用,为了验证该基因的表达情况,对该基因进行PCR检测。结果提示与对照组比较,MAPK14基因在MSA患者外周血液中显著上调($P = 0.0115$,图4)。为了进一步评估诊断性能,计算MAPK14基因的受试者操作特征(receiver operating characteristic, ROC)曲线下面积为0.90(95%CI:0.75~1.00),提示MAPK14基因同时具有良好的诊断性能。

3 讨论

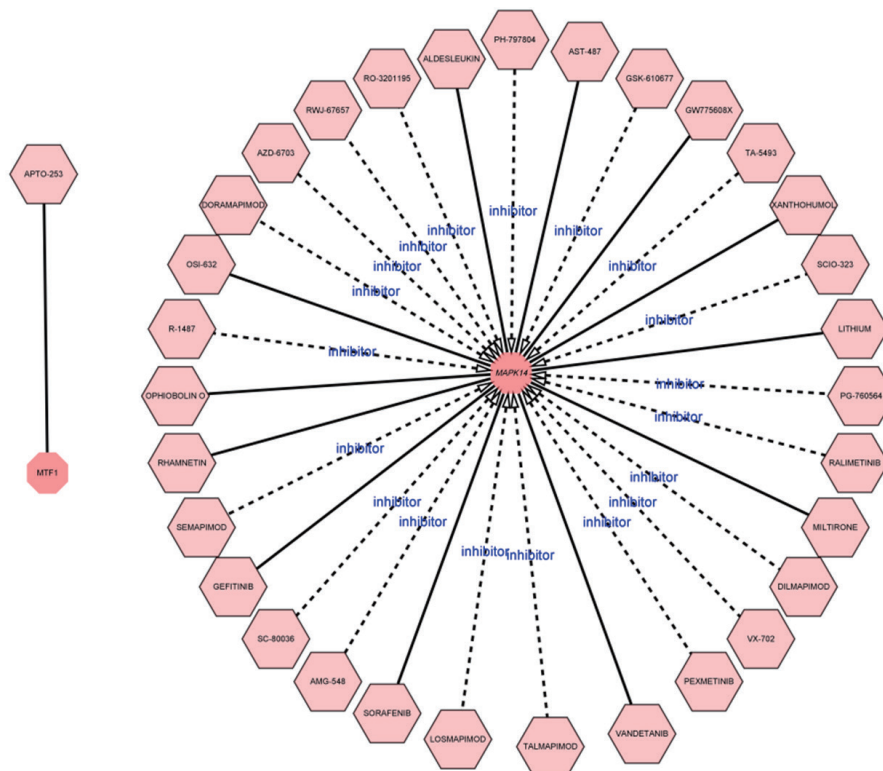
MSA作为最具侵袭性的突触核蛋白病可导致大脑中多个区域的神经元丢失,从而引起多个系

统的退化。高致残率和死亡率使MSA患者承受着巨大的痛苦,目前尚无有效诊治手段。研究^[7-11]报道MSA在出现典型临床症状前会有前驱期,这一时期可能长达20年。虽然MSA有漫长的病理过程,但缺乏有效诊断手段,MSA患者多数还是在晚期被确诊,导致其在确诊后短期内丧失自理能力甚至死亡。

本研究通过比较MSA患者血液中FR-DEG,发现其主要涉及铁死亡、单羧酸代谢过程、炎症反应的调节和脂质代谢过程的调节等生物途径。利用STRING数据库构建了铁死亡相关基因的PPI网络,发现该网络的核心模块中的基因主要富集在铁死亡、单羧酸代谢过程和脂肪酸代谢过程。值得注意

的是,核心基因MAPK14同时处在MSA铁死亡相关差异表达基因网络和ceRNA网络的核心位置,提示MAPK14在MSA患者外周血中可能通过ceRNA网络

发挥作用。利用DGIdb数据库预测ceRNA网络中的铁死亡相关基因相关药物,结果显示,MAPK14是MSA潜在的药物治疗靶点。



The inhibitors are indicated by dotted lines, and the drugs connected are inhibitors of the MAPK14 gene.

图3 MAPK14基因的药物基因相互作用网络

Fig.3 Drug-gene interaction network of the MAPK14 gene

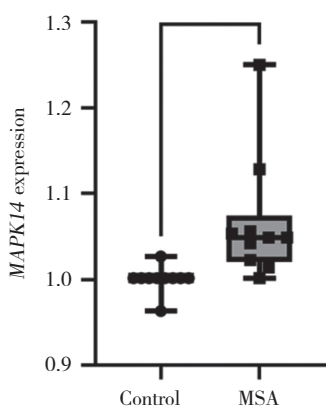


图4 MAPK14基因的差异分析箱线图

Fig.4 Difference analysis box diagram of MAPK14 gene

MAPK14在多种疾病的启动中起关键作用^[12]。MAPK14在免疫和炎症反应中具有非常重要作用^[13],同时MAPK14在多种细胞类型的增殖、分化和存活中具有调节作用^[14-15]。MAPK14可通过下调细

胞周期蛋白对细胞周期进程产生负调控作用^[13]。不仅如此,它还与细胞分裂、肿瘤发生、免疫反应、凋亡以及记忆和学习等其他细胞过程有关^[16]。特别是MAPK14可以通过细胞凋亡等多种机制负调控活性氧(reactive oxygen species, ROS)系统,从而起到抑制癌症的作用^[16]。有研究^[17]利用一种合成类黄酮,通过介导MAPK14通路激活,最终诱导细胞凋亡,从而抑制结直肠癌细胞增殖。可见MAPK14在病理状态下将会发挥多种功能,主要调节细胞周期和死亡过程。本研究发现MAPK14可能通过铁死亡相关的脂代谢、氧化应激通路发挥调控MSA疾病状态的作用,利用基因药物互作数据库预测发现MAPK14具有多种的特异性抑制药物,这将为MSA的治疗提供更多选择,由此可见MAPK14将是MSA良好的潜在治疗靶点。

本研究存在一定局限性。首先,由于MSA诊断

的金标准依赖于死后脑组织病理检测,本研究所纳入患者依照《MSA诊断标准中国专家共识》进行诊断,存在一定误诊风险,后续需要长期随访观察校正;其次,由于缺乏多中心大样本的研究,对于该基因诊断性能的证据不够充分;最后,由于经费有限本研究并未对*MTF1*基因进行PCR验证,因此也无法评估2个基因的综合诊断性能。

综上所述,铁死亡相关基因在MSA患者外周血中存在差异表达,这些差异表达的基因可能与脂质代谢异常和氧化应激途径相关,其中核心基因*MAPK14*在调控网络中发挥重要作用,是一个良好的潜在药物治疗靶点和诊断标志物。

参考文献:

- [1] RIZZO G, COPETTI M, ARCUTI S, et al. Accuracy of clinical diagnosis of Parkinson disease: a systematic review and meta-analysis [J]. *Neurology*, 2016, 86 (6) : 566-576. DOI: 10.1212/WNL.0000000000002350.
- [2] WENNING GK, GESER F, KRISMER F, et al. The natural history of multiple system atrophy: a prospective European cohort study [J]. *Lancet Neurol*, 2013, 12 (3) : 264-274. DOI: 10.1016/S1474-4422 (12) 70327-7.
- [3] POEWE W, STANKOVIC I, HALLIDAY G, et al. Multiple system atrophy [J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2022, 8 (1) : 56. DOI: 10.1038/s41572-022-00382-6.
- [4] FINKELSTEIN DI, BILLINGS JL, ADLARD PA, et al. The novel compound PBT434 prevents iron mediated neurodegeneration and alpha-synuclein toxicity in multiple models of Parkinson's disease [J]. *Acta Neuropathol Commun*, 2017, 5 (1) : 53. DOI: 10.1186/s40478-017-0456-2.
- [5] SHUKLA JJ, STEFANOVA N, BUSH AI, et al. Therapeutic potential of iron modulating drugs in a mouse model of multiple system atrophy [J]. *Neurobiol Dis*, 2021, 159: 105-509. DOI: 10.1016/j.nbd.2021.105509.
- [6] PÉREZ-SORIANO A, BRAVO P, SOTO M, et al. MicroRNA deregulation in blood serum identifies multiple system atrophy altered pathways [J]. *Mov Disord*, 2020, 35 (10) : 1873-1879. DOI: 10.1002/mds.28143.
- [7] MUÑOZ-LOPETEGI A, BERENQUER J, IRANZO A, et al. Magnetic resonance imaging abnormalities as a marker of multiple system atrophy in isolated rapid eye movement sleep behavior disorder [J]. *Sleep*, 2021, 44 (1) : zsa089. DOI: 10.1093/sleep/zsa089.
- [8] 朴松兰, 杨小存, 马长春. 多发性硬化免疫相关病因和发病机制的研究进展 [J]. *中国老年学杂志*, 2020, 40 (13) : 2900-2904. DOI: 10.3969/j.issn.1005-9202.2020.13.066.
- [9] HEIM B, MANGESIUS S, KRISMER F, et al. Diagnostic accuracy of MR planimetry in clinically unclassifiable Parkinsonism [J]. *Parkinsonism Relat Disord*, 2021, 82: 87-91. DOI: 10.1016/j.parkrel-dis.2020.11.019.
- [10] SPILLANTINI MG, CROWTHER RA, JAKES R, et al. Filamentous alpha-synuclein inclusions link multiple system atrophy with Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies [J]. *Neurosci Lett*, 1998, 251 (3) : 205-208. DOI: 10.1016/s0304-3940 (98) 00504-7.
- [11] FANCIULLI A, STANKOVIC I, KRISMER F, et al. Multiple system atrophy [J]. *Int Rev of Neurobiol*, 2019, 149: 137-192. DOI: 10.1016/bs.irm.2019.10.004.
- [12] MADKOUR MM, ANBAR HS, EL-GAMAL MI. Current status and future prospects of p38 alpha/MAPK14 kinase and its inhibitors [J]. *Eur J Med Chem*, 2021, 213 (1) : 113-216. DOI: 10.1016/j.ejmech.2021.113216.
- [13] CARGNELLO M, ROUX PP. Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases [J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2011, 75 (1) : 50-83. DOI: 10.1128/MMBR.00031-10.
- [14] PORRAS A, GUERRERO C. Role of p38 α in apoptosis: implication in cancer development and therapy [J]. *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol*, 2011 (3) : 316-326. DOI: 10.4267/2042/44993.
- [15] ZARUBIN T, HAN J. Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway [J]. *Cell Res*, 2005, 15 (1) : 11-18. DOI: 10.1038/sj.cr.7290257.
- [16] MAPHIS N, JIANG SY, XU GX, et al. Selective suppression of the α isoform of p38 MAPK rescues late-stage tau pathology [J]. *Alzheimers Res Ther*, 2016, 8 (1) : 54. DOI: 10.1186/s13195-016-0221-y.
- [17] CHEN YJ, CHEN HP, CHENG YJ, et al. The synthetic flavonoid WYC02-9 inhibits colorectal cancer cell growth through ROS-mediated activation of MAPK14 pathway [J]. *Life Sci*, 2013, 92 (22) : 1081-1092. DOI: 10.1016/j.lfs.2013.04.007.

(编辑 于 溪)