

## 基于盆腔器官脱垂相关衰老基因的 GEO 数据库和 LASSO 回归算法的生物信息学分析

宁敏琦, 何勇, 李秉枢, 黄国涛, 左晓虎, 赵芷晗, 韩武岳, 洪莉  
(武汉大学人民医院妇产科 湖北省盆底疾病临床医学研究中心, 湖北 武汉 430060)

**[摘要]** **目的:** 通过生物信息学技术筛选与盆腔器官脱垂 (POP) 密切相关的衰老基因, 并阐明关键基因潜在的临床意义和价值。**方法:** 利用基因表达汇编 (GEO) 数据库以 “pelvic organ prolapse” 为关键词检索下载数据集 GSE53868 和 GSE151188 获取 POP 相关基因。从 Aging Atlas 数据库、CellAge 数据库和人类衰老基因组资源 (HAGR) 数据库获取衰老相关基因, 2 组基因取交集得到 POP 相关衰老的差异表达基因 (DEGs)。采用 R 4.2.1 软件进行基因富集分析 (GSEA)。采用注释可视化和集成发现 (DAVID) 数据库对 DEGs 进行基因本体论 (GO) 功能富集分析和京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 信号通路富集分析, 采用 Cytoscape 3.9.1 软件构建蛋白-蛋白互作 (PPI) 网络, 用 cytoHubba 插件筛选排名前 10 位的核心基因 (Hub 基因)。采用 R 软件 CIBERSORT 反卷积法分析 22 种免疫细胞在 POP 组和对照组患者中的浸润情况。采用 LASSO 回归算法进一步筛选关键基因, 分析关键基因与免疫细胞浸润的相关性和诊断效能。**结果:** 通过 Aging Atlas、CellAge 和 HAGR 数据库得到 724 个衰老相关基因, 与 POP 表达谱取交集, 提取到含 624 个基因的 POP 相关衰老基因表达矩阵, 差异分析后得到 29 个 POP 相关 DEGs, 其中表达上调基因 2 个, 表达下调基因 27 个。GSEA 显示, 上调通路主要是糖尿病和细胞衰老等通路, 下调通路包括阿尔茨海默病和缺氧诱导因子 1 (HIF-1) 信号通路等。GO 功能富集分析主要富集于细胞对脂多糖的反应、炎症反应和细胞增殖的负向调节等生物学过程。KEGG 信号通路富集分析主要是白细胞介素 17 (IL-17)、肿瘤坏死因子 (TNF) 和核因子  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) 信号传导途径。PPI 网络分析得到白细胞介素 6 (IL-6)、白细胞介素 1B (IL-1B)、环氧合酶 2 (PTGS2) 和 NF- $\kappa$ B 抑制因子  $\alpha$  (NFKBIA) 等 10 个 Hub 基因。CIBERSORT 反卷积法分析, 中性粒细胞和活化的肥大细胞在 POP 组患者中浸润比例相对较大, 且在相关性分析中活化的肥大细胞与大部分 DEGs 呈正相关关系 ( $r > 0.5$ ), 巨噬细胞与 IL-1B 呈明显正相关关系 ( $r > 0.6$ )。LASSO 回归算法进一步筛选的 10 个关键基因中, Jun D 原癌基因 (JUND)、Snail 同源物 1 (SNAI1)、双调蛋白 (AREG)、A 型核纤层蛋白基因 (LMNA) 和超氧化物歧化酶 2 (SOD2) 的诊断效能较高, 受试者工作特征 (ROC) 曲线下面积 (AUC) 均大于 0.750。**结论:** 在衰老过程中, JUND、SNAI1、AREG、LMNA 和 SOD2 基因可能通过炎症相关通路、转录调控、影响胶原蛋白分泌和代谢等多种途径参与 POP 病理生理过程, 从而影响结缔组织支撑功能, 促进 POP 的发生发展。

**[关键词]** 盆腔器官脱垂; 生物信息学; 差异基因; 富集分析

**[中图分类号]** R711.23 **[文献标志码]** A

**[收稿日期]** 2023-02-16

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目 (81971364); 国家药品监督管理局重点研发计划项目 (2021YFC2701300); 湖北省科技厅自然科学基金项目 (2022CFB124); 湖北省科技厅重点研发计划项目 (2022BCA045); 湖北省卫健委科研项目 (WJ2021Q037)

**[作者简介]** 宁敏琦 (1999-), 女, 湖南省株洲市人, 在读硕士研究生, 主要从事盆底功能障碍性疾病方面的研究。

**[通信作者]** 洪莉, 教授, 博士研究生导师 (E-mail: dr\_hongli@whu.edu.cn)

## Bioinformatics analysis based on pelvic organ prolapse related aging genes of GEO Database and LASSO regression algorithm

NING Minqi, HE Yong, LI Bingshu, HUANG Guotao, ZUO Xiaohu, ZHAO Zhihan,  
HAN Wuyue, HONG Li

(Department of Gynecology and Obstetrics, People's Hospital, Wuhan University, Clinical Medical  
Research Center of Pelvic Floor Diseases, Hubei Province, Wuhan 430060, China)

**ABSTRACT Objective:** To screen the aging genes closely associated with pelvic organ prolapse (POP) by bioinformatics techniques, and to clarify the potential clinical significance and value of key genes. **Methods:** Gene Expression Omnibus (GEO) Database was used to download the datasets GSE53868 and GSE151188 for POP-related genes with the keyword "pelvic organ prolapse". The aging-related genes were obtained from Aging Atlas, CellAge, and the Human Ageing Genomic Resources (HAGR) Databases; the intersection of genes related with POP in two groups provided a list of differentially expressed genes (DEGs) associated with aging in POP; gene Set Enrichment Analysis (GSEA) was conducted with R software version 4.2.1; Gene Ontology (GO) functional enrichment analysis and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) signaling pathway enrichment analysis of DEGs were conducted by the Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID); the protein-protein interaction (PPI) network was constructed with Cytoscape 3.9.1 software; the top 10 Hub genes were selected by cytoHubba plugin; the infiltration of 22 types of immune cells in the patients in POP group and control group was analyzed by CIBERSORT deconvolution method using R software; the key genes were further screened by LASSO regression algorithm; the correlation and diagnostic efficacy between key genes and immune cell infiltration were analyzed. **Results:** From the Aging Atlas, CellAge, and HAGR Databases, 724 aging-related genes were identified. Intersection with the POP expression profile yielded an aging gene expression matrix related to POP containing 624 genes, and 29 POP-related DEGs were identified after differential analysis, including 2 upregulated genes and 27 downregulated genes. The GSEA results showed that the upregulated pathways were mainly related to diabetes and cellular senescence, whereas the downregulated pathways included Alzheimer's disease and hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) signaling pathways. The GO functional enrichment analysis mainly enriched in the biological processes such as the response of the cells to lipopolysaccharide, inflammatory response, and negative regulation of cell proliferation. The KEGG signaling pathway enrichment analysis mainly enriched in interleukin-17 (IL-17), tumor necrosis factor (TNF), and nuclear factor-kappa B (NF- $\kappa$ B) signaling pathways. The PPI network analysis got 10 Hub genes including interleukin-6 (IL-6), interleukin-1B (IL-1B), prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (PTGS2), and NF-kappa-B inhibitor alpha (NFKBIA). The CIBERSORT deconvolution method results showed a relatively higher infiltration proportion of neutrophils and activated mast cells in the patients in POP group, the activated mast cells had a positive correlation with most of the DEGs ( $r > 0.5$ ) and the macrophages had a significant positive correlation with IL-1B ( $r > 0.6$ ). The key genes Jun D proto-oncogene (JUND), Snail homolog 1 (SNAI1), amphiregulin (AREG), Lamin A/C (LMNA), and superoxide dismutase 2 (SOD2) selected by LASSO regression analysis had high diagnostic efficacies, and the area under receiver operating characteristic curve (ROC) (AUC) were all greater than 0.75. **Conclusion:** During the aging process, the genes such as JUND, SNAI1, AREG, LMNA, and SOD2 may participate in the pathophysiology of POP through various pathways, including inflammation-related pathways, transcription regulation, and affecting collagen secretion and metabolism, thereby influence the connective tissue support function and promote the

occurrence and development of POP.

**KEYWORDS** Pelvic organ prolapse; Bioinformatics; Differential genes; Enrichment analysis

盆腔器官脱垂 (pelvic organ prolapse, POP) 是由于盆底肌肉和筋膜组织异常造成盆腔器官下移而引发的器官位置异常及功能障碍, 表现为阴道口肿物脱出, 可伴排尿、排便和性功能障碍<sup>[1]</sup>。盆底组织肌源性损伤、神经源性损伤、结缔组织变化和家族遗传因素均可导致 POP<sup>[2]</sup>, 衰老是重要的危险因素之一。DUARTE 等<sup>[3]</sup> 研究显示: 无论盆底脱垂状态如何, 骨盆支撑功能均会随着年龄增长而降低。既往研究<sup>[4-5]</sup> 表明: 生物信息学分析在探究 POP 相关差异表达基因 (differently expressed genes, DEGs) 的功能和挖掘免疫系统作用方面具有重要意义, 但基于 POP 结合衰老筛选关键基因的研究较少。本研究旨在应用基因表达汇编 (Gene Expression Omnibus, GEO) 数据库、Aging Atlas 数据库、CellAge 数据库和人类衰老基因组资源 (Human Ageing Genomic Resources, HAGR) 数据库筛选出有诊断价值的 POP 相关衰老 DEGs, 并结合 LASSO 回归算法筛选关键基因, 探讨其在 POP 发生发展过程中的潜在机制, 为 POP 的诊断和治疗提供参考。

## 1 资料与方法

**1.1 数据收集和标准化** ① POP 相关基因: 以“pelvic organ prolapse”为检索词, 从 GEO 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) 下载已公布的人类 POP 数据集 GSE53868 和 GSE151188。其中 GSE53868 数据集共 24 例样本, 对照组 12 例, POP 组 12 例; GSE151188 数据集共 15 例样本, 对照组 2 例, POP 组 13 例。② 衰老相关基因: 分别从 Aging Atlas 数据库 (<https://ngdc.cnbc.ac.cn/aging/index>)、CellAge 数据库 (<https://genomics.senescence.info/cells/>) 和 HAGR 数据库 (<https://genomics.senescence.info/>) 筛选出 502、279 和 307 个衰老相关基因, 将 3 组基因合并后去重得 724 个衰老相关基因。

**1.2 数据处理和筛选 DEGs** 利用 GEO2R 分析工具 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/geo2r/>) 结合 R 4.2.1 软件对 GSE53868 和 GSE151188 数据集进行分析。其中, GSE151188 数据库通过对数转换 [ $\log_2(\text{原数值}+1)$ ] 减小数据间差异, 采用“hugene10srrtranscriptcluster.db”工具包和人类基

因组注释包“org.Hs.eg.db”转换基因名后去除表达量低于 50% 的基因。将 GSE151188 和 GSE53868 数据集标准化后合并分组得到 14 例对照组样本, 25 例 POP 组样本, 共 39 例样本, 29 864 个 POP 相关基因。将 724 个衰老相关基因与前者取交集提取到含 624 个基因的 POP 相关 DEGs, 采用 limma 工具包<sup>[6]</sup> 以  $|\log_2\text{FC}| > 0.5$  且校正后  $P < 0.05$  为标准进行差异分析, 筛选出 29 个衰老相关 POP 基因, 其中 27 个基因表达下调, 2 个基因表达上调, 使用 ggplot2 和 pheatmap 程序包进行可视化分析, 生成火山图和热图。

**1.3 基因本体论 (Gene Ontology, GO) 功能富集分析和京都基因与基因组百科全书 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) 信号通路富集分析** 使用标准化后的数据表达矩阵进行基因集富集分析 (gene set enrichment analysis, GSEA), 以 KEGG pathway 基因集为分类标准, 置换检验的置换次数设置为 1 000, 当  $P$  值和假发现率 (false discovery rate, FDR) 均  $\leq 0.05$  表示富集明显。通过 DAVID (<https://david.ncifcrf.gov/>) 在线分析工具对 DEGs 进行 GO 功能和 KEGG 信号通路富集分析, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。其中, GO 功能包括生物学过程 (biological process, BP)、细胞组成 (cellular component, CC) 和分子功能 (molecular function, MF)。

**1.4 蛋白-蛋白互作 (protein-protein interaction, PPI) 网络构建和核心基因 (Hub 基因) 筛选** 使用 STRING (<https://string-db.org/>) 在线分析工具预测并构建 DEGs 的 PPI 网络, 交互得分阈值以 0.4 作为临界标准。采用 Cytoscape 3.9.1 软件进行可视化, 并使用插件 cytoHubba 筛选排名前 10 位 (Top10) 的 Hub 基因, 筛选条件按度值 (degree) 由高向低排序取前 10 位。

**1.5 获取免疫浸润矩阵** 采用 CIBERSORT 反卷积算法基于线性支持向量回归评估组织中 22 种免疫细胞所占百分率<sup>[7]</sup>。使用 R 软件 CIBERSORT 反卷积法对中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、单核细胞、巨噬细胞、B 淋巴细胞、T 淋巴细胞、自然杀伤细胞和树突状细胞等 22 种免疫细胞转录特征的矩阵模拟计算, 计算次数设置为 100 次, 以  $P <$

0.05 为差异有统计学意义。

**1.6 免疫细胞与 DEGs 相关性分析和免疫浸润差异分析** 采用 R 软件计算 22 种免疫细胞浸润矩阵数据和 DEGs 间的相关系数 ( $r$ ) 并可视化。

**1.7 LASSO 回归算法筛选关键基因** 使用“glmnet”包进行 LASSO 回归算法分析, 进一步从 29 个 DEGs 中筛选出 10 个关键基因。

**1.8 统计学分析** 采用 R Studio 软件制图并进行统计学分析。绘制受试者工作特征曲线 (receiver operating characteristic curve, ROC), 评估 LASSO 回归算法筛选的 10 个关键基因与 POP 的关系, 计

算 ROC 曲线下面积 (area under curve, AUC) 评估关键基因的诊断效能 [8]。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 DEGs 筛选结果** 对 GSE53868 和 GSE151188 数据集合并后的数据进行分析, 与 3 个衰老数据库中筛选的 724 个衰老基因取交集得 624 个 POP 相关衰老基因, 以校正后  $P < 0.05$  和  $|\log_2 FC| > 0.5$  为标准筛选出 29 个 POP 相关衰老 DEGs, 其中表达上调基因 2 个, 表达下调基因 27 个。见图 1。

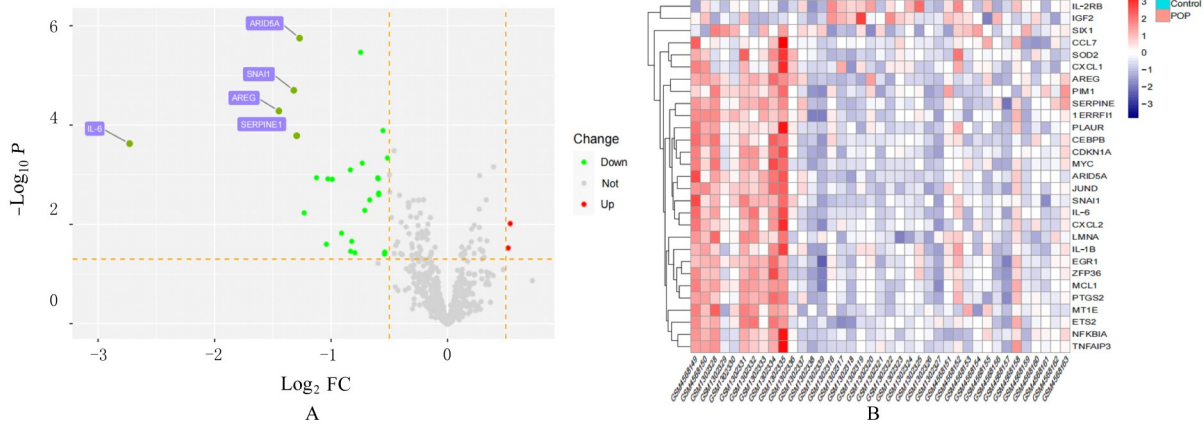


图 1 DEGs 的火山图 (A) 和热图 (B)

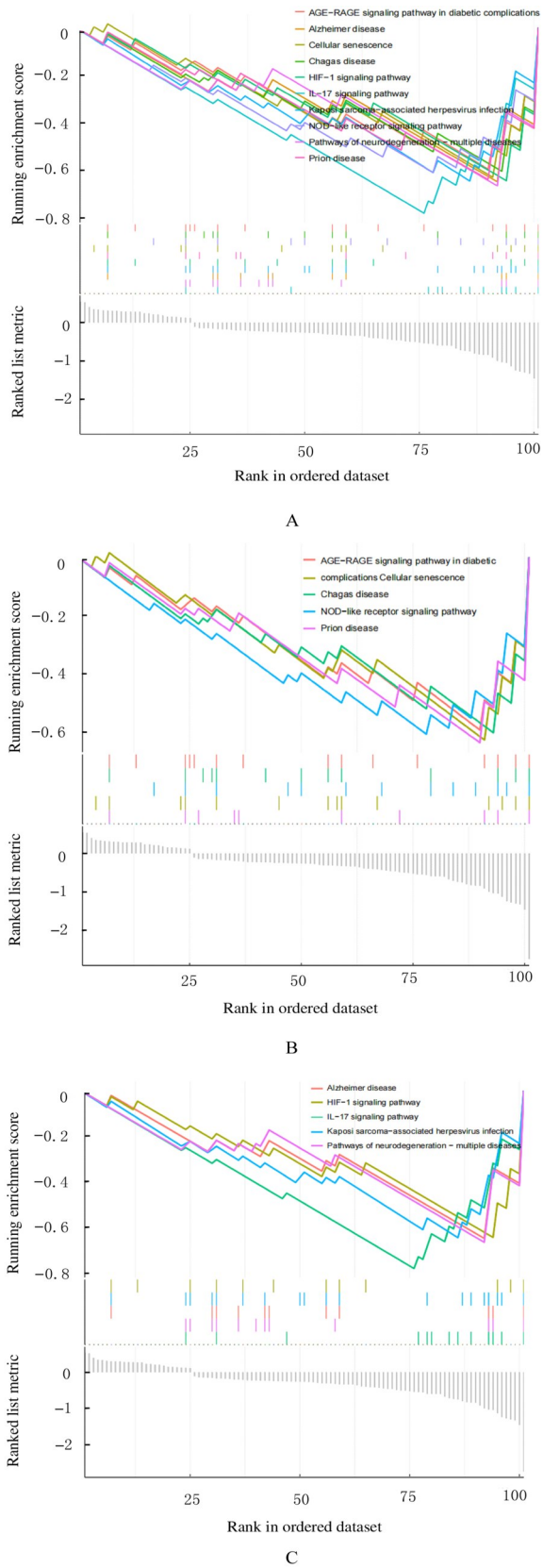
Fig. 1 Volcano map (A) and heat map (B) of DEGs

**2.2 GO 功能富集分析和 KEGG 信号通路富集分析结果** 以 KEGG 信号通路基因集为分类标准, 富集到 5 条上调通路和 5 条下调通路。上调通路包括糖尿病并发症中晚期糖基化终末产物-晚期糖基化终末产物受体 (advanced glycation end products-receptor for advanced glycation end products, AGE-RAGE) 信号通路、细胞衰老、恰加斯病、核苷酸结合寡聚化结构域样受体 (nucleotide binding oligomerization domain like receptors, NLR) 信号传导途径和朊病毒疾病。下调通路包括阿尔茨海默病、缺氧诱导因子 1 (hypoxia inducible factor-1, HIF-1) 信号通路、白细胞介素 17 (interleukin-17, IL-17) 信号通路、卡波西肉瘤相关的疱疹病毒感染和多种疾病的神经变性通路。见图 2。

GO 功能富集分析显示: DEGs 富集于细胞对脂多糖的反应、炎症反应、细胞增殖的负向调节和 DNA 诱导的转录正向调节等 BP; 富集于细胞核等

CC; 富集于转录因子结合、激酶结合和转录调控区序列特异性 DNA 结合等 MF。见图 3A。KEGG 信号通路富集分析显示: DEGs 参与 IL-17、军团病、肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF) 和核因子  $\kappa B$  (nuclear factor-kappa B, NF- $\kappa B$ ) 等信号通路。见图 3B。

**2.3 PPI 网络和 Hub 基因** 采用 STRING 软件绘制 29 个 DEGs 的 PPI 网络, 得到 1 个包含 28 个结点和 127 条边的 PPI 网络图。见图 4A。使用 cytoHubba 插件筛选出 Top10 Hub 基因, 分别为白细胞介素 6 (interleukin-6, IL-6)、白细胞介素 1B (interleukin-1B, IL-1B)、MYC 基因、前列腺素氧化环化酶 2 (prostaglandin endoperoxide synthase 2, PTGS2)、NF- $\kappa B$  抑制因子  $\alpha$  (nuclear factor-kappa B inhibitory factor  $\alpha$ , NFKBIA)、早期生长反应蛋白 1 (early growth response protein 1, EGR1)、CXC 趋化因子配体 1 (C-X-C motif ligand 1,



A: Ten pathways in total; B: Five upward adjustment pathways; C: Five downward adjustment pathways.

图2 KEGG信号通路基因集的GSEA

Fig. 2 GSEA of KEGG signaling pathway gene sets

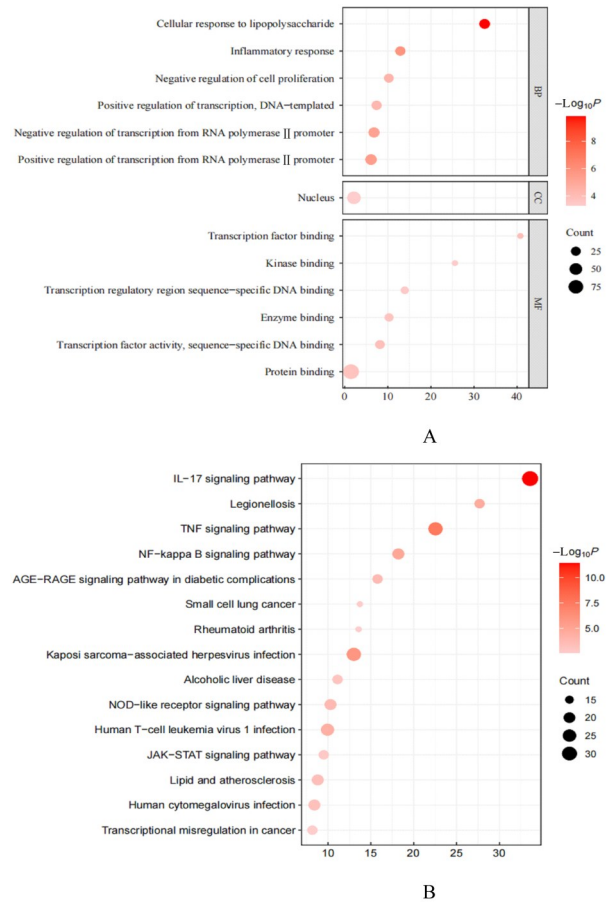


图3 DEGs的GO功能富集分析(A)和KEGG信号通路富集分析(B)

Fig. 3 GO functional enrichment analysis (A) and KEGG signaling pathway enrichment analysis on DEGs (B)

CXCL1)、CCAAT 增强子结合蛋白  $\beta$  (CCAAT enhancer binding protein  $\beta$ , CEBPB)、细胞周期依赖性激酶抑制因子 1A (cyclin dependent kinase inhibitor 1A, CDKN1A) 和 CXC 趋化因子配体 2 (C-X-C motif ligand 2, CXCL2)。见图 4B。

**2.4 免疫浸润矩阵结果** 基于CIBERSORT反卷积法以 $P < 0.05$ 为标准的筛选结果显示:中性粒细胞和活化的肥大细胞在POP组患者中浸润百分率较高。见图 5。

**2.5 免疫细胞和DEGs相关性分析** 巨噬细胞与IL-1B呈明显正相关关系 ( $r > 0.6$ ),活化的肥大细胞与超氧化物歧化酶 2 (superoxide dismutase 2, SOD2)、双调蛋白 (amphiregulin, AREG)、MYC、Jun D 原癌基因 (Jun D proto-oncogene, JUND)、Snail同源物 1 (Snail homolog 1, SNAI1) 和金属硫蛋白 1E (metallothionein 1E, MT1E) 呈正相关关系 ( $r > 0.5$ )。静息的肥大细胞与核

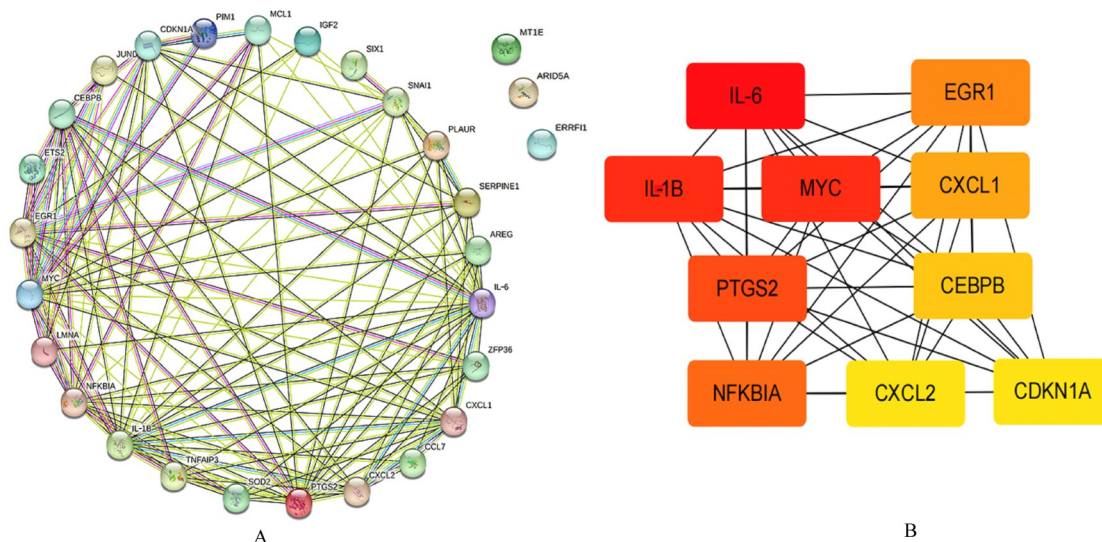


图4 DEGs的PPI网络图(A)和Top10 Hub基因(B)

Fig. 4 PPI network diagram of DEGs (A) and Top10 Hub genes (B)

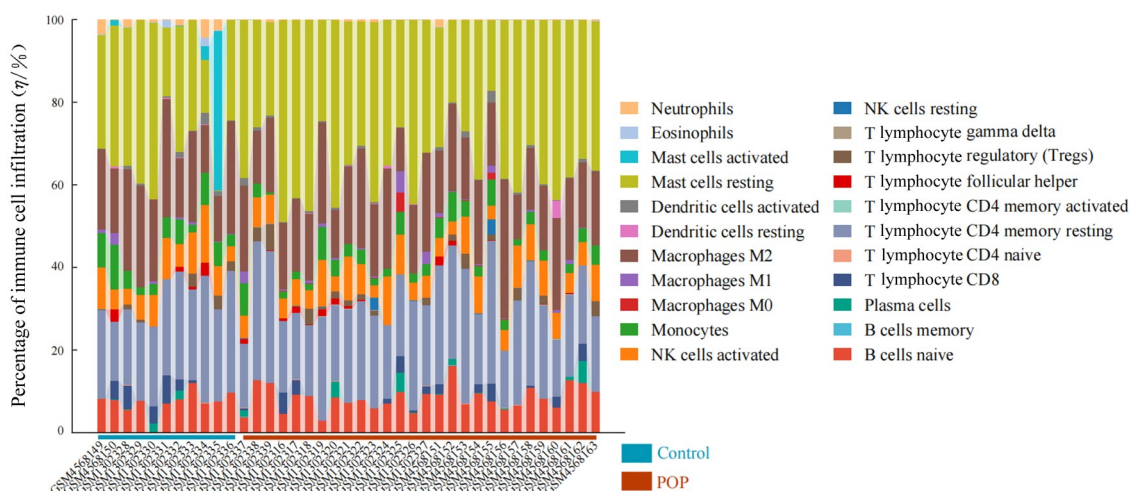


图5 免疫细胞浸润百分率箱图

Fig. 5 Box plot of percentages of immune cell infiltration

纤层蛋白A/C (lamin A/C, LMNA) 表达呈负相关关系 ( $r < -0.5$ )。见图6。

**2.6 LASSO 回归算法筛选关键基因** 使用LASSO回归算法进一步筛选DEGs得到10个关键基因: AREG、胰岛素样生长因子2 (insulin like growth factor 2, IGF2)、白细胞介素2受体 $\beta$  (interleukin-2 receptor beta, IL-2RB)、JUND、LMNA、MT1E、同源盒基因SIX1 (homebox SIX1, SIX1)、SNAI1、SOD2和锌指蛋白36 (zinc finger protein 36, ZFP36)。见图7。

**2.7 关键基因的免疫浸润分析** 与对照组比较, POP组患者JUND、SNAI1、AREG、LMNA、

SOD2、MT1E、IL-2RB、IGF2和SIX1免疫浸润差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见图8。上述基因与“2.5”中的结果大部分相对应, 进一步说明关键基因与免疫细胞之间存在密切关联。

**2.8 POP诊断效能检验结果** 绘制10个关键基因的ROC曲线判断诊断效能, JUND、SNAI1、AREG、LMNA和SOD2的AUC分别为0.880、0.840、0.831、0.814和0.803, 均大于0.750, 即5个关键基因均有较高的检验效能。见图9。

### 3 讨论

POP严重影响患者生活质量, 中国70岁以上人群患病率高达26.11%<sup>[9-10]</sup>。盆底结缔组织的稳

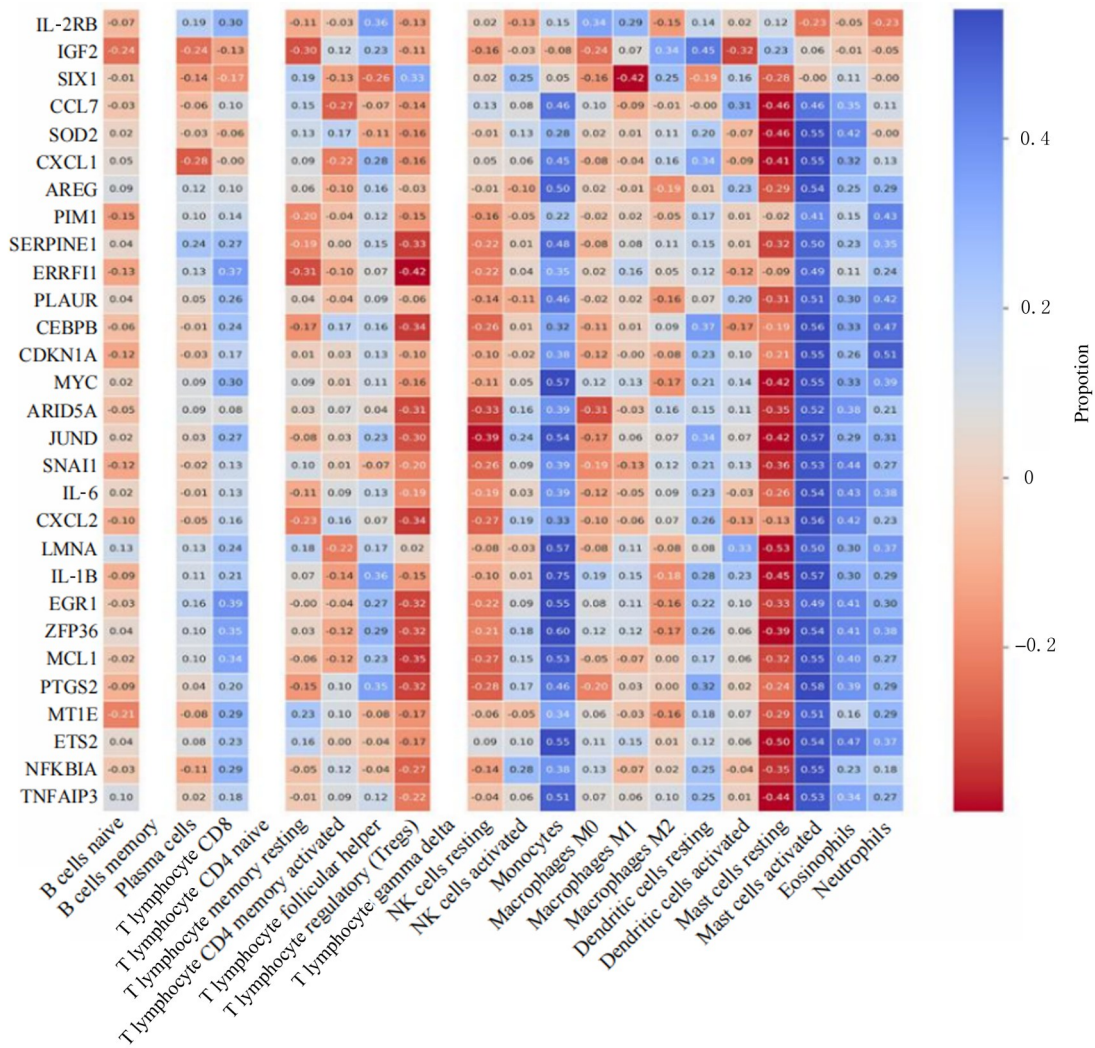


图6 免疫细胞与DEGs相关性分析

Fig. 6 Correlation analysis on immune cells and DEGs

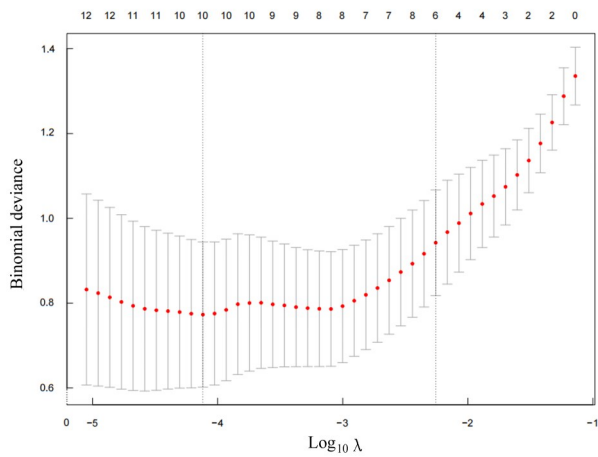
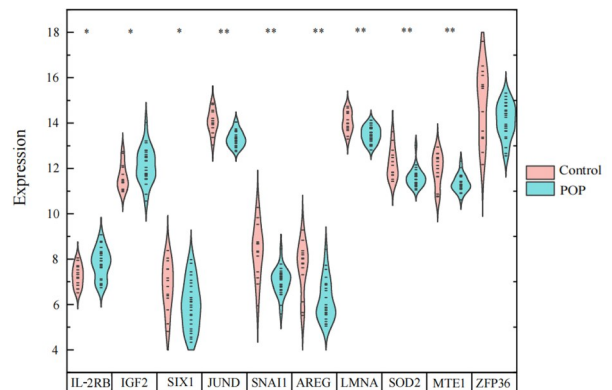


图7 LASSO回归算法筛选关键基因

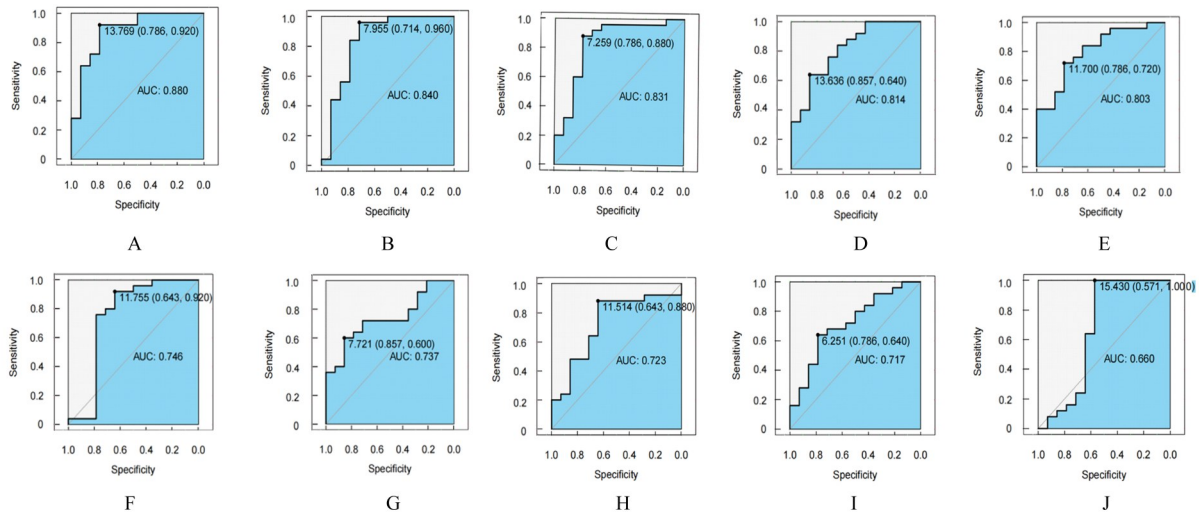
Fig. 7 Key genes screened by LASSO regression algorithm



\*P<0.05, \*\*P<0.01.

图8 10个关键基因免疫浸润差异小提琴图

Fig. 8 Violin plot of immune infiltration differences of 10 key genes



A: JUND; B: SNAI1; C: AREG; D: LMNA; E: SOD2; F: MT1E; G: IL-2RB; H: SIX1; I: IGF2; J: ZFP36.

图9 10个关键基因的效能验证

Fig. 9 Efficacy validations of 10 key genes

定性依赖于完整且具有功能的胶原纤维支撑。研究<sup>[11]</sup>显示：POP患者盆底结缔组织胶原蛋白和弹性蛋白含量减少，胶原蛋白亚型比例改变。炎症因子是调节胶原蛋白分泌的重要因素之一。更年期前后女性阴道萎缩，阴道壁变薄，易发生炎症，发生盆底相关障碍性疾病可能性增加<sup>[12]</sup>。研究<sup>[13]</sup>显示：POP患者主韧带组织中白细胞介素1 (interleukin-1, IL-1)、IL-6和TNF- $\alpha$ 等炎症因子水平高于正常人，表明衰老作为POP发生发展的重要因素，炎症因子的释放和胶原蛋白的代谢在POP发生发展中发挥了重要作用。本研究采用生物信息学方法筛选出29个POP相关衰老DEGs，GO功能富集分析结果显示：DEGs主要参与细胞对脂多糖的反应、炎症反应和细胞增殖的负向调节过程，MF方面集中表现为调控蛋白的表达，如转录因子结合和激酶结合等；KEGG信号通路富集分析显示：DEGs主要富集于促炎相关通路，如IL-17、TNF- $\alpha$ 和NF- $\kappa$ B信号通路。本研究结果提示：衰老过程中POP的发生发展与炎症反应有密切关联。

采用cytoHubba插件从29个DEGs中选出Top10 Hub基因，其中IL-6、IL-1B、PTGS2和NFKBIA均为炎症相关因子。本研究中，CIBERSORT反卷积法分析结果显示：与对照组比较，POP组患者中性粒细胞和活化的肥大细胞浸润相对较多；DEGs与免疫细胞的相关性分析结果显示：活化的肥大细胞与大部分DEGs均呈正相关

关系，推测在POP病理生理机制中，活化的肥大细胞发挥着重要作用。本研究采用LASSO回归算法进一步筛选出10个关键基因进行免疫浸润分析，结果显示：JUND、SNAI1、AREG、LMNA、SOD2和MT1E基因免疫浸润差异有统计学意义。本研究中ROC曲线AUC结果显示：JUND、SNAI1、AREG、LMNA和SOD2对于POP患者有较高的检验效能，提示上述基因在衰老过程中不仅影响免疫细胞浸润，还对POP发生发展有重要作用。

JUND是转录因子激活物蛋白1 (activator protein-1, AP-1)的二聚体活化形式，AP-1可响应各种刺激结合DNA，启动转录调节基因表达。肾小球细胞外基质的重要成分层黏蛋白和I型胶原启动子区域均有AP-1的结合位点。研究<sup>[14]</sup>显示：AP-1参与细胞外基质相关蛋白表达的生物学过程。人体衰老过程中，JUND表达下调，细胞外基质相关蛋白和I型胶原蛋白表达和分泌降低，盆底结缔组织支撑功能受影响，从而介导POP的发生发展。SNAI1是一种锌指蛋白，可促进上皮-间质转化，下调上皮细胞特征性标志物，上调基质细胞特征性标志物<sup>[15]</sup>，上皮-间质转化过程可减少细胞凋亡，抑制免疫反应<sup>[16]</sup>。相关研究<sup>[17-18]</sup>表明：NF- $\kappa$ B通过结合上皮-间质转化基因启动子区域上调SNAI1基因表达，SNAI1直接激活微小RNA-21 (microRNA-21, miR-21)的转录，间接抑制M1巨噬细胞标志物的表达，增加M2巨噬细胞标志物

的表达。根据本研究中 cytoHubba 插件筛选出 NFKBIA 基因推测:衰老过程中可能表达 NFKBIA,抑制 NF- $\kappa$ B 通路,进而抑制上皮-间质转化过程,增加细胞凋亡,引起免疫细胞浸润。AREG 是表皮生长因子家族成员之一,IL-17 信号通路中的炎症和纤维化相关基因表达于上皮细胞和间充质细胞,可调节成纤维细胞和免疫细胞的增殖、凋亡和迁移<sup>[19]</sup>。AREG 由多种衰老细胞分泌,研究<sup>[20-22]</sup>表明:AREG 是感染和组织修复中免疫反应的重要介质,肌肉损伤时被诱导,在肌肉再生过程中发挥重要作用。PERUGORRIA 等<sup>[23]</sup>研究发现:AREG 可刺激细胞增殖并可有效抑制分离的成纤维细胞凋亡,敲除 AREG 基因会导致平滑肌肌动蛋白和胶原蛋白的沉积明显减少。LMNA 表达产物是人类核纤层 A 型蛋白,作为核纤层的主要成分,在维持核结构、基因转录和正常细胞的生理性老化中发挥着重要作用<sup>[24-25]</sup>。研究<sup>[26]</sup>显示:成熟 LMNA 蛋白的减少可提高成纤维细胞对活性氧的敏感性,增加 DNA 损伤。LMNA 异构体聚集激活 NF- $\kappa$ B 触发炎症相关转录程序,增加 IL-6 和 TNF- $\alpha$  的分泌,导致细胞炎性衰老<sup>[27]</sup>。SOD2 是超氧化物歧化酶家族的主要成员之一,其编码蛋白主要分布于线粒体,可清除线粒体产生的超氧阴离子自由基,主要作用是抗氧化<sup>[28]</sup>。SOD2 还参与细胞增殖和凋亡<sup>[29]</sup>等生理过程。研究<sup>[30]</sup>显示:SOD2 信号激活可增加人体内硫酸化糖胺聚糖和胶原蛋白的含量。在心脏老化导致心力衰竭的分子机制研究中,细胞活力的增加和 SOD2 的表达明显增加伴随着衰老标志物 p53 的表达抑制及氧化应激的减少<sup>[31]</sup>。结合本研究结果推测:衰老过程中,SOD2 表达降低,机体自由基清除障碍,细胞外基质成分及胶原蛋白水平降低,细胞衰老加速,形成恶性循环,从而导致结缔组织支撑功能下降,加速 POP 的发展进程。

综上所述,JUND、SNAI1、AREG、LMNA 和 SOD2 基因通过多种途径参与 POP 的发生发展。SNAI1 和 LMNA 可能通过参与 NF- $\kappa$ B 通路触发炎症相关转录程序,AREG 可能通过 IL-17 信号通路影响盆底平滑肌肌动蛋白修复,JUND、AREG 和 SOD2 均可能参与盆底结缔组织胶原蛋白分泌和降解的关键环节。本研究通过生物信息学的方法为衰老相关 POP 发生发展的分子机制研究提供了理论依据,关键基因 JUND、SNAI1、AREG、LMNA

和 SOD2 有可能成为预测老年人 POP 发生发展的分子标志物,同时有望成为 POP 新的临床干预及治疗靶点。

#### 利益冲突声明:

所有作者声明不存在利益冲突。

#### 作者贡献声明:

宁敏琦参与研究设计、论文构思、数据分析和论文撰写,何勇参与数据采集和数据分析,李秉枢、黄国涛、左晓虎、赵芷晗和韩武岳参与论文审阅和编辑,洪莉参与研究项目的监督和指导。

#### [参考文献]

- [1] 中华医学会妇产科学分会妇科盆底学组. 盆腔器官脱垂的中国诊治指南(2020年版)[J]. 中华妇产科杂志, 2020, 55(5): 300-306.
- [2] 陈远群,任慕兰. 盆腔器官脱垂发病机制的研究进展[J]. 中国妇幼健康研究, 2008, 19(5): 507-509.
- [3] DUARTE THIBAUT M, CHEN L Y, HUEBNER M, et al. A comparison of MRI-based pelvic floor support measures between young and old women with prolapse[J]. Int Urogynecol J, 2023, 34(9): 2081-2088.
- [4] ZHAO Y, XIA Z J, LIN T, et al. Significance of hub genes and immune cell infiltration identified by bioinformatics analysis in pelvic organ prolapse [J]. Peer J, 2020, 8: e9773.
- [5] ZHOU Q, HONG L, WANG J. Identification of key genes and pathways in pelvic organ prolapse based on gene expression profiling by bioinformatics analysis [J]. Arch Gynecol Obstet, 2018, 297(5): 1323-1332.
- [6] RITCHIE M E, 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.
- [7] NEWMAN A M, LIU C L, GREEN M R, et al. Robust enumeration of cell subsets from tissue expression profiles [J]. Nat Methods, 2015, 12(5): 453-457.
- [8] LINDEN A. Measuring diagnostic and predictive accuracy in disease management: an introduction to receiver operating characteristic (ROC) analysis [J]. J Eval Clin Pract, 2006, 12(2): 132-139.
- [9] 李志毅,朱兰,徐涛,等. 中国城市地区女性盆腔器官脱垂临床流行病学调查[J]. 中华医学杂志, 2019, 99(11): 857-861.
- [10] CHEN X X, GILES J, YAO Y, et al. The path to healthy ageing in China: a Peking University-Lancet Commission [J]. Lancet, 2022, 400(10367): 1967-2006.

- [11] RUIZ-ZAPATA A M, KERKHOF M H, GHAZANFARI S, et al. Vaginal fibroblastic cells from women with pelvic organ prolapse produce matrices with increased stiffness and collagen content [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 22971.
- [12] LANG J H, ZHU L, SUN Z J, et al. Estrogen levels and estrogen receptors in patients with stress urinary incontinence and pelvic organ prolapse [J]. *Int J Gynaecol Obstet*, 2003, 80(1): 35-39.
- [13] 侯睿, 樊少磊. 盆腔器官脱垂患者子宫主韧带组织中炎性因子、氧化损伤标志物水平的研究[J]. *中国妇产科临床杂志*, 2021, 22(3): 270-272.
- [14] VIROLLE T, MONTHOUEL M N, DJABARI Z, et al. Three activator protein-1-binding sites bound by the Fra-2. JunD complex cooperate for the regulation of murine laminin alpha3A (lama3A) promoter activity by transforming growth factor-beta[J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(28): 17318-17325.
- [15] ZEISBERG M, NEILSON E G. Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions [J]. *J Clin Invest*, 2009, 119(6): 1429-1437.
- [16] DONGRE A, RASHIDIAN M, REINHARDT F, et al. Epithelial-to-mesenchymal transition contributes to immunosuppression in breast carcinomas [J]. *Cancer Res*, 2017, 77(15): 3982-3989.
- [17] LIU J, WU Z S, HAN D, et al. Mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor inhibits liver cancer through small ubiquitin-related modifier (SUMO)ylation-related suppression of NF- $\kappa$ B/snail signaling pathway and epithelial-mesenchymal transition [J]. *Hepatology*, 2020, 71(4): 1262-1278.
- [18] HSIEH C H, TAI S K, YANG M H. Snail-overexpressing cancer cells promote M2-like polarization of tumor-associated macrophages by delivering miR-21-abundant exosomes[J]. *Neoplasia*, 2018, 20(8): 775-788.
- [19] BERASAIN C, AVILA M A. Amphiregulin[J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2014, 28: 31-41.
- [20] ZAISS D M W, GAUSE W C, OSBORNE L C, et al. Emerging functions of amphiregulin in orchestrating immunity, inflammation, and tissue repair [J]. *Immunity*, 2015, 42(2): 216-226.
- [21] CHICHE A, ROUX I L, VON JOEST M, et al. Injury-induced senescence enables *in vivo* reprogramming in skeletal muscle [J]. *Cell Stem Cell*, 2017, 20(3): 407-414.
- [22] BURZYN D, KUSWANTO W, KOLODIN D, et al. A special population of regulatory T cells potentiates muscle repair[J]. *Cell*, 2013, 155(6): 1282-1295.
- [23] PERUGORRIA M J, LATASA M U, NICOU A, et al. The epidermal growth factor receptor ligand amphiregulin participates in the development of mouse liver fibrosis[J]. *Hepatology*, 2008, 48(4): 1251-1261.
- [24] CONNEELY K N, CAPELL B C, ERDOS M R, et al. Human longevity and common variations in the LMNA gene: a meta-analysis [J]. *Aging Cell*, 2012, 11(3): 475-481.
- [25] RAGNAUTH C D, WARREN D T, LIU Y W, et al. Prelamin A acts to accelerate smooth muscle cell senescence and is a novel biomarker of human vascular aging[J]. *Circulation*, 2010, 121(20): 2200-2210.
- [26] VITERI G, CHUNG Y W, STADTMAN E R. Effect of progerin on the accumulation of oxidized proteins in fibroblasts from Hutchinson Gilford progeria patients[J]. *Mech Ageing Dev*, 2010, 131(1): 2-8.
- [27] OSORIO F G, BÁRCENA C, SORIA-VALLES C, et al. Nuclear lamina defects cause ATM-dependent NF- $\kappa$ B activation and link accelerated aging to a systemic inflammatory response [J]. *Genes Dev*, 2012, 26(20): 2311-2324.
- [28] BORRELLI A, SCHIATTARELLA A, BONELLI P, et al. The functional role of MnSOD as a biomarker of human diseases and therapeutic potential of a new isoform of a human recombinant MnSOD [J]. *Biomed Res Int*, 2014, 2014: 476789.
- [29] SUN G G, WANG Y D, HU W N, et al. Effects of manganese superoxide dismutase (MnSOD) expression on regulation of esophageal cancer cell growth and apoptosis *in vitro* and in nude mice [J]. *Tumour Biol*, 2013, 34(3): 1409-1419.
- [30] LI P F, XIONG F, XING H Y, et al. Retinoic acid inhibits the pyroptosis of degenerated nucleus pulposus cells by activating Sirt1-SOD2 signaling [J]. *Connect Tissue Res*, 2023, 64(4): 337-349.
- [31] HU W S, LIAO W Y, CHANG C H, et al. Paracrine IGF-1 activates SOD2 expression and regulates ROS/p53 axis in the treatment of cardiac damage in D-galactose-induced aging rats after receiving mesenchymal stem cells [J]. *J Clin Med*, 2022, 11(15): 4419.