

doi:10.6040/j.issn.1673-3770.0.2024.011

基于 GEO 数据库筛选年龄相关性听力损失关键基因的分析研究

张丽霞, 李琳

山西白求恩医院(山西医学科学院)/山西医科大学第三医院/同济山西医院, 山西 太原 030032

摘要: **目的** 应用生物信息学方法筛选年龄相关性听力损失的关键基因, 探讨为年龄相关性听力损失的临床诊断和治疗提供新理论依据。 **方法** 从 GEO 数据库中获取与年龄相关性听力损失相关的两个数据集, 通过 GEO2R 工具分析差异表达基因; 利用 DAVID 在线软件对差异表达基因进行功能富集分析; 利用 STRING 数据库和 Cytoscape 软件构建蛋白互作网络图; 利用 Cytoscape 软件中的 CytoHubba 插件筛选出关键基因, 最后在动物模型中加以验证。 **结果** 从 GSE127204 和 GSE196870 数据集中选出 100 个共有差异基因(differentially expressed genes, DEGs); GO(gene ontology, GO)和 KEGG(kyoto encyclopedia of genes and genome, KEGG)富集分析发现差异表达基因主要富集在细胞因子-细胞因子受体相互作用等通路; 利用 Cytoscape 软件筛选出关键基因, 包括 *IRF7*、*PTPRC*、*CXCL10*、*IFI44*、*IFI204*、*USP18* 和 *CD4*。在此基础上通过 RT-qPCR 检测小鼠耳蜗组织中 7 个关键基因的表达, 进一步验证以上 7 个基因在年龄相关性耳聋中均为高表达。 **结论** 本研究利用生物信息学筛选结合 RT-qPCR 检测小鼠耳蜗组织等实验结果, 证实了年龄相关性听力损失中 7 个关键基因表达显著升高。该研究为年龄相关性听力损失的前期诊断和临床治疗提供新思路 and 理论依据。

关键词: 年龄相关性听力损失; 枢纽基因; 蛋白互助作用; 富集分析

中图分类号: R764.43 文献标志码: A 文章编号: 1673-3770(2025)03-0104-11

引用格式: 张丽霞, 李琳. 基于 GEO 数据库筛选年龄相关性听力损失关键基因的分析研究[J]. 山东大学耳鼻喉眼学报, 2025, 39(3):104-114. ZHANG Lixia, LI Lin. Research on screening the key genes of age-related hearing loss by GEO database[J]. Journal of Otolaryngology and Ophthalmology of Shandong University, 2025, 39(3):104-114.

Research on screening the key genes of age-related hearing loss by GEO database

ZHANG Lixia, LI Lin

Shanxi Bethune Hospital/Shanxi Academy of Medical Sciences/Third Hospital of Shanxi Medical University, Tongji Shanxi Hospital, Taiyuan 030032, Shanxi, China

Abstract: Objective Screen for the key genes of age-related hearing loss (ARHL) using bioinformatics methods, and provide a new theoretical basis for the clinical diagnosis and treatment of ARHL. **Methods** Two data sets related to ARHL were obtained from the GEO database and differentially expressed genes (DEGs) were analyzed using the GEO2R tool. DEGs were analyzed using Gene Ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genome (KEGG) enrichment analysis using the DAVID tool, and a protein-protein interaction (PPI) network was constructed based on STRING database and Cytoscape software. The key genes were screened by the CytoHubba plug-in in Cytoscape software. Key genes were verified in the DEAF model mice. **Results** 100 DEGs (Differentially Expressed Genes) were selected from the GSE127204 and GSE196870 datasets, and the enrichment analysis of GO and KEGG found that they were mainly enriched in cytokine-cytokine receptor interaction and other pathways. Key genes were selected by Cytoscape software, including *IRF7*, *PTPRC*, *CXCL10*, *IFI44*, *IFI204*, *USP18* and *CD4*. On this basis, RT-qPCR was used to detect the expression of 7 key genes in mouse cochlear tissue, which further verifying that the above 7 genes were highly expressed in age-related deafness. **Conclusion** In this study, bioinformatics screening combined with RT-qPCR detection of mouse cochlear tissue and other experimental results confirmed that the expression of 7 key genes was significantly increased in age-related hearing loss. This study provides a new idea and theoretical basis for the early diagnosis and clinical treatment of age-related hearing loss.

Key words: Age-related hearing loss; Hub genes; Protein-protein interaction; Enrichment analysis

收稿日期: 2024-01-08

基金课题: 山西省青年科学研究项目 (202203021212107)

通信作者: 李琳. E-mail: lilinbaobei1209@126.com

听力损失 (hearing loss, HL) 发病率高于心血管疾病、糖尿病和癌症^[1]。2021 年世界卫生组织发布的《世界听力报告》中指出全世界 HL 发病率超过 5%，预计到 2025 年 HL 患者将达到 25 亿^[2]。年龄相关性听力损失 (aging-related HL, ARHL) 也称为老年性耳聋，是一种由于听觉系统老化的累积效应引起的疾病，患者存在言语辨别以及声音检测和定位困难的问题，进而导致患者孤立、与他人沟通困难、认知能力下降等症状^[3]。考虑到 ARHL 可能是痴呆患病的一个危险因素，因此亟需通过治疗和干预措施来改善 ARHL。

有研究^[4-5]发现遗传易感性是 ARHL 的一项重要诱导因素，全基因组关联研究被广泛用于 ARHL 的遗传成分去研究分析，目前已发现许多候选基因与 ARHL 相关，这些基因可能在耳蜗微环境的信号转导和维持中发挥重要作用。治疗 ARHL 的先决条件是了解其潜在的分子机制，然而目前我们对 ARHL 的分子机制的认知非常有限。因此进一步研究 ARHL 潜在的分子机制对于疾病的治疗和预防具有重要意义。

本研究通过美国国家生物技术信息中心基因表达综合数据库 (gene expression omnibus, GEO) 的公共数据集 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) 的 ARHL 相关基因表达谱数据集，分析其差异表达基因并构建蛋白互助作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络，进一步挖掘影响 ARHL 发生发展中的潜在的功能分子和枢纽基因 (hub genes)。在此基础上进一步通过 RT-qPCR (实时荧光定量 PCR, real-time fluorescence quantitative PCR) 验证了 ARHL 小鼠耳蜗组织中 hub 基因 (*IRF7*、*PTPRC*、*CXCL10*、*IFI44*、*IFI204*、*USP18*、*CD4*) 的表达水平。该研究为 ARHL 前期诊断的临床治疗提供新的理论依据。

1 资料与方法

1.1 数据来源

从 GEO 数据库中检索与“ARHL”或“hearing loss”相关的数据集，筛选符合以下标准的数据集：①对人类或者模式动物的耳聋样本进行微阵列或高通量测序谱研究，并提供对照/健康样本进行比较；②数据集与年龄相关性听力损失相关；③有足够样本量的分析报告 ($n \geq 3$)；④样本有明确分组以及处理方式；⑤原始数据的可被

调用。

经过筛选确定 2 个 mRNA 的测序数据集：GSE127204 和 GSE196870。GSE127204 数据集总共有 6 个小鼠样本，包括 3 个对照组样本 (年龄为 1 个月)、3 个年龄相关性耳聋组 (ARHL 组) 样本 (年龄为 12 个月)。GSE196870 数据集总共有 8 个小鼠样本，包括 4 个对照组样本 (年龄为 2 个月)、4 个年龄相关性耳聋组 (ARHL 组) 样本 (年龄为 12 个月)。使用 GEO2R (www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/geo2r) 对数据集进行分析，按照 $P < 0.05$ 和 $|\log FC| \geq 0.5$ 的筛选标准，在 GSE127204 和 GSE196870 两个数据集中确定对照组和 ARHL 组的差异表达基因 (different expressed genes, DEGs)。通过 R 语言软件 (版本 3.6.0) 中的“ggplot2”和“pheatmap”安装包对 DEGs 分别绘制火山图和热图进行可视化。此外，利用 R 语言软件中的“ClusterProfiler”安装包，分别对 GSE127204 和 GSE196870 数据集中的所有 DEGs 进行 GSEA 通路富集分析。最后，通过韦恩作图确定出 GSE127204 和 GSE196870 数据集中的共有差异表达基因。

1.2 方法

1.2.1 差异表达基因的功能富集

使用生物信息学数据库 (<https://david.ncifcrf.gov/summary.jsp>) 对共有差异表达基因进行 GO 富集分析 (gene ontology enrichment analysis) 和 KEGG 富集 (kyoto encyclopedia of genes and genomes enrichment analysis) 分析，通过微生信 (<http://www.bioinformatics.com.cn/login/>) 从差异表达基因的 GO、KEGG 富集分析中挑选 P 值最小 (即富集最显著) 的结果绘制富集分析柱状图和富集分析气泡图。

1.2.2 PPI 网络的建设和 Hub 基因的鉴定

利用 STRING (<https://www.string-db.org/>) 在线数据库分析 DEGs，预测可能在 ARHL 发病机制中发挥重要作用的基因编码的蛋白之间的相互作用关系，置信交互作用评分的显著性标准设定为 0.400。随后，使用 Cytoscape 软件 (www.cytoscape.org/) 对 PPI 网络进行可视化。在 Cytoscape 软件中，通过 CytoHubba 插件中的节点度算法计算评分，选择排列在前 7 位的基因作为 Hub 基因并进行后续研究。

1.2.3 关键基因分析和表达

利用 R 软件中的“GOplot”包绘制了关键基因的 GO 富集弦图;通过基因表达谱交互分析 (<http://gepia.cancer-pku.cn/>) 绘制受试者工作特征 (area under the curve, AUC) 曲线,相应的 ROC 曲线下面积 (receiver operating characteristic curve, ROC) 评估所选基因的诊断准确性,并分析关键基因在耳聋模型和正常组织中的表达谱;利用 R 软件中的“ggridges”安装包绘制了关键基因表达的山脊线图;选用 Hub 基因在原始样本数据中的表达量作为变量进行主成分分析,用 R 软件中的“factoextra”安装包进行 PCA 主成分分析,得到 PC1 与 PC2 两个主成分变量。

基于 GSE127204 和 GSE196870 的样本数据,用 R 软件中的“ggplot2”包绘制了 7 个关键基因表达的小提琴图。

1.2.4 动物实验验证关键基因

所有研究方案均得到了本院动物护理和使用委员会的批准 (YXLL-2023-290)。选取 2、12、18、24 个月龄 SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠各 6 只 (斯贝福公司,北京)。置动物中心独立通风饲养盒饲养,温度 24 ℃,相对湿度 55%~65%,12 h 昼夜节律,自由饮食和饮水。

采用 Trizol 试剂法提取各组耳蜗组织细胞总 RNA,SYBR 法对 cDNA 样品进行 qPCR 检测。具体步骤如下:取 5 μL 总 RNA 样品,用无 RNA 酶超纯水稀释 20 倍,紫外分光光度计测定 RNA 的浓度及 260 nm 和 280 nm 处的吸收值,OD₂₆₀/OD₂₈₀为 1.9~2.0 时说明纯度较高,能够满足后续实验需要。在 PCR 扩增仪 (赛默飞公司,美国) 进行逆转录合成 cDNA 模版,用 ABI7500 定量 PCR 仪 (应用生物系统公司,美国) 进行 RT-qPCR 实验,反应条件为:95 ℃ 预变性 30 s,95 ℃ 变性 10 s,60 ℃ 退火 30 s,40 个循环。GAPDH 为内参。得到的循环阈值 (cycle threshold, CT) 采用 2^{-ΔΔCt} 法进行分析,公式如下: ΔΔCt = [Ct (目的基因) - Ct (内参基因)] 实验组 - [Ct (目的基因) - Ct (内参基因)] 对照组。Ct 为反应的实时荧光强度达到设定的阈值时所经过的扩增循环数,此时扩增呈对数期增长。实验重复 3 次,引物序列见表 1。

表 1 引物序列信息
Table 1 Primer sequence

引物名称	引物序列(5'-3')
GAPDH-F	GAGTCAACGGATTGGTCGT
GAPDH-R	TTGATTTTGGAGGGATCTCG
Irf7-F	CCAGTTGATCCGCATAAGGT
Irf7-R	GAGCCCAGCATTCTCTCTTG
Ptpre-F	AAACCCAGAAGGCTGGAAGT
Ptpre-R	TTTGCTGTGGCCATTCATAA
Cxcl10-F	CCCACGTGTTGAGATCATTG
Cxcl10-R	CACTGGGTAAAGGGGAGTGA
IFI44-F	CAGGCTTGGTCACTGAGACA
IFI44-R	CTGCACACTCGCCTTGTA
IFI204-F	CTGGATTGGGCAAAGTATT
IFI204-R	CTCTTCTGGGTTGCAGAAG
USP18-F	TGAAAGCTCACACACGGAAG
USP18-R	GTATCCCCACATTTGCATC
Cd4-F	CAGGAAGTGAACCTGGTGGT
Cd4-R	TCCTGGAGTCCATCTTGACC

1.3 统计学处理

应用 GraphPad Prism 8.0 进行数据处理。RT-qPCR 检测小鼠耳蜗组织中 hub 基因表达采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,单因素方差分析后的两两比较采用 Tukey 多重检验法。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 差异基因鉴定

GSE196870 数据集中总共筛选出 1 025 个 DEGs,包括 863 个上调基因和 162 个下调基因。GSE127204 数据集中总共筛选出 1 496 个 DEGs,包括 788 个上调基因和 708 个下调基因。对两个数据集中这些差异基因进行聚类分析,得到差异基因的火山图 (图 1A 和 1B)。

随后分别绘制了 GSE196870 和 GSE127204 数据集中的上调和下调的前 15 个 DEGs 的表达热图 (图 1C 和 1D)。韦恩图显示,GSE196870 数据集和 GSE127204 数据集的交集处有 100 个 DEG (图 1E)。并对两个数据集中的上调和下调的前 15 个 DEGs 进行展示 (表 2、3)。

对两个基因集的所有 DEGs 进行基因集层面的富集分析,并选择最显著的三条通路进行展示 (图 2A、2B)。

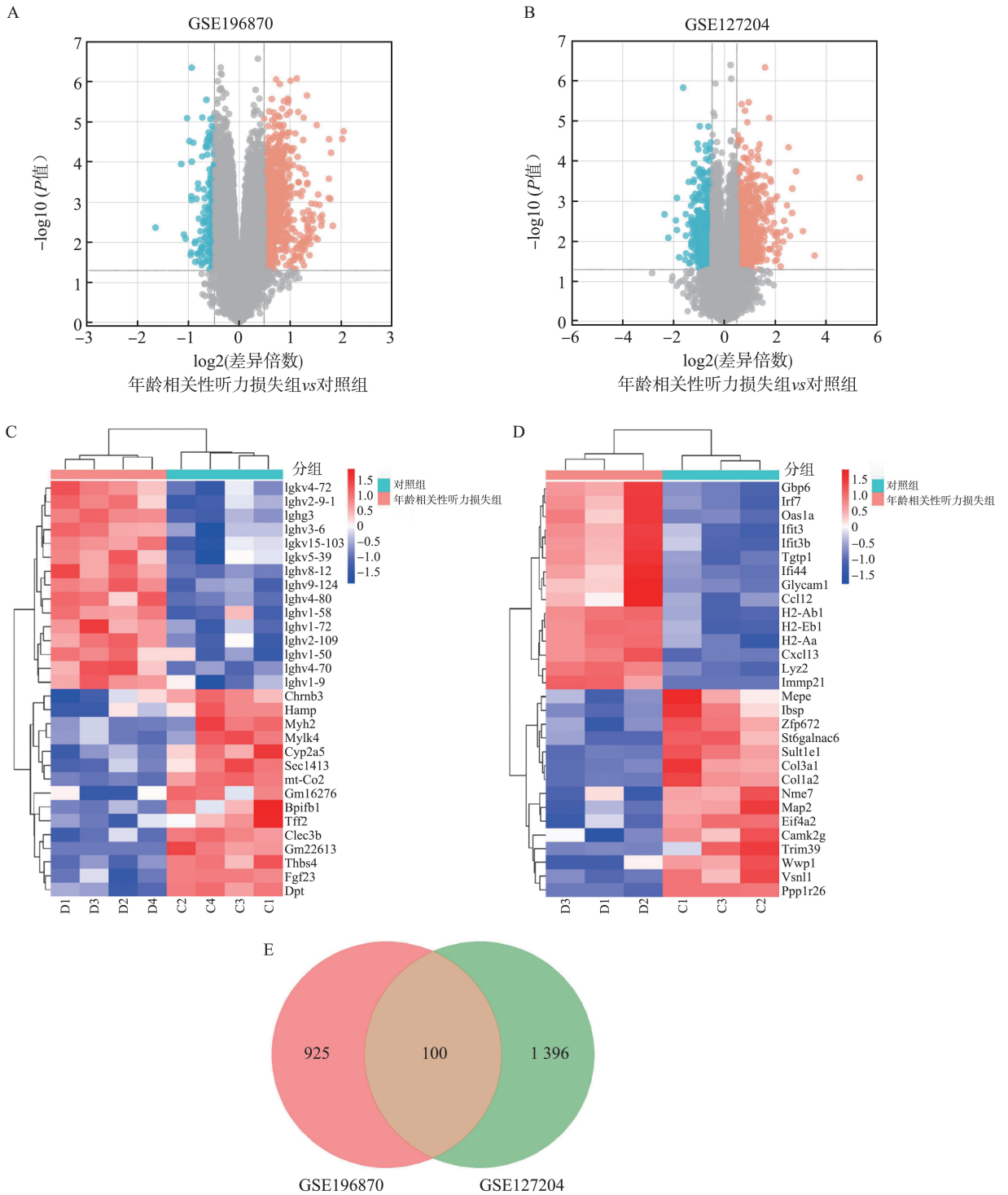


图 1 差异表达基因鉴定

A: GSE196870 数据集中 DEGs 的火山图; B: GSE127204 数据集中 DEGs 的火山图; C: GSE196870 数据集中前 15 个上调和下调 DEGs 的热图; D: GSE127204 数据集中前 15 个上调和下调 DEGs 的热图; E: GSE196870 与 GSE127204 共有差异基因 Venn 图

Figure 1 Identification of differentially expressed genes

A: Volcano plot of DEGs in the GSE196870 dataset; B: Volcano plot of DEGs in the GSE127204 dataset; C: Heat map of the top 15 up-regulated and down-regulated DEGs in the GSE196870 dataset; D: Heat map of the top 15 up-regulated and down-regulated DEGs in the GSE127204 dataset; E: Venn diagram of differential genes shared between GSE196870 and GSE127204

表 2 GSE127204 数据集上调和下调的前 15 的差异表达基因
Table 2 Top 15 up-regulated and down-regulated differentially expressed genes in the GSE127204 dataset

基因名	log ₂ FC	P	表达水平
Immp21	5.31	0.000 259	上调
Glycam1	3.54	0.022 451	上调
Irf7	3.08	0.005 544	上调
Cxcl13	2.81	0.000 180	上调
H2-Ab1	2.67	0.000 483	上调
H2-Aa	2.66	0.001 950	上调
Ifit3	2.58	0.007 230	上调
Lyz2	2.52	0.000 045	上调
H2-Eb1	2.46	0.001 264	上调
Oas1a	2.41	0.005 213	上调
Gbp6	2.34	0.003 080	上调
Ifit3b	2.31	0.010 053	上调
Tgtp1	2.22	0.005 980	上调
Ccl12	2.20	0.041 697	上调
Ifi44	2.16	0.014 633	上调
Nme7	-1.33	0.033 238	下调
Mepe	-1.39	0.035 306	下调
Sult1e1	-1.41	0.000 330	下调
Zfp672	-1.42	0.003 747	下调
Wwp1	-1.51	0.019 815	下调
Map2	-1.52	0.007 196	下调
Vsnl1	-1.52	0.002 099	下调
Camk2g	-1.55	0.028 466	下调
Ppp1r26	-1.63	0.000 001	下调
Trim39	-1.78	0.024 882	下调
Col1a2	-1.87	0.000 825	下调
Eif4a2	-1.87	0.005 166	下调
Col3a1	-1.91	0.002 990	下调
Ibsp	-2.20	0.008 117	下调
St6galnac6	-2.36	0.002 124	下调

表 3 GSE196870 数据集上调和下调的前 15 的差异表达基因
Table 3 Top 15 up-regulated and down-regulated differentially expressed genes in the GSE196870 dataset

基因名	log ₂ FC	P	表达水平
Ighg3	2.05	0.000 017	上调
Igkv9-124	2.03	0.000 026	上调
Ighv1-50	1.84	0.003 868	上调
Igkv4-80	1.80	0.000 058	上调
Igkv4-72	1.79	0.000 820	上调
Ighv8-12	1.76	0.000 027	上调
Igkv4-70	1.76	0.000 260	上调
Ighv1-72	1.76	0.000 783	上调
Ighv3-6	1.63	0.002 110	上调
Ighv1-58	1.62	0.002 989	上调
Ighv1-9	1.61	0.003 811	上调
Igkv15-103	1.59	0.002 423	上调
Ighv2-9-1	1.57	0.001 162	上调
Igkv2-109	1.55	0.000 644	上调
Igkv5-39	1.54	0.008 395	上调
Chrb3	-0.87	0.009 442	下调
Mylk4	-0.87	0.010 462	下调
Dpt	-0.91	0.000 032	下调
Clec3b	-0.93	0.000 032	下调
mt-Co2	-0.94	0.000 044	下调
Cyp2a5	-0.94	0.000 882	下调
Sec14l3	-0.94	0.000 708	下调
Gm16276	-0.95	0.017 586	下调
Myh2	-0.96	0.020 576	下调
Thbs4	-0.98	0.000 030	下调
Gm22613	-1.03	0.000 080	下调
Tff2	-1.05	0.008 101	下调
Hamp	-1.09	0.006 368	下调
Fgf23	-1.14	0.000 112	下调
Bpifb1	-1.64	0.004 266	下调

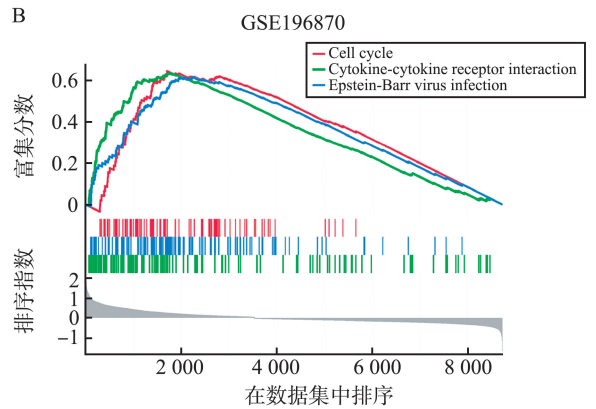
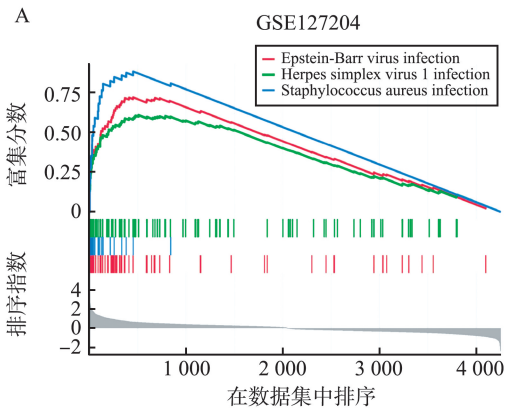


图 2 GSEA 富集分析

A: GSE127204 数据集; B: GSE196870 数据集

Figure 2 GSEA enrichment analysis

A: GSE127204 dataset; B: GSE196870 dataset

2.2 DEGs 的功能富集分析

根据前面的结果,对 GSE196870 和 GSE127204 数据集共有的 DEGs 进行 GO 和 KEGG 功能分析。按照分子功能、生物过程和细胞组分进行 GO 分类,挑选富集最显著的前 10 个 GO term 条目制作气泡图(图 3A~3C),横坐标代表富集倍数,纵坐标代表富集条目,节点大小代表富集到的基因数目,节点颜色代表 P 值大小,结果显示共有的 DEGs 主要与双链 RNA 结合、GTP 酶活性和糖聚聚糖结合等分子功能显著相关。此外,DEGs 主要参与对病毒的防御反应、细胞对 β -干

扰素的反应和细胞因子介导的信号通路等生物学过程。

细胞组分分析结果显示 DEGs 主要与炎症小体复合物、早期内质体膜和早期内质体具有显著相关性。根据基因的 KEGG 富集分析结果,筛选 P 值最小即富集程度最高的前 10 的通路制作气泡图(图 3D),横坐标代表富集倍数,纵坐标代表富集条目,节点大小代表富集到的基因数目,节点颜色代表 P 值大小,结果显示共有 DEGs 主要集中在 NOD 样受体信号通路、细胞因子-细胞因子受体相互作用和 RIG-I 样受体信号等通路中。

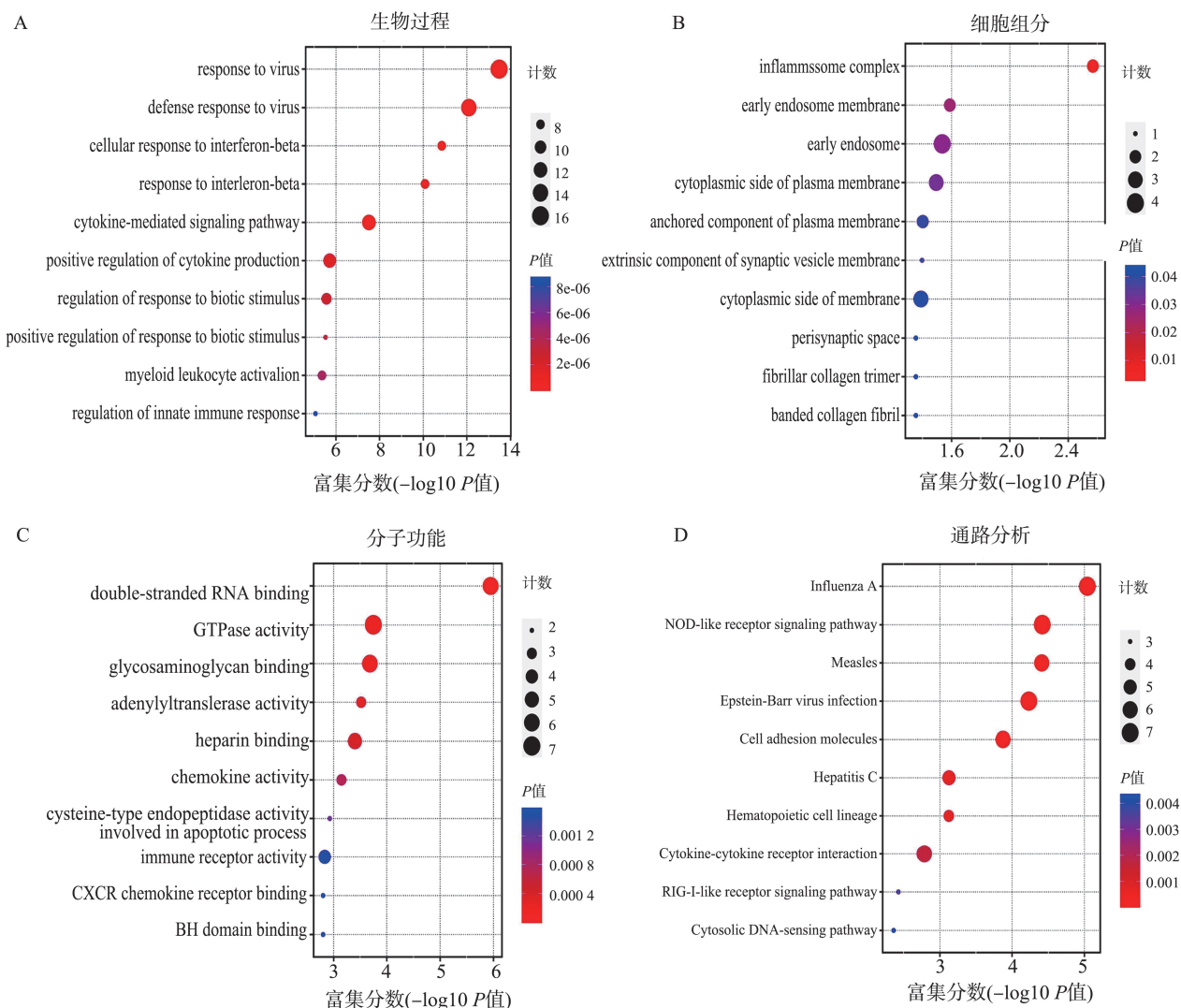


图 3 共有 DEGs 的功能富集分析

A~C: 共有 DEGs 分子功能、生物过程和细胞组分的 GO 富集分析气泡图; D: 共有 DEGs 的 KEGG 气泡图

Figure 3 Functional enrichment analysis of common DEGs

A-C: Bubble plot of GO enrichment analysis of common DEGs; Cellular Component、Biological Process、Cellular Component; D: Bubble plot of KEGG enrichment analysis of common DEGs

2.3 Hub 基因的鉴定和分析

利用 STRING 工具进行差异基因的相互作用分析,构建基于 DEGs 的 PPI 网络(图 4A)。利用

Cytoscape 软件对 PPI 网络模型进行分析。通过 cytoHubba 中的节点度算法筛选出 top 7 评分的基因,包括: *IRF7*、*PTPRC*、*CXCL10*、*IFI44*、*IFI204*、

USP18 和 CD4,相关图形直接从 Cytoscape 软件中输出(图 4B)。

我们根据选定的 7 个 hub 基因在 GSE196870 原始样本数据中的表达量作为变量进行了主成分,表达分布和相关性分析。主成分分析得到了 PC1 与 PC2 主成分变量,它们合计可以提供 97.3%的解 释率,可以作为区分对照组样本与模型组样本的依

据(图 5A)。然后,我们利用 R 语言绘制了关键基 因表达的山峦图,揭示了基因在样本中的密度分布 (图 5B)。此外,为了揭示所选基因之间的相关性, 研究绘制了关键基因的相关性热图(图 5C)。结果 显示,IRF7 与 IFI44、IFI204、USP18,以及 IFI44 与 USP18,IFI204 与 CD4、USP18 之间具有显著的正相 关性。CXCL10 与 CD4、PTPRC 之间具有负相关性。

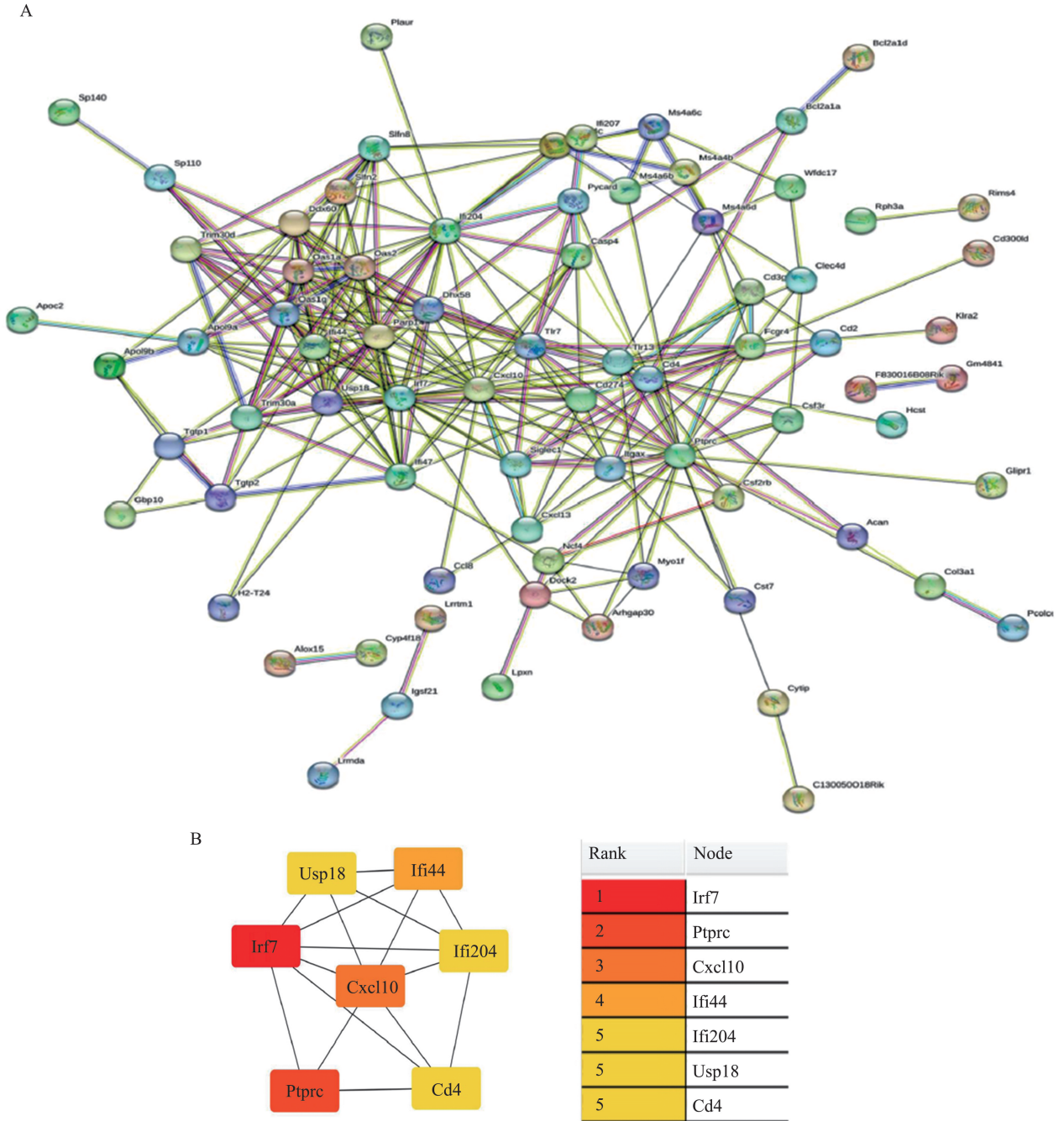


图 4 Hub 基因分析

A:DEG 蛋白的 PPI 网络; B:基于 CytoHubba 的 degree 分析鉴定得分最高的前 7 个基因

Figure 4 Hub gene analysis

A: PPI of common DEGs; B: The top seven genes with the highest score identified based on Degree analysis in Cyto-Hubba

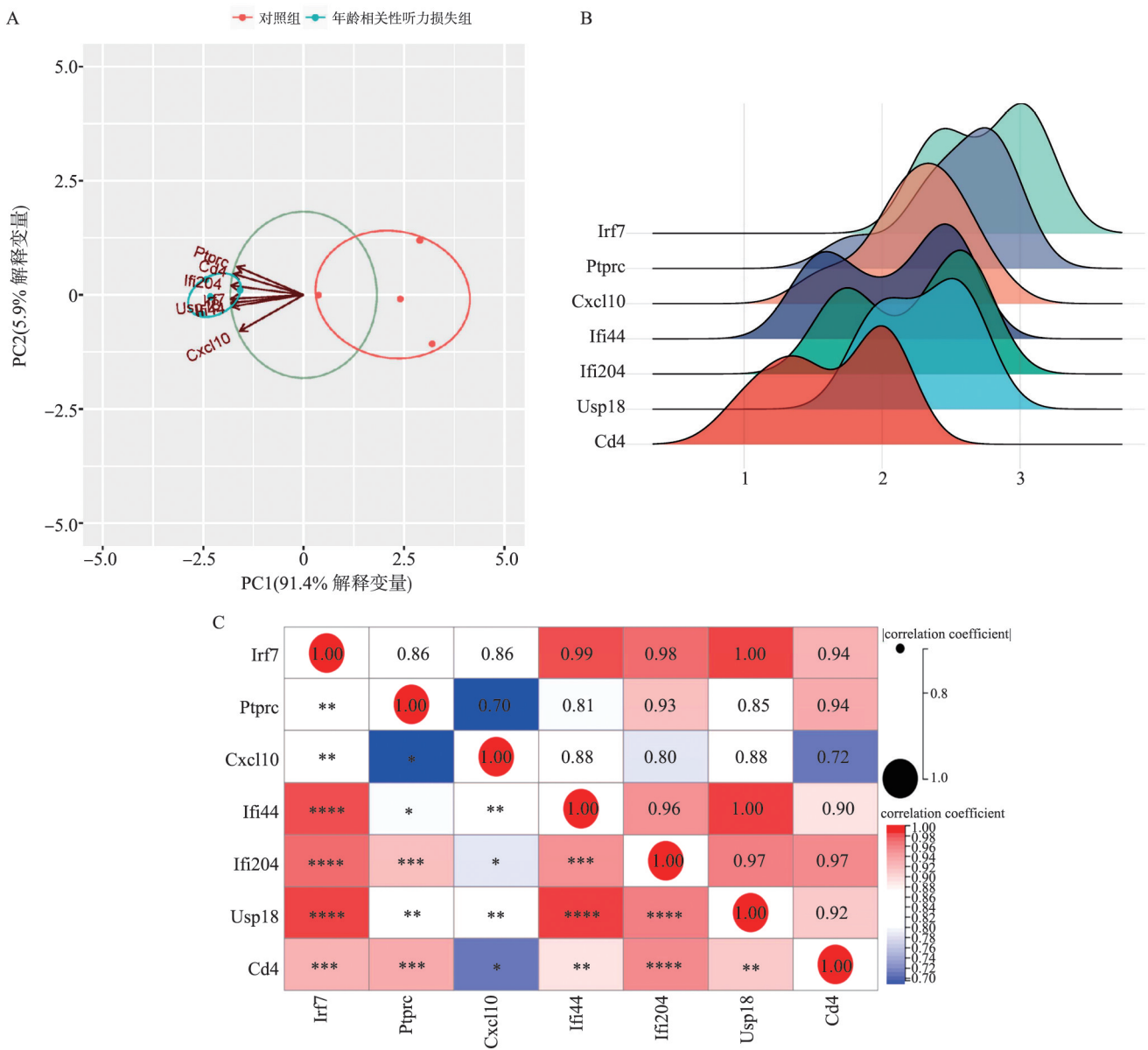
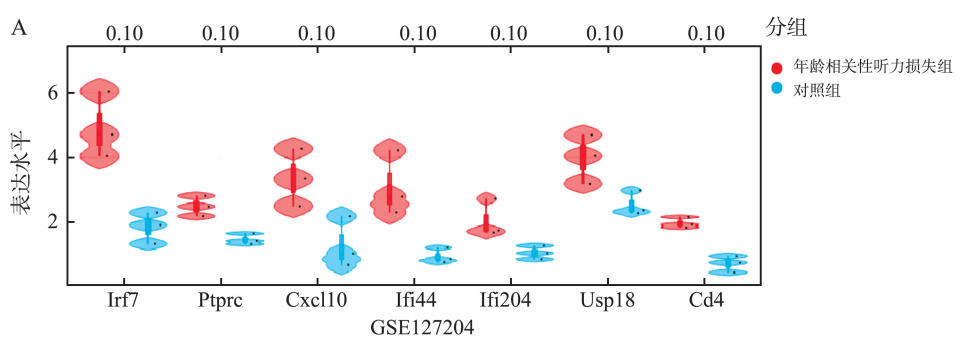


图 5 关键基因分析
 A: PCA 主成分分析; B: 关键基因表达的山峦图; C: 矩阵相关性分析
 Figure 5 Hub gene analysis
 A: PCA principal component analysis; B: Mountain plot of hub gene; C: Matrix correlation analysis

2.4 关键基因在 ARHL 中高表达

为了验证上述 7 个 hub 基因在两个数据集中的表达是否一致, 我们利用基因在 GSE127204 和 GSE196870 的样本数据分别绘制了表达的小提琴

图进行可视化, 见图 6。结果显示, 两个数据集中表达趋势相似, 与对照组相比较, 7 个关键基因在年龄相关性听力损失组中的表达显著升高。



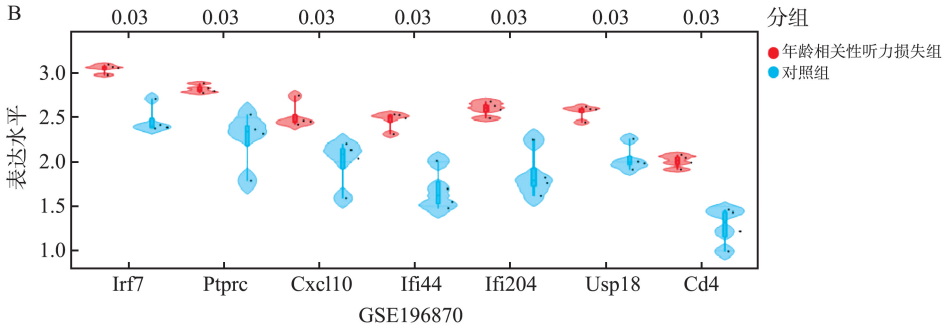


图 6 在 GSE127204 和 GSE196870 数据集中,关键基因在年龄相关性耳聋中的表达水平
A: 在 GSE127204 数据集中,对 hub 基因的表达进行可视化;B: 在 GSE196870 数据集中,对 hub 基因的表达进行可视化。
Figure 6 Expression levels of key genes in age-related ears in the GSE127204 and GSE196870 datasets

A: The expression of hub genes was visualized in the GSE127204 dataset; B: The expression of hub genes was visualized in the GSE196870 dataset

2.5 RT-qPCR 验证关键基因的表达

RT-qPCR 结果显示,与 2 月龄小鼠相比较,12、18、24 月龄组小鼠耳蜗组织中 *IRF7*、*PTPRC*、

CXCL10、*IFI44*、*IFI204*、*USP18* 和 *CD4* 表达均显著升高 ($P < 0.01$),这也于先前的生物信息学分析结果一致。见图 7、表 4。

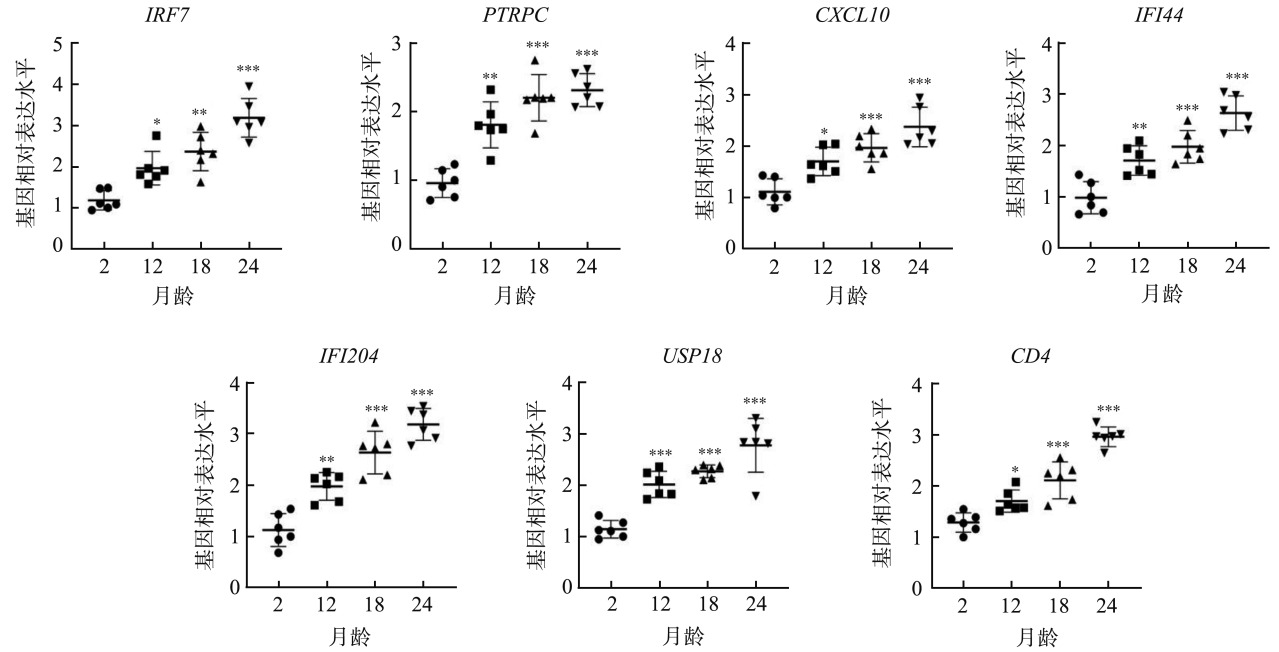


图 7 RT-qPCR 验证候选基因表达水平

Figure 7 RT-qPCR was used to verify the expression levels of candidate genes

注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs. 2 月龄组。

表 4 RT-PCR 验证候选基因表达水平

Table 4 RT-PCR was used to verify the expression levels of candidate genes

基因	12 月龄组 vs. 2 月龄组	18 月龄组 vs. 2 月龄组	24 月龄组 vs. 2 月龄组
IRF7	0.016 4	0.000 3	<0.000 1
PTPRC	0.000 3	<0.000 1	<0.000 1
CXCL10	0.014 0	0.000 4	<0.000 1
IFI44	0.003 6	0.000 1	<0.000 1
IFI204	0.001 4	<0.000 1	<0.000 1
USP18	0.000 5	<0.000 1	<0.000 1
CD4	0.040 4	<0.000 1	<0.000 1

3 讨论

ARHL 是一种与遗传和环境因素有关的多因素疾病,阐明老年性耳聋的发病机制和进展将有助于其预防和治疗,随着微阵列和生物信息学分析技术的进步,我们可以在此基础上研究 ARHL 发生发展及其潜在的分子机制。在本研究中我们使用了两个公开的 ARHL 小鼠 mRNA 微阵列数据集(GSE127204 和 GSE196870)。在数据集 GSE127204 和 GSE196870 中,我们总共获得 100 个 DEGs。对这 100 个共有的 DEGs 进行 GO 和 KEGG 功能富集分析显示,DEGs 主要富集在对病毒和干扰素- β 的反应,NOD 样受体信号通路,细胞因子-细胞因子受体相互作用的通路,和肿瘤坏死因子超家族细胞因子产生的调控通路中。ARHL 受病毒感染的影响,尤其是人类巨细胞病毒^[6]。人类巨细胞病毒感染成纤维细胞会诱导 *DFNA7* 和 *DFNA49* 位点之间 1q23.3 处的染色体断裂,这两个基因位点均与显性遗传、感音神经、听力障碍有关。干扰素- β 在免疫系统应对病毒感染和其他刺激时发挥重要作用。一项研究显示褪黑素治疗通过抑制干扰素- β 、干扰素- α 和 IL-6 等炎症细胞因子的表达,延缓了 C57BL/6J 老年性耳聋小鼠模型中的听力损失的发展^[7]。细胞因子是由细胞合成、分泌的具有生物活性的小分子蛋白质,与受体结合后具有调控细胞生长分化、调节免疫等作用。前期研究^[8]发现细胞因子-细胞因子受体相互作用通路在免疫方面具有重要作用,在发生炎症时调控细胞因子与受体结合发挥作用。例如,*TNF- α* 和 *PTGS2* 能够与 NF- κ B 相互作用调节炎症和免疫反应^[9]。以上结果证明,GSE127204 和 GSE196870 数据集的 DEGs 主要富集在炎症和免疫相关信号通路上。

通过 cytoHubba 中的节点度算法分析筛选出 7 个关键基因,包括:*IRF7*、*PTPRC*、*CXCL10*、*IFI44*、*IFI204*、*USP18* 和 *CD4*。*IRF7* 是一种转录因子,在病毒感染的先天免疫反应中起着至关重要的作用。*TLR9* 激动剂 CpG 寡脱氧核苷酸加剧了卡那霉素诱导的耳毒性,并增加耳蜗炎症,这与耳蜗中的 *IRF-7* 以及 *TNF- α* 、*IL-1*, and *IL-6* 的转录水平具有一定的相关性^[10]。*PTPRC*,也称为 *CD45*,是一种 C 型蛋白酪氨酸磷酸酶受体,它是调节免疫细胞信号传导和功能的关键分子^[11]。在听力损伤或耳毒性药物治疗后,免疫系统细胞会浸润耳蜗,*CD45* 是第一个用于识别噪声损伤后浸润耳蜗的免疫细胞的标记物^[12]。*CXCL10* 是一种参与免疫反应和炎症的小

蛋白信号分子,由包括免疫细胞在内的各种细胞类型产生,以应对感染、炎症或其他免疫相关刺激。先天性巨细胞病毒感染会引起感音神经性听力损失,而一项研究显示先天性巨细胞病毒感染会导致小胶质细胞衍生的趋化因子 *CXCL9/CXCL10* 的表达急剧增加^[13-14]。在 ARHL 中,褪黑素治疗能够显著改善听力,与其降低 *CXCL10* 的表达具有一定的相关性^[7]。此外,声损伤后小鼠耳蜗先天免疫和糖皮质激素信号通路基因的靶向 PCR 阵列分析中,发现 *CXCL10* 在暴露于噪声的耳蜗中显著上调^[15]。在本研究中,我们发现 *CXCL10* 在 ARHL 中显著上调。*IFI44* 和 *IFI204* 是两种不同的干扰素诱导蛋白,它们是对病毒感染的先天免疫反应的一部分。这些蛋白质在对干扰素的反应中上调。*IFI44* 是系统性红斑狼疮的重要生物标志物^[16]。*IFI204* 作为 p200 家族蛋白的成员,参与炎症反应和自身免疫调节^[17]。而有关于 *IFI44* 和 *IFI204* 在 ARHL 中的作用和机制的报道较少。在本研究中,我们发现 *IFI44* 和 *IFI204* 在 ARHL 中表达上调,可能通过调节炎症反应和免疫系统影响 ARHL 的进展。*USP18* 在干扰素信号通路和先天免疫反应的调节中发挥关键的作用。I型和III型干扰素、Toll 样受体激动剂脂多糖 (Lipopolysaccharide, LPS) 和 polyI:C 以及 *TNF- α* 都会强烈诱导 *USP18* 的表达。因此,病毒或细菌感染后,细胞中 *USP18* 的 RNA 和蛋白质水平会升高^[18]。目前,*USP18* 与 ARHL 之间的相关性还不清楚。在本研究中,我们发现 *USP18* 在 ARHL 中表达增加。*CD4*,是一种细胞表面糖蛋白,主要存在于 T 辅助细胞或 *CD4*⁺ T 细胞的免疫细胞亚群中。*CD4* 在适应性免疫反应中起着核心作用。研究显示 *CD4*⁺ T 细胞参与 ARHL 的进展^[19]。在生信分析的基础上,本研究在老年小鼠中对 7 个候选基因进行了表达验证。实验结果与生信分析结果具有一致性。

综上所述,我们得出结论:*IRF7*、*PTPRC*、*CXCL10*、*IFI44*、*IFI204*、*USP18* 和 *CD4* 基因是 ARHL 发生的关键基因且在 ARHL 中都表现为高表达。本研究发现对于 ARHL 的诊断和治疗具有积极意义,但具体的作用机制还需要进一步的探究。

参考文献:

- [1] Hu SY, Sun QR, Xu F, et al. Age-related hearing loss and its potential drug candidates: a systematic review[J]. Chin Med, 2023, 18(1): 121. doi:10.1186/s13020-023-00825-6

- [2] Lahlou G, Calvet C, Giorgi M, et al. Towards the clinical application of gene therapy for genetic inner ear diseases[J]. *J Clin Med*, 2023, 12(3): 1046. doi:10.3390/jcm12031046
- [3] Shende SA, Mudar RA. Cognitive control in age-related hearing loss: a narrative review [J]. *Hear Res*, 2023, 436: 108814. doi:10.1016/j.heares.2023.108814
- [4] Yang W, Zhao XL, Chai RJ, et al. Progress on mechanisms of age-related hearing loss [J]. *Front Neurosci*, 2023, 17: 1253574. doi:10.3389/fnins.2023.1253574
- [5] Keithley EM. Pathology and mechanisms of cochlear aging [J]. *J Neurosci Res*, 2020, 98(9): 1674-1684. doi:10.1002/jnr.24439
- [6] Lang HN, Noble KV, Barth JL, et al. The stria vascularis in mice and humans is an early site of age-related cochlear degeneration, macrophage dysfunction, and inflammation [J]. *J Neurosci*, 2023, 43(27): 5057-5075. doi:10.1523/JNEUROSCI.2234-22.2023
- [7] Liu JL, Chen HY, Lin XY, et al. Melatonin suppresses cyclic GMP-AMP synthase-Stimulator of interferon genes signaling and delays the development of hearing loss in the C57BL/6J presbycusis mouse model [J]. *Neuroscience*, 2023, 517: 84-95. doi:10.1016/j.neuroscience.2023.01.015
- [8] Druszczynska M, Godkowicz M, Kulesza J, et al. Cytokine receptors-regulators of antimycobacterial immune response [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(3):1112. doi:10.3390/ijms23031112
- [9] Uraguchi K, Maeda Y, Takahara J, et al. Upregulation of a nuclear factor-kappa B-interacting immune gene network in mice cochleae with age-related hearing loss[J]. *PLoS One*, 2021, 16(10): e0258977. doi:10.1371/journal.pone.0258977
- [10] Yang CH, Hwang CF, Chuang JH, et al. Systemic toll-like receptor 9 agonist CpG oligodeoxynucleotides exacerbates aminoglycoside ototoxicity[J]. *Hear Res*, 2021, 411: 108368. doi:10.1016/j.heares.2021.108368
- [11] Al Barashdi MA, Ali A, McMullin MF, et al. Protein tyrosine phosphatase receptor type C (PTPRC or CD45) [J]. *J Clin Pathol*, 2021, 74(9): 548-552. doi:10.1136/jclinpath-2020-206927
- [12] Tornabene SV, Sato K, Pham L, et al. Immune cell recruitment following acoustic trauma [J]. *Hear Res*, 2006, 222(1/2): 115-124. doi:10.1016/j.heares.2006.09.004
- [13] Singh G, Gaidhane A. A review of sensorineural hearing loss in congenital cytomegalovirus infection[J]. *Cureus*, 2022, 14(10): e30703. doi:10.7759/cureus.30703
- [14] Kve tak D, Jurani Lisni V, Lisni B, et al. NK/ILC1 cells mediate neuroinflammation and brain pathology following congenital CMV infection[J]. *J Exp Med*, 2021, 218(5): e20201503. doi:10.1084/jem.20201503
- [15] Maeda Y, Kariya S, Omichi R, et al. Targeted PCR array analysis of genes in innate immunity and glucocorticoid signaling pathways in mice cochleae following acoustic trauma [J]. *Otol Neurotol*, 2018, 39(7): 593-600. doi:10.1097/MAO.0000000000001874
- [16] Wang Y, Ma CF, Ma ZB, et al. Identification and clinical correlation analysis of IFI44 in systemic lupus erythematosus combined with bioinformatics and immune infiltration analysis [J]. *J Inflamm Res*, 2023, 16: 3219-3231. doi:10.2147/JIR.S419880
- [17] Baran M, Feriotti C, McGinley A, et al. PYHIN protein IFI207 regulates cytokine transcription and IRF7 and contributes to the establishment of *K. pneumoniae* infection [J]. *Cell Rep*, 2023, 42(4): 112341. doi:10.1016/j.celrep.2023.112341
- [18] Lee EJ, Kim JY, Yeo JH, et al. ISG15-USP18 dysregulation by oxidative stress promotes IFN- γ secretion from CD8⁺T Cells in vitiligo [J]. *J Invest Dermatol*, 2024, 144(2): 273-283. doi:10.1016/j.jid.2023.08.006
- [19] Iwai H, Inaba M, van Bui D, et al. Treg and IL-1 receptor type 2-expressing CD4⁺ T cell-deleted CD4⁺ T cell fraction prevents the progression of age-related hearing loss in a mouse model [J]. *J Neuroimmunol*, 2021, 357: 577628. doi:10.1016/j.jneuroim.2021.577628

(编辑:李纬)