

肺缺血-再灌注核心基因介导的竞争性内源性RNA网络的构建

李晓凤 唐明政 刘禧禧 宋子晴 张国欣 杨开银 张凌云

【摘要】 目的 分析肺缺血-再灌注损伤发生的核心基因并构建竞争性内源性RNA (ceRNA) 网络。方法 从基因表达综合 (GEO) 数据库下载 GSE145989 的原始数据作为训练集, GSE172222 和 GSE9634 数据集作为验证集, 并鉴定差异表达基因 (DEG)。进行基因本体 (GO)、京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 富集分析。构建蛋白质-蛋白质相互作用 (PPI) 网络, 筛选核心基因并分析核心基因的诊断价值、免疫细胞的免疫浸润水平。构建并验证 ceRNA 网络。分析基于 ceRNA 网络的靶向药物。结果 共检测到 179 个 DEG, 其中 61 个下调基因, 118 个上调基因。GO 分析结果显示, DEG 与细胞迁移、分化和调节等生物学过程有关; 与内吞囊泡膜、浆膜和膜筏等细胞成分有关; 与趋化因子受体、G 蛋白偶联受体、免疫受体活性和抗原结合等分子功能有关。KEGG 分析显示 DEG 参与肿瘤坏死因子 (TNF)、Wnt、白细胞介素 (IL)-17 和核因子 (NF)- κ B 等信号通路。PPI 网络提示 CD8A、IL2RG、STAT1、CD3G 和 SYK 是肺缺血-再灌注损伤的核心基因。ceRNA 网络提示 miR-146a-3p、miR-28-5p 和 miR-593-3p 与 CD3G 的表达相关; miR-149-3p、miR-342-5p、miR-873-5p 和 miR-491-5p 与 IL2RG 表达相关; miR-194-3p、miR-512-3p、miR-377-3p 和 miR-590-3p 与 SYK 表达相关; miR-590-3p 和 miR-875-3p 与 CD8A 表达相关; miR-143-5p、miR-1231、miR-590-3p、miR-875-3p 与 STAT1 表达相关。CD3G 有 13 种靶向药物, IL2RG 有 4 种靶向药物, SYK 有 28 种靶向药物, lncRNA MUC2 有 3 种靶向药物, 未发现 CD8A、STAT1 和其他 ceRNA 网络基因的靶向药物。结论 CD8A、IL2RG、STAT1、CD3G 和 SYK 是肺缺血-再灌注损伤的核心基因, 对核心基因进行研究分析可能有助于肺缺血-再灌注损伤的诊断, 并提供新的研究思路和治疗靶点。

【关键词】 肺移植; 缺血-再灌注损伤; 核心基因; 竞争性内源性 RNA (ceRNA); 微小 RNA; 长链非编码 RNA; 环状 RNA; 信号通路

【中图分类号】 R617, R563 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1674-7445 (2024) 01-0010-12

Construction of competitive endogenous RNA network mediated by lung ischemia-reperfusion core genes Li Xiaofeng*, Tang Mingzheng, Liu Xixi, Song Ziqing, Zhang Guoxin, Yang Kaiyin, Zhang Lingyun. *First Clinical Medical College of Gansu University of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China

Corresponding author: Zhang Lingyun, Email: zhangly8848@126.com

【Abstract】 Objective To analyze the core genes of lung ischemia-reperfusion injury and construct a competitive endogenous RNA (ceRNA) network. **Methods** Original data of GSE145989 were downloaded from the Gene Expression Omnibus (GEO) database as the training set, and the GSE172222 and GSE9634 datasets were used as the validation sets,

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7445.2023166

基金项目: 甘肃省自然科学基金 (20JR5RA159); 甘肃中医药大学 2023 年度研究生创新创业基金项目 32 号

作者单位: 730000 兰州, 甘肃中医药大学第一临床医学院 (李晓凤、唐明政、刘禧禧、宋子晴); 甘肃中医药大学基础医学院 (张国欣); 甘肃省中医院麻醉科 (杨开银、张凌云)

作者简介: 李晓凤 (ORCID 0009-0009-6490-0976), 硕士研究生, 研究方向为围手术期器官保护, Email: lucia19971029@163.com

通信作者: 张凌云 (ORCID 0009-0007-8881-8374), 副主任医师, 硕士研究生导师, 研究方向为围手术期器官保护, Email: zhangly8848@126.com

and the differentially-expressed genes (DEG) were identified. Gene ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment analysis were performed. Protein-protein interaction (PPI) network was constructed, and the core genes were screened, and the diagnostic values of these core genes and the immune infiltration levels of immune cells were evaluated. The ceRNA network was constructed and validated. The targeted drugs based on ceRNA network were assessed. **Results** A total of 179 DEG were identified, including 61 down-regulated and 118 up-regulated genes. GO analysis showed that DEGs were associated with multiple biological processes, such as cell migration, differentiation and regulation, *etc.* They were correlated with cell components, such as vesicle membrane, serosa and membrane raft, *etc.* They were also associated with multiple molecular functions, such as chemokine receptor, G protein-coupled receptor, immune receptor activity and antigen binding, *etc.* KEGG pathway enrichment analysis revealed that DEG were involved in tumor necrosis factor (TNF), Wnt, interleukin (IL)-17 and nuclear factor (NF)- κ B signaling pathways, *etc.* PPI network suggested that CD8A, IL2RG, STAT1, CD3G and SYK were the core genes of lung ischemia-reperfusion injury. The ceRNA network prompted that miR-146a-3p, miR-28-5p and miR-593-3p were related to the expression level of CD3G. The miR-149-3p, miR-342-5p, miR-873-5p and miR-491-5p were correlated with the expression level of IL-2RG. The miR-194-3p, miR-512-3p, miR-377-3p and miR-590-3p were associated with the expression level of SYK. The miR-590-3p and miR-875-3p were related to the expression level of CD8A. The miR-143-5p, miR-1231, miR-590-3p and miR-875-3p were associated with the expression level of STAT1. There were 13 targeted drugs for CD3G, 4 targeted drugs for IL-2RG, 28 targeted drugs for SYK and 3 targeted drugs for lncRNA MUC2. No targeted drugs were identified for CD8A, STAT1 and other ceRNA network genes. **Conclusions** CD8A, IL2RG, STAT1, CD3G and SYK are the core genes of lung ischemia-reperfusion injury. The research and analysis of these core genes probably contribute to the diagnosis of lung ischemia-reperfusion injury and providing novel research ideas and therapeutic targets.

【Key words】 Lung transplantation; Ischemia-reperfusion injury; Core gene; Competitive endogenous RNA (ceRNA); Micro RNA; Long non-coding RNA; Circular RNA; Signal pathway

自 1983 年以来, 肺移植已成为治疗各种终末期肺病的有效方法, 全球每年约有 4 000 例双肺或单肺移植^[1-2]。肺移植目前存在的主要问题是供者短缺^[3]。据报道, 约 24% 等待供肺的患者可能死亡^[4]。肺缺血-再灌注损伤 (lung ischemia-reperfusion injury, LIRI) 是导致肺移植失败和病死率高的主要原因^[5], 包括局部缺血性损伤和再灌注损伤^[6]。现有改善 LIRI 的治疗方案主要包括支持和替代治疗^[7-9]。对寻找生物标志物、干细胞疗法、药物治疗和基因治疗等干预措施还在探索中^[10], 很少有用于临床的预防和治理策略。因此, 仍需要探索新策略预防 LIRI, 改善肺移植后的短期和长期预后。

竞争性内源性 RNA (competitive endogenous RNA, ceRNA) 是含有微小 RNA (micro RNA, miRNA, miR) 识别元件的 RNA^[11], 可以通过与 miRNA 竞争性结合来调节含有相应识别元件的基因或蛋白质表达^[12]。其中环状 RNA (circRNA) 可通过反剪形成闭环, 保护其免受核糖核酸酶 R 的侵害, 并稳定表达^[13]。根据序列起源, circRNA 可分为 3 类: 外显子 circRNA, 内含子 circRNA 和外显子-内

含子 circRNA^[14]。长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA) 可以“海绵”互补 miRNA, 促进其靶分子的去抑制, 在 lncRNA-miRNA-mRNA ceRNA 网络中发挥作用^[12,15]。ceRNA 网络可能会影响疾病并解释疾病过程, 为新疗法提供思路^[12]。因此, 有必要在 LIRI 中发现新的功能性以 lncRNA 介导的 lncRNA-miRNA-mRNA ceRNA 网络, 以确定更多与 LIRI 诊断和预后相关的 ceRNA 网络。本研究整合了多种生物信息学分析工具, 以探索 LIRI 的核心基因、通路、靶向药物和 ceRNA 构建, 为其治疗提供新的策略和思路。

1 材料与方法

1.1 微阵列数据信息

基因表达综合 (Gene Expression Omnibus, GEO) 数据库是一个提供高通量基因表达数据的公共基因组学数据存储库^[16]。从 GEO 数据库下载原始数据 GSE145989 作为训练集, 其中包括 67 个人肺冷缺血样本和 67 个人肺再灌注样本。将 GSE172222 和 GSE9634 数据集当作验证集, GSE172222 包括 15 个

人正常样本和 16 个人 LIRI 样本, GSE9634 包括 6 个大鼠正常样本和 12 个大鼠 LIRI 样本。

1.2 DEG 的识别

使用 LIMMA 包 (<http://www.bioconductor.org/packages/release/bioc/html/limma.html>) 分析微阵列数据, 比较肺缺血与肺再灌注组织的表达值, 以识别差异表达基因 (differentially expressed gene, DEG)。在 t 检验后, 将 P 值进行调整, 并设定 $P < 0.05$ 且对数折变率 ($\log FC$) > 1 作为筛选标准。使用热图包 (<https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/heattmaps.html>) 绘制 DEG 热图。

1.3 基因本体、通路富集分析

DAVID 基因功能分类工具可将大基因分类为生物模块^[17]。基因本体 (gene ontology, GO) 是主要用于注释基因并分析其生物过程的生物信息学工具, 而京都基因与基因组百科全书 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) 则是一种数据库资源, 可从高通量实验技术生成的大规模分子数据集中了解高级功能和生物系统。本研究使用 clusterProfiler 软件包 (<https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/clusterProfiler.html>) 对 DEG 进行 GO 和 KEGG 通路分析。GO 分析包括分子功能 (molecular function, MF)、细胞成分 (cellular component, CC) 和生物学过程 (biological process, BP), 而通路分析则通过 KEGG 对 DEG 进行分类。本研究设置 $P < 0.05$ 和基因计数 > 5 为临界点。

1.4 蛋白质-蛋白质相互作用网络集成

STRING 数据库是一个在线资源, 其主要功能是构建功能性蛋白质关联网络^[18]。本研究定义交互作用评分 > 0.9 (中等可信度) 为显著性。使用 Cytoscape 软件构建了蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络, 并进一步分析 DEG 之间的相互作用关系^[19]。

1.5 筛选并验证核心基因

通过 MCODE 插件选择候选核心基因, 采用 RStudio 中的受试者工作特征 (receiver operating characteristic, ROC) 软件包绘制 ROC 曲线, 对核心基因进行分析^[20]。曲线下面积 (area under the curve, AUC) > 0.6 和 $P < 0.05$ 作为核心基因的判定标准。

1.6 通过 CIBERSORT 分析进行免疫浸润

采用 CIBERSORT 算法分析之前获得的基因表达数据, 以获取 22 种免疫细胞的比例, 其中包括幼稚

B 细胞、记忆 B 细胞、浆细胞、CD8⁺T 细胞、幼稚 CD4⁺T 细胞、静息记忆 CD4⁺T 细胞、活化记忆 CD4⁺T 细胞、滤泡辅助性 T 细胞、调节性 T 细胞 (regulatory T cell, Treg)、 $\gamma\delta$ T 细胞、静息自然杀伤 (natural killer, NK) 细胞、活化 NK 细胞、单核细胞、M0 型巨噬细胞、M1 型巨噬细胞、M2 型巨噬细胞、静息树突状细胞、活化树突状细胞、静息肥大细胞、活化肥大细胞、嗜酸性粒细胞和中性粒细胞。使用 $P < 0.05$ 筛选样品, 并计算各种免疫细胞在样品中的百分比。利用 R 版本 4.2.1 中的 vioplot 软件包, 分析免疫细胞的免疫浸润水平。

1.7 ceRNA 网络的构建和验证

通过 starBase 检测和鉴定 5 个核心基因预测的 mRNA-miRNA 相互作用。从美国国家生物技术信息中心获取 mRNA 序列, 使用 miRbase 下载人类 miRNA 序列, 使用 miRanda 数据库预测 mRNA-miRNA 的核酸结合。使用 TargetScan 数据库预测 miRNA 靶基因。StarBase 用于筛选 mRNA-lncRNA 相互作用, 构建 mRNA-miRNA-lncRNA 的 ceRNA 网络。验证 ceRNA 网络成员在 GSE145989、GSE172222 和 GSE9634 中的表达。

1.8 基于 ceRNA 网络的靶向药物

使用 DGIdb 数据库分析可能靶向标记基因的药物, 并基于 ceRNA 网络成员, 构建并分析它们之间的相互作用关系。

1.9 统计学方法

对所有的基因数据进行了对数转换以进行归一化处理, 并使用 R 软件 (版本 4.2.1) 对数据进行可视化。 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 DEG 的识别及 GO、KEGG 和免疫细胞浸润分析

人 LIRI 上调的 DEG 基因 101 个, 下调的 DEG 基因 197 个。按调整后的 P 值排序的前 100 个基因在各样本中的表达量通过热图显示 (图 1A)。

GO 分析结果显示, DEG 的 BP 主要与细胞迁移、分化和调节有关; CC 主要与内吞囊泡膜、浆膜和膜筏有关; MF 主要与趋化因子受体、G 蛋白偶联受体、免疫受体活性和抗原结合有关 (图 1B、C)。

KEGG 分析结果显示, DEG 参与趋化因子、甲状腺激素、松弛素、聚腺苷二磷酸核糖聚合酶 (poly adenosine-diphosphate-ribose polymerase, PPAR)、

肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF)、Wnt、白细胞介素 (interleukin, IL)-17、T 细胞受体、B 细胞受体、核因子 (nuclear factor, NF)- κ B 等信号通路, 及癌症中的程序性细胞死亡蛋白配体 1 (programmed cell death protein-ligand 1, PD-L1) 表达和程序性细胞死亡蛋白 1 (programmed cell death protein 1, PD-1) 检查点通路 (图 1D)。

免疫细胞浸润分析表明 DEG 与浆细胞、幼稚 T 细胞、静息记忆 CD4⁺ T 细胞、活化记忆 CD4⁺ T 细胞、 $\gamma\delta$ T 细胞、静息 NK 细胞、活化 NK 细胞、M1 型巨噬细胞、M2 型巨噬细胞、静息树突状细胞、活化树突状细胞、静息肥大细胞、活化肥大细胞和中性粒细胞有关 (图 1E)。

2.2 核心基因的筛选

PPI 网络共获得了 179 个节点, 包括 118 个上调基因和 61 个下调基因组成的 DEG (图 2A), 差异基因打分结果见图 2B。CD8A、IL2RG、STAT1、CD3G 和 SYK 为能够区分肺缺血和再灌注的候选核心基因, 在高表达组中, 这 5 个基因呈上调状态 (图 2C)。5 个基因之间呈正相关关系, 具有功能相似性 (图 2D)。

2.3 核心基因的诊断作用

CD8A、IL2RG、STAT1、CD3G 和 SYK 5 个核心基因在训练集 LIRI 组高表达 (图 3A), 在验证组数据集里也高表达 (图 3B、C)。ROC 曲线结果显示这 5 个核心基因诊断 LIRI 具有相对较强的效力, 但是 CD8A 在鼠源性的 LIRI 诊断效力比人源性的 LIRI 更强 (图 3D、E)。

2.4 核心基因和免疫细胞相关性分析

SYK 与静息树突状细胞, M0 型巨噬细胞和滤泡辅助性 T 细胞呈正相关, 与活化树突状细胞和浆细胞呈负相关; STAT1 与 M1 型巨噬细胞呈正相关; IL2GR 与中性粒细胞和活化记忆 CD4⁺T 细胞呈正相关, 与活化树突状细胞、M2 型巨噬细胞、静息肥大细胞和静息记忆 CD4⁺T 细胞呈负相关; CD8A 与活化记忆 CD4⁺T 细胞, CD8⁺T 细胞和滤泡辅助性 T 细胞呈正相关, 与幼稚 CD4⁺T 细胞呈负相关; CD3G 与 M1 型巨噬细胞和 CD8⁺T 细胞呈正相关, 与记忆 B 细胞、活化树突状细胞和幼稚 CD4⁺T 细胞呈负相关 (图 4)。

2.5 ceRNA 网络构建与表达验证

ceRNA 网络包括 205 个节点 (5 个核心基因,

98 个 miRNA, 102 个 lncRNA), 217 个边缘 (图 5A)。共 5 个 lncRNA 可以竞争性地结合 miR-146a-3p, 10 个 lncRNA 可以竞争性地结合 miR-28-5p 和 5 个 lncRNA 可以竞争性地结合 miR-593-3p 共同控制 CD3G 的表达; 19 个 lncRNA 可以竞争性地结合 miR-149-3p, 8 个 lncRNA 可以竞争性地结合 miR-342-5p, 6 个 lncRNA 可以竞争性地结合 miR-873-5p 和 5 个 lncRNA 可以竞争性地结合 miR-491-5p 共同调节 IL2RG; 3 个 lncRNA 可以竞争性地结合 miR-194-3p 和 miR-512-3p, 5 个 lncRNA 可以竞争性地结合 miR-377-3p 和 8 个 lncRNA 可以竞争性地结合 miR-590-3p 共同调节 SYK; 1 个 lncRNA 可以竞争性地结合 miR-590-3p 和 4 个 lncRNA 可以竞争性地结合 miR-875-3p 共同调节 CD8A; 6 个 lncRNA 可以竞争性地结合 miR-143-5p, 4 个 lncRNA 可以竞争性地结合 miR-1231, 8 个 lncRNA 可以竞争性地结合 miR-590-3p 和 4 个 lncRNA 可以竞争性地结合 miR-875-3p 共同调节 STAT1。

基于 ceRNA 成员在数据集 GSE145989、GSE172222 和 GSE9634 的表达进行验证, 结果发现 MUC2、MIR2909、MIR143HG、LINC01165、MIR1205、LINC01070、LINC00689 和 TMEM191A 均为高表达 (图 5B)。

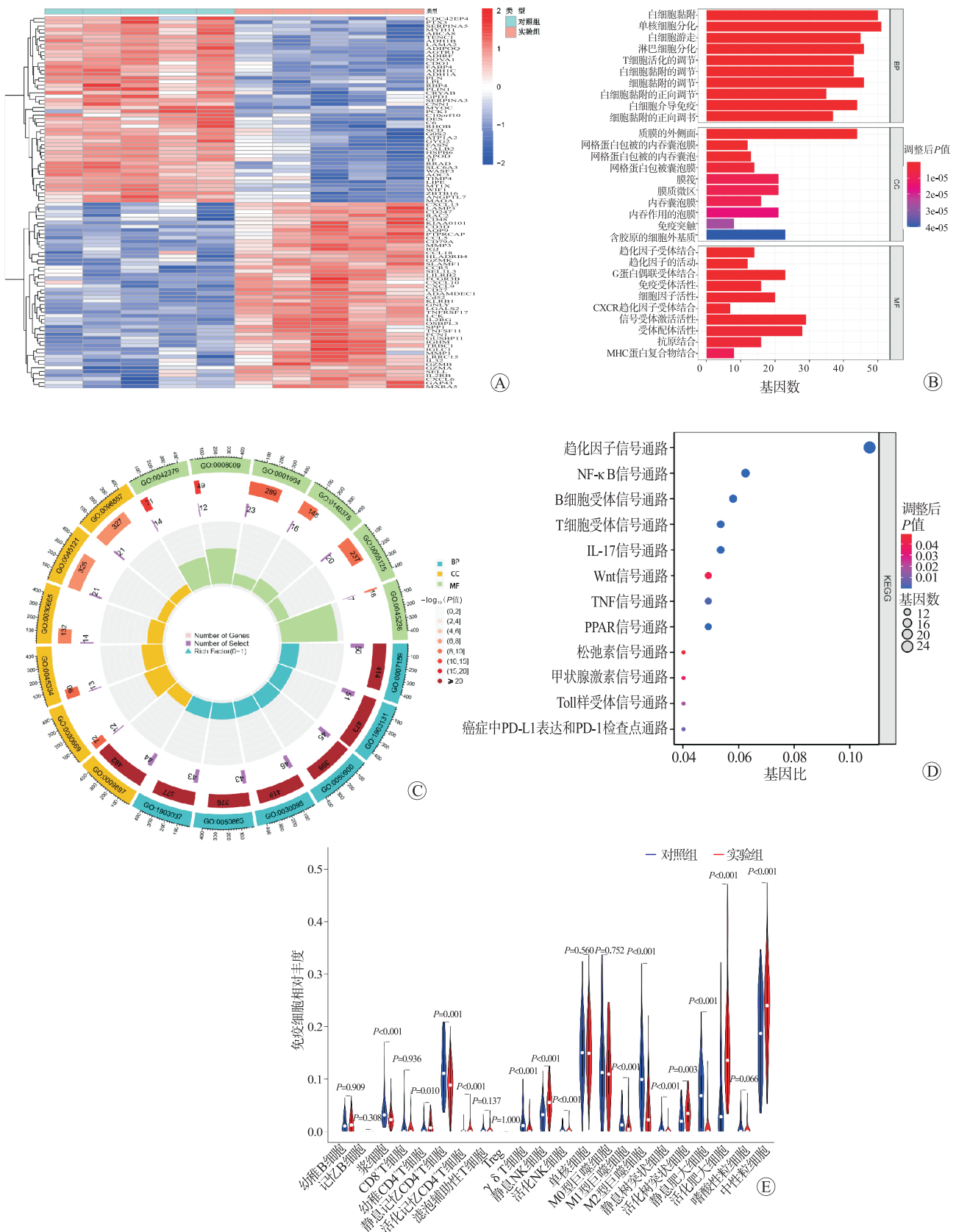
2.6 确定靶向药物

IL2RG 有 4 种靶向药物, CD3G 有 13 种靶向药物, SYK 有 28 种靶向药物, lncRNA MUC2 有 3 种靶向药物, 未发现预测核心基因 CD8A、STAT1 和其他 ceRNA 网络基因的靶向药物。

赛度替尼、PRT-2 607、福坦替尼、R-343、ENTOSPLETINIB、R-112、R-406、HMPL-523、TAK-659、R-348 和 R-333 是 SYK 的抑制剂 (图 6A); 爱欧山和 FORALUMAB 是 CD3G 的抑制剂 (图 6B); 达利珠单抗和巴利昔单抗是 IL2RG 的抑制剂, 而阿地白介素是 IL2RG 的受体激动剂 (图 6C); lncRNA MUC2 的靶向药物有 3 种 (图 6D)。

3 讨论

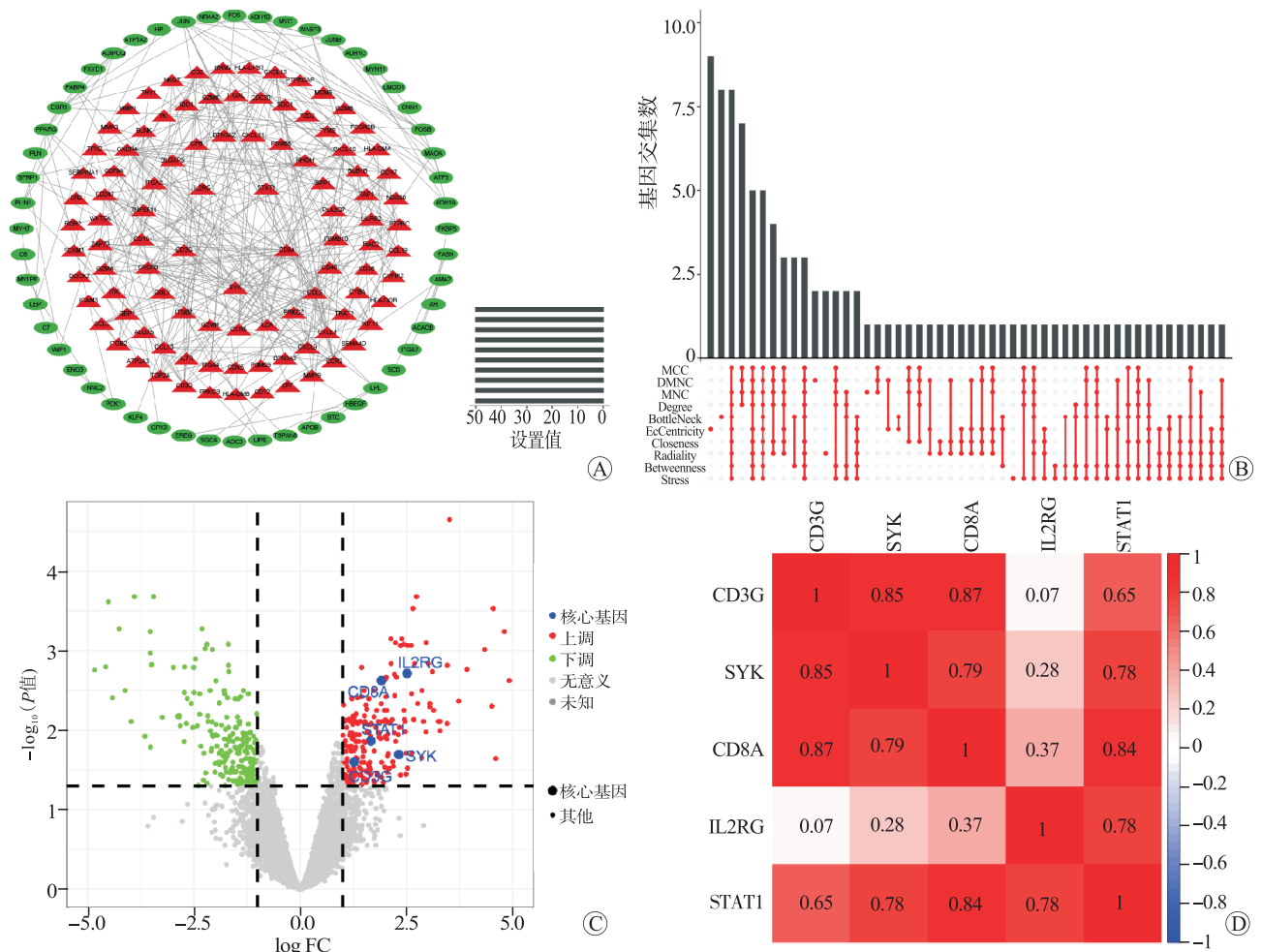
肺移植是晚期肺病患者的有效治疗方法, 但供肺的利用率较低^[21]。LIRI 是肺移植术后早期原发性移植物功能障碍的最常见危险因素之一^[22], 并且会增加移植物功能障碍和排斥反应等风险^[23]。尽管肺移植完



注：A 图为前 100 个 DEG；B 图和 C 图为 GO 分析；D 图为 KEGG 分析；E 图为免疫细胞浸润分析。

图 1 DEG 的 GO、KEGG 和免疫细胞浸润分析

Figure 1 GO, KEGG and immune cell infiltration analysis of DEG



注：A 图为 DEGs 的 PPI 网络，绿色为下调基因，红色为上调基因；B 图为基因打分，红色为得分；C 图为核心基因；D 图为核心基因的相关性分析。

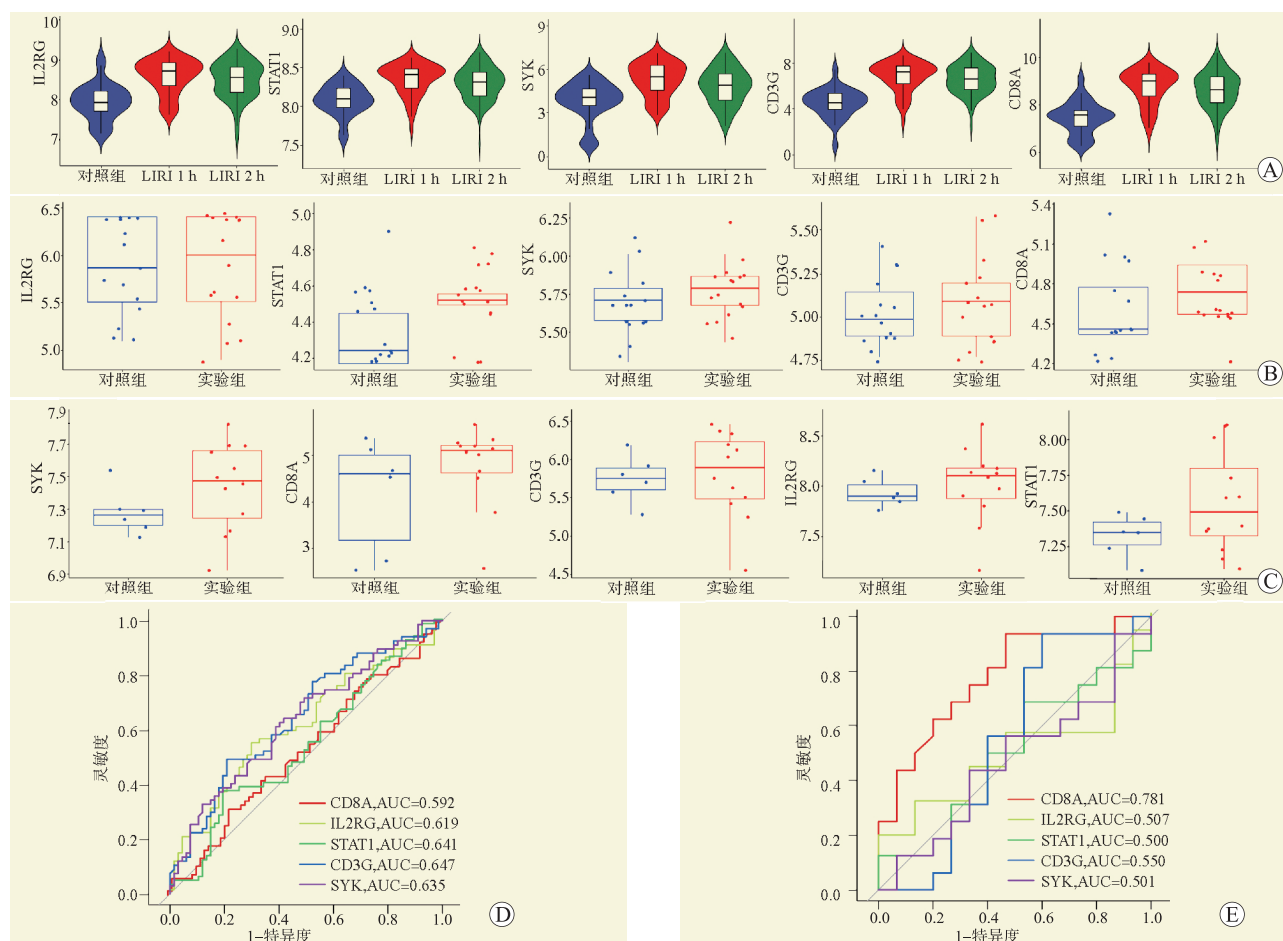
图 2 核心基因的筛选

Figure 2 Screening of the core genes

全缺氧的时间只持续几个小时，却产生无法避免的影响^[1]。严重的 LIRI 可导致原发性移植物功能障碍，这是肺移植术后短期和长期病死率增加的主要原因^[24]。目前尚无特定预防 LIRI 的治疗方法，本研究结合了微阵列基因表达谱和生物信息学方法，旨在探索人类 LIRI 过程中潜在新核心基因和分子机制。

首先，从 GSE145989 数据集筛选 DEG，并进行 GEO、KEGG 和 PPI 网络分析，筛选出 61 个下调和 118 个上调的 DEG。通过 Cytoscape 鉴定出 5 个核心基因并进行 ROC 曲线、免疫细胞相关性、ceRNA 网络构建等一系列分析。GO 分析显示 DEG 与内皮细胞、G 蛋白偶联受体和免疫相关细胞等有关。有研究发现内皮祖细胞通过内皮型一氧化氮合酶途径减轻肺移植术后的缺血损伤^[25]，LIRI 后肺组织中 S1P G 蛋

白偶联受体 1 上调表明 S1P/S1PR1 轴参与 LIRI 的病理生理过程^[26]，CXCR2 上调内皮细胞对肾缺血-再灌注损伤 (ischemia-reperfusion injury, IRI) 具有保护作用^[27]，而单核细胞、淋巴细胞、白细胞和 T 细胞浸润发生于 LIRI 中^[28]。KEGG 分析表明 DEG 参与包括 NF-κB、PPAR、TNF、Wnt、B 细胞受体和 Toll 样受体等信号通路，各通路在 LIRI 都扮演着重要的角色。如甲烷和西洛他唑可分别通过磷脂酰肌醇-3-激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K) -蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt) -NF-κB 和 PPAR-A 信号通路调节缺氧-复氧引起的氧化应激、炎症因子释放和细胞凋亡，促进 LIRI 修复^[29-30]。此外，miR-145 可以 NF-κB 依赖的方式抑制 Beclin1 和 SIRT1，从而减弱 LIRI 小鼠模型自噬过程^[31]。B 细胞



注：A 图为 GSE145989 数据集核心基因的表达；B 图为 GSE172222 数据集核心基因的表达；C 图为 GSE9634 数据集核心基因的表达；D 图为核心基因在 GSE172222 数据集集中的诊断效力；E 图为核心基因在 GSE9634 数据集集中的诊断效力。

图 3 核心基因的验证

Figure 3 Validation of core genes

依赖性途径则在小鼠 IRI 后慢性肺同种异体移植排斥反应中发挥作用^[32]。TNF- α 激活 JNK/FoxO3a 轴，延迟中性粒细胞凋亡并导致 LIRI 发展^[33]。另外，miR-122 通过 Toll 样受体信号通路加速 LIRI^[34]。

本研究发现，与 LIRI 相关的 5 个核心基因分别为 CD8A、IL2RG、STAT1、CD3G 和 SYK，ROC 分析验证其具有较高的诊断价值。值得注意的是，已有研究证实 IL2RG、SYK 和 CD8A 与 IRI 相关。如 IL2RG 小鼠通过减少中性粒细胞损耗来降低肝脏 IRI^[35]。而抑制 SYK 线粒体裂解途径与 IRI 微血管保护有关^[36]。另一项研究显示，CD8A 在肾 IRI 过程中表达最高^[37]。此外，本研究还发现巨噬细胞与 SYK、STAT1 和 CD3G 呈正相关，T 细胞及其相关细胞与 SYK、IL2GR、CD8A 和 CD3G 呈正相关，SYK 与树突状细胞和 IL2GR 与中性粒细胞呈正相关。有研究发现，巨噬细胞和树突状细胞中的

Mincle-Syk 通路与微生物群调节能够影响 IL-17 和 IL-22 表达^[38-39]。但在 B 细胞和 T 细胞中，SYK 的表达在整个进化过程中是严格分离的^[40]。此外，STAT1 促进巨噬细胞内 Nampt 表达和功能，并且增强巨噬细胞的抗病毒先天免疫^[41-42]。CD8A 通常主要在效应性 T 细胞和细胞毒性 T 淋巴细胞上表达，但有时也在 Treg、NK 细胞以及树突状细胞上表达^[43-45]。

ceRNA 网络分析揭示了核心基因与众多的 miRNA 和 lncRNA 复杂关系，包括 miR-146a-3p、miR-149-3p、miR-28-5p、miR-342-5p、miR-377-3p、miR-590-3p、MUC2 和 miR143HG 等 miRNA 和 lncRNA。基于 ceRNA 网络分析结果发现 miRNA 已有研究。miR-146a-3p 抑制 NF- κ B 通路保护心脏和小肠免受 IRI^[46-47]，并在急性肺损伤中减轻炎症反应^[48]。miR-149-3p 与心肌 IRI 有关^[49]，而 miR-28-5p 与脊髓 IRI 也有关^[50]。神奇的是，肺源性外泌体中的 miR-

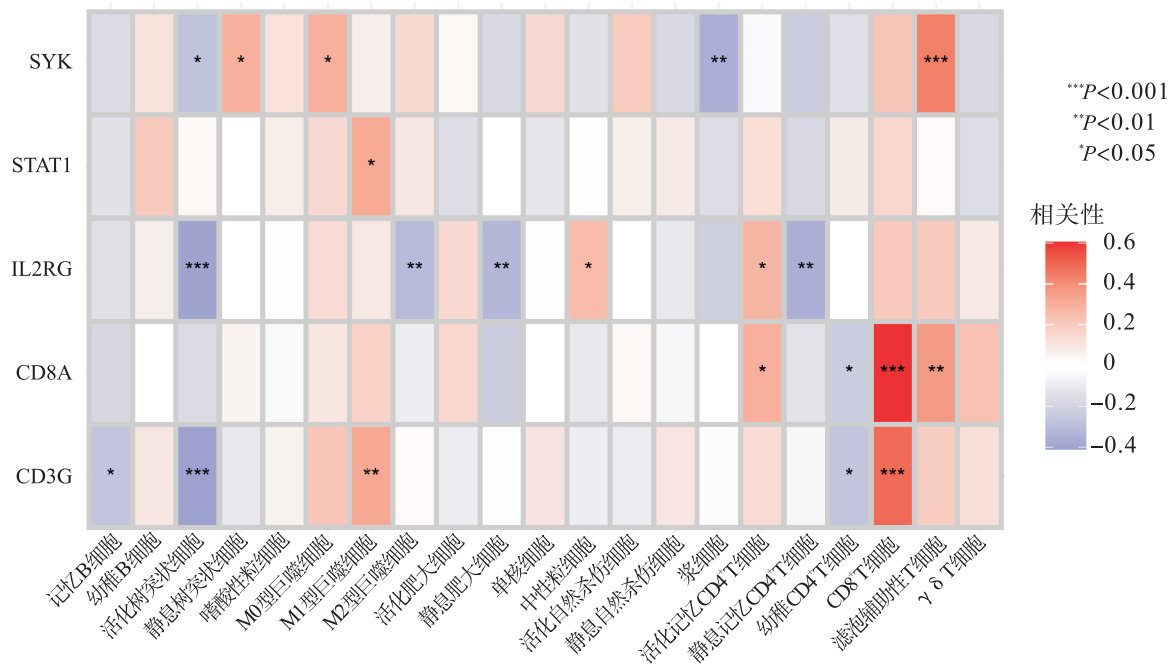


图 4 核心基因和免疫细胞相关性分析

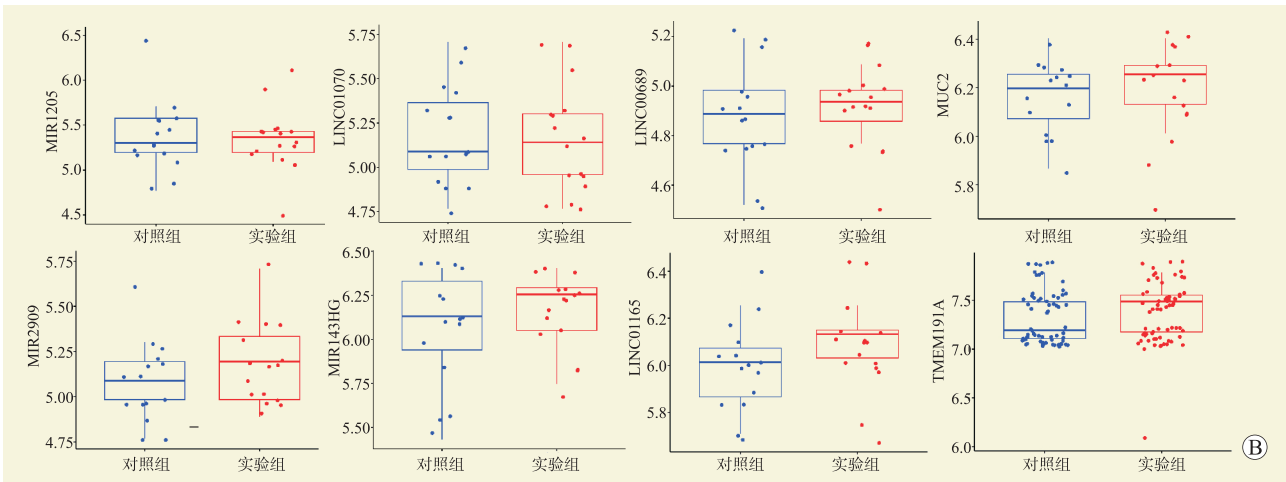
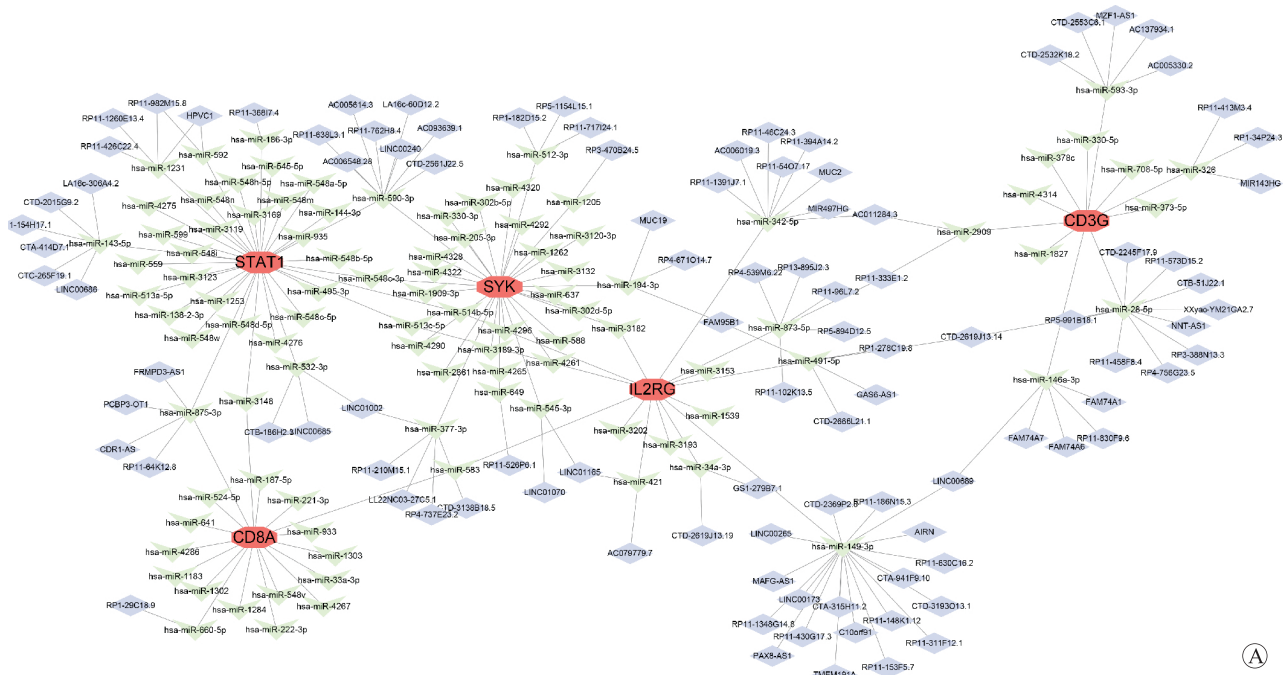
Figure 4 Correlation analysis of core genes and immune cell

28-5p 在急性肺损伤中也调节间充质干细胞的功能^[51]。此外, lncRNA PEG11as 通过 miR-342-5p/PFN1 通路加重脑 IRI^[52], 而 miR-342-5p 调控 GPRC5A 通路预防心肌 IRI^[53]。另外, miR-342-5p 和 miR-590-3p 分别抑制 TLR9 和 TRAF6 以减轻败血症小鼠的急性肾损伤^[54-55], 而 miR-377-3p 靶向 RPTOR 诱导自噬, 从而改善脂多糖诱导的急性肺损伤^[56]。下调 mmu_circ_0000943 则通过调节 mmu-miR-377-3p/Egr2 轴, 改善肾 IRI 引发的炎症和氧化应激^[57]。此外, miR-590-3p 通过调节 HMGB1/TLR4/MyD88/NF-κB 轴来防止氧-葡萄糖剥夺和复氧细胞模型中的 IRI^[58]。最后, MUC2 黏蛋白和非黏蛋白微生物群在肠损伤中具有特殊的宿主防御作用^[59], 而 miR143HG 通过 miR-504 海绵效应和 miR-21 甲基化来抑制细胞的增殖^[60]。

综上所述, 本研究通过挖掘微阵列基因表达谱和生物信息学相结合, 发现了 5 个核心基因, 为研究 LIRI 的分子机制和治疗靶点提供了新的思路和切入点。本研究运用基因表达谱和生物信息学相结合的方法发现人类 LIRI 过程中的潜在新核心基因和 ceRNA, 但由于基因芯片数据的可用性有限及满足研究条件的样本数较少, 本研究纳入的样本量有限, 因此仍需要在更多的实验和临床实践中进一步验证研究结果。

参考文献:

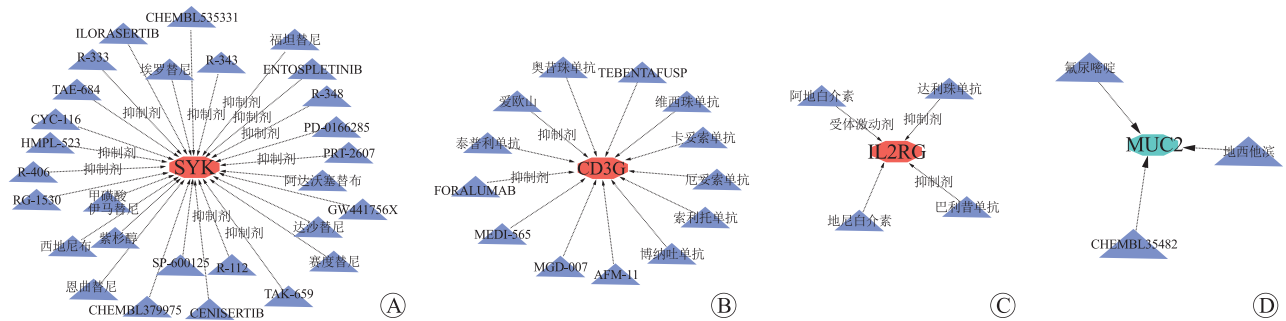
- [1] AFONSO JÚNIOR JE, WEREBE EDE C, CARRARO RM, et al. Lung transplantation[J]. Einstein (Sao Paulo), 2015, 13(2): 297-304. DOI: 10.1590/S1679-45082015RW3156.
- [2] GLORION M, POLARD V, FAVEREAU F, et al. Prevention of ischemia-reperfusion lung injury during static cold preservation by supplementation of standard preservation solution with HEMO₂life® in pig lung transplantation model[J]. Artif Cells Nanomed Biotechnol, 2018, 46(8): 1773-1780. DOI: 10.1080/21691401.2017.1392315.
- [3] CHAN JCY, CHABAN R, CHANG SH, et al. Future of lung transplantation: xenotransplantation and bioengineering lungs[J]. Clin Chest Med, 2023, 44(1): 201-214. DOI: 10.1016/j.ccm.2022.11.003.
- [4] JIANG T, YANG W, ZHANG H, et al. Hydrogen sulfide ameliorates lung ischemia-reperfusion injury through SIRT1 signaling pathway in type 2 diabetic rats[J]. Front Physiol, 2020, 11: 596. DOI: 10.3389/fphys.2020.00596.
- [5] CAPUZZIMATI M, HOUGH O, LIU M. Cell death and ischemia-reperfusion injury in lung transplantation[J]. J Heart Lung Transplant, 2022, 41(8): 1003-1013. DOI: 10.1016/j.healun.2022.05.013.
- [6] ALMEIDA FM, BATTOCHIO AS, NAPOLI JP, et al. Creatine supply attenuates ischemia-reperfusion injury in lung transplantation in rats[J]. Nutrients, 2020, 12(9):



注：A 图为基于核心基因 mRNA-miRNA-lncRNA 的 ceRNA 网络；B 图为 ceRNA 网络成员表达情况。

图 5 ceRNA 网络构建与表达验证

Figure 5 ceRNA network construction and expression validation



注：A 图为可能靶向 SYK 的药物；B 图为可能靶向 CD3G 的药物；C 图为可能靶向 IL2RG 的药物；D 图为可能靶向 lncRNA MUC2 的药物。

图 6 标记基因靶向药物的预测

Figure 6 Prediction of marker gene-targeted drugs

2765. DOI: 10.3390/nu12092765.
- [7] TEIJEIRO-PARADIS R, CYPEL M, DEL SORBO L. Protective mechanical ventilation in organ donors: a lifesaving maneuver[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2020, 202(2): 167-169. DOI: 10.1164/rccm.202005-1559ED.
- [8] STARKE H, VON DOSSOW V, KARSTEN J. Intraoperative circulatory support in lung transplantation: current trend and its evidence[J]. *Life (Basel)*, 2022, 12(7): 1005. DOI: 10.3390/life12071005.
- [9] VLASTOS D, ZEINAH M, NINKOVIC-HALL G, et al. The effects of ischaemic conditioning on lung ischaemia-reperfusion injury[J]. *Respir Res*, 2022, 23(1): 351. DOI: 10.1186/s12931-022-02288-z.
- [10] AVTAAR SINGH SS, DAS DE S, AL-ADHAMI A, et al. Primary graft dysfunction following lung transplantation: from pathogenesis to future frontiers[J]. *World J Transplant*, 2023, 13(3): 58-85. DOI: 10.5500/wjt.v13.i3.58.
- [11] ZOGG H, SINGH R, RO S. Current advances in RNA therapeutics for human diseases[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(5): 2736. DOI: 10.3390/ijms23052736.
- [12] ALA U. Competing endogenous RNAs, non-coding RNAs and diseases: an intertwined story[J]. *Cells*, 2020, 9(7): 1574. DOI: 10.3390/cells9071574.
- [13] LIU X, ZHANG Y, ZHOU S, et al. Circular RNA: an emerging frontier in RNA therapeutic targets, RNA therapeutics, and mRNA vaccines[J]. *J Control Release*, 2022, 348: 84-94. DOI: 10.1016/j.jconrel.2022.05.043.
- [14] CHEN L, WANG C, SUN H, et al. The bioinformatics toolbox for circRNA discovery and analysis[J]. *Brief Bioinform*, 2021, 22(2): 1706-1728. DOI: 10.1093/bib/bbaa001.
- [15] ZHAO M, FENG J, TANG L. Competing endogenous RNAs in lung cancer[J]. *Cancer Biol Med*, 2021, 18(1): 1-20. DOI: 10.20892/j.issn.2095-3941.2020.0203.
- [16] JANG J, HWANG I, JUNG I. TimesVector-Web: a web service for analysing time course transcriptome data with multiple conditions[J]. *Genes (Basel)*, 2021, 13(1): 73. DOI: 10.3390/genes13010073.
- [17] HUANG DW, SHERMAN BT, TAN Q, et al. The DAVID gene functional classification tool: a novel biological module-centric algorithm to functionally analyze large gene lists[J]. *Genome Biol*, 2007, 8(9): R183. DOI: 10.1186/gb-2007-8-9-r183.
- [18] SZKLARCZYK D, GABLE AL, NASTOU KC, et al. The STRING database in 2021: customizable protein-protein networks, and functional characterization of user-uploaded gene/measurement sets[J]. *Nucleic Acids Res*, 2021, 49(D1): D605-D612. DOI: 10.1093/nar/gkaa1074.
- [19] LIU X, HONG Z, LIU J, et al. Computational methods for identifying the critical nodes in biological networks[J]. *Brief Bioinform*, 2020, 21(2): 486-497. DOI: 10.1093/bib/bbz011.
- [20] ROBIN X, TURCK N, HAINARD A, et al. pROC: an open-source package for R and S+ to analyze and compare ROC curves[J]. *BMC Bioinformatics*, 2011, 12: 77. DOI: 10.1186/1471-2105-12-77.
- [21] 焦国慧, 王梓涛, 陈静瑜. 肺移植全球发展概况与展望[J]. *器官移植*, 2022, 13(4): 417-424. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7445.2022.04.002.
- JIAO GH, WANG ZT, CHEN JY. Current status and prospect of global development of lung transplantation[J]. *Organ Transplant*, 2022, 13(4): 417-424. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7445.2022.04.002.
- [22] CHEN-YOSHIKAWA TF. Ischemia-reperfusion injury in lung transplantation[J]. *Cells*, 2021, 10(6): 1333. DOI: 10.3390/cells10061333.
- [23] 王净, 胡春兰, 于慧智, 等. 肺移植期间肺缺血再灌注损伤及药物治疗的研究进展[J]. *东南大学学报(医学版)*, 2022, 41(4): 578-582. DOI: 10.3969/j.issn.1671-6264.2022.04.021.
- WANG J, HU CL, YU HZ, et al. Research progress on pulmonary ischemia-reperfusion injury and drug therapy during lung transplantation[J]. *J Southeast Univ (Med Sci Edit)*, 2022, 41(4): 578-582. DOI: 10.3969/j.issn.1671-6264.2022.04.021.
- [24] AKBARPOUR M, LECUONA E, CHIU SF, et al. Residual endotoxin induces primary graft dysfunction through ischemia/reperfusion-primed alveolar macrophages[J]. *J Clin Invest*, 2020, 130(8): 4456-4469. DOI: 10.1172/JCI135838.
- [25] GAO W, JIANG T, LIU YH, et al. Endothelial progenitor cells attenuate the lung ischemia/reperfusion injury following lung transplantation via the endothelial nitric oxide synthase pathway[J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2019, 157(2): 803-814. DOI: 10.1016/j.jtcvs.2018.08.092.
- [26] 祝卿, 周文琴, 万里, 等. 1-磷酸鞘氨醇及受体 1 在小鼠肺缺血再灌注损伤中的表达变化和意义[J]. *四川大学学报(医学版)*, 2018, 49(6): 891-894.
- ZHU Q, ZHOU WQ, WAN L, et al. The expression of sphingosine-1-phosphate and sphingosine-1-phosphate receptor 1 in mouse model of pulmonary ischemia-reperfusion injury[J]. *J Sichuan Univ (Med Sci)*, 2018, 49(6): 891-894.
- [27] XING D, HAGE FG, FENG W, et al. Endothelial cells overexpressing CXCR1/2 are renoprotective in rats with acute kidney injury[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2023, 324(4): F374-F386. DOI: 10.1152/ajprenal.00238.2022.
- [28] HSIAO HM, FERNANDEZ R, TANAKA S, et al. Spleen-derived classical monocytes mediate lung ischemia-reperfusion injury through IL-1 β [J]. *J Clin*

- Invest, 2018, 128(7): 2833-2847. DOI: 10.1172/JCI98436.
- [29] WANG F, WANG F, LI F, et al. Methane attenuates lung ischemia-reperfusion injury via regulating PI3K-Akt-NF κ B signaling pathway[J]. *J Recept Signal Transduct Res*, 2020, 40(3): 209-217. DOI: 10.1080/10799893.2020.1727925.
- [30] GENDY AM, AMIN MM, AL-MOKADDEM AK, et al. Cilostazol mitigates mesenteric ischemia/reperfusion-induced lung lesion: contribution of PPAR- γ , NF- κ B, and STAT3 crosstalk[J]. *Life Sci*, 2021, 266: 118882. DOI: 10.1016/j.lfs.2020.118882.
- [31] DAI SH, CHEN LJ, QI WH, et al. microRNA-145 inhibition upregulates SIRT1 and attenuates autophagy in a mouse model of lung ischemia/reperfusion injury via NF- κ B-dependent Beclin 1[J]. *Transplantation*, 2021, 105(3): 529-539. DOI: 10.1097/TP.0000000000003435.
- [32] WATANABE T, MARTINU T, CHRUSCINSKI A, et al. A B cell-dependent pathway drives chronic lung allograft rejection after ischemia-reperfusion injury in mice[J]. *Am J Transplant*, 2019, 19(12): 3377-3389. DOI: 10.1111/ajt.15550.
- [33] CHEN D, CHEN C, XIAO X, et al. TNF- α induces neutrophil apoptosis delay and promotes intestinal ischemia-reperfusion-induced lung injury through activating JNK/FoxO3a pathway[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021: 8302831. DOI: 10.1155/2021/8302831.
- [34] LU Y, WANG YL, LIU Q, et al. MiRNA-122 promotes ischemia-reperfusion injury after lung transplantation via the toll-like receptor signaling pathway[J]. *Curr Med Sci*, 2021, 41(6): 1231-1238. DOI: 10.1007/s11596-021-2487-y.
- [35] JIN H, ZHANG C, SUN C, et al. OX40 expression in neutrophils promotes hepatic ischemia/reperfusion injury[J]. *JCI Insight*, 2019, 4(21): e129736. DOI: 10.1172/jci.insight.129736.
- [36] ZHOU H, SHI C, HU S, et al. B11 is associated with microvascular protection in cardiac ischemia reperfusion injury via repressing Syk-Nox2-Drp1-mitochondrial fission pathways[J]. *Angiogenesis*, 2018, 21(3): 599-615. DOI: 10.1007/s10456-018-9611-z.
- [37] YANG CC, SUNG PH, CHEN CH, et al. Additional benefit of induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cell therapy on sepsis syndrome-associated acute kidney injury in rat treated with antibiotic[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2021, 12(1): 526. DOI: 10.1186/s13287-021-02582-5.
- [38] MARTÍNEZ-LÓPEZ M, IBORRA S, CONDE-GARROSA R, et al. Microbiota sensing by Mincle-Syk axis in dendritic cells regulates interleukin-17 and -22 production and promotes intestinal barrier integrity[J]. *Immunity*, 2019, 50(2): 446-461. DOI: 10.1016/j.immuni.2018.12.020.
- [39] LI C, XUE VW, WANG QM, et al. The Mincle/Syk/NF- κ B signaling circuit is essential for maintaining the protumoral activities of tumor-associated macrophages[J]. *Cancer Immunol Res*, 2020, 8(8): 1004-1017. DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-19-0782.
- [40] SADRAS T, MARTIN M, KUME K, et al. Developmental partitioning of SYK and ZAP70 prevents autoimmunity and cancer[J]. *Mol Cell*, 2021, 81(10): 2094-2111. DOI: 10.1016/j.molcel.2021.03.043.
- [41] HUFFAKER TB, EKIZ HA, BARBA C, et al. A Stat1 bound enhancer promotes Nampt expression and function within tumor associated macrophages[J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 2620. DOI: 10.1038/s41467-021-22923-5.
- [42] YANG L, CHEN S, ZHAO Q, et al. Histone deacetylase 3 contributes to the antiviral innate immunity of macrophages by interacting with FOXP1 to regulate STAT1/2 transcription[J]. *Cell Rep*, 2022, 38(4): 110302. DOI: 10.1016/j.celrep.2022.110302.
- [43] UZHACHENKO RV, SHANKER A. CD8⁺T lymphocyte and NK cell network: circuitry in the cytotoxic domain of immunity[J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 1906. DOI: 10.3389/fimmu.2019.01906.
- [44] NIEDERLOVA V, TSYKLAURI O, CHADIMOVA T, et al. CD8⁺Tregs revisited: a heterogeneous population with different phenotypes and properties[J]. *Eur J Immunol*, 2021, 51(3): 512-530. DOI: 10.1002/eji.202048614.
- [45] MA K, QIAO Y, WANG H, et al. Comparative expression analysis of PD-1, PD-L1, and CD8A in lung adenocarcinoma[J]. *Ann Transl Med*, 2020, 8(22): 1478. DOI: 10.21037/atm-20-6486.
- [46] HE L, WANG Z, ZHOU R, et al. Dexmedetomidine exerts cardioprotective effect through miR-146a-3p targeting IRAK1 and TRAF6 via inhibition of the NF- κ B pathway[J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 133: 110993. DOI: 10.1016/j.biopha.2020.110993.
- [47] HE X, ZHENG Y, LIU S, et al. MiR-146a protects small intestine against ischemia/reperfusion injury by down-regulating TLR4/TRAF6/NF- κ B pathway[J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233(3): 2476-2488. DOI: 10.1002/jcp.26124.
- [48] YANG Y, LI L. Depleting microRNA-146a-3p attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury via up-regulating SIRT1 and mediating NF- κ B pathway[J]. *J Drug Target*, 2021, 29(4): 420-429. DOI: 10.1080/1061186X.2020.1850738.
- [49] NONG Y, GUO Y, GUMPURT A, et al. Single dose of synthetic microRNA-199a or microRNA-149 mimic does not improve cardiac function in a murine model of myocardial infarction[J]. *Mol Cell Biochem*, 2021,

- 476(11): 4093-4106. DOI: 10.1007/s11010-021-04227-w.
- [50] CHEN F, HAN J, WANG D. Identification of key microRNAs and the underlying molecular mechanism in spinal cord ischemia-reperfusion injury in rats[J]. PeerJ, 2021, 9: e11454. DOI: 10.7717/peerj.11454.
- [51] XU N, HE D, SHAO Y, et al. Lung-derived exosomes in phosgene-induced acute lung injury regulate the functions of mesenchymal stem cells partially via miR-28-5p[J]. Biomed Pharmacother, 2020, 121: 109603. DOI: 10.1016/j.biopha.2019.109603.
- [52] YU Z, ZHU M, SHU D, et al. LncRNA PEG11as aggravates cerebral ischemia/reperfusion injury after ischemic stroke through miR-342-5p/PFN1 axis[J]. Life Sci, 2023, 313: 121276. DOI: 10.1016/j.lfs.2022.121276.
- [53] CHEN W, LI S, LIU Q, et al. MicroRNA-342-5p protects against myocardial ischemia-reperfusion injury by targeting the GPRC5A pathway[J]. Pharmazie, 2020, 75(6): 271-274. DOI: 10.1691/ph.2020.0383.
- [54] LIU W, HU C, ZHANG B, et al. Exosomal microRNA-342-5p secreted from adipose-derived mesenchymal stem cells mitigates acute kidney injury in sepsis mice by inhibiting TLR9[J]. Biol Proced Online, 2023, 25(1): 10. DOI: 10.1186/s12575-023-00198-y.
- [55] MA J, LI YT, ZHANG SX, et al. MiR-590-3p attenuates acute kidney injury by inhibiting tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 in septic mice[J]. Inflammation, 2019, 42(2): 637-649. DOI: 10.1007/s10753-018-0921-5.
- [56] WEI X, YI X, LV H, et al. MicroRNA-377-3p released by mesenchymal stem cell exosomes ameliorates lipopolysaccharide-induced acute lung injury by targeting RPTOR to induce autophagy[J]. Cell Death Dis, 2020, 1(8): 657. DOI: 10.1038/s41419-020-02857-4.
- [57] HUANG T, GAO Y, CAO Y, et al. Downregulation of mmu_circ_0000943 ameliorates renal ischemia reperfusion-triggered inflammation and oxidative stress via regulating mmu-miR-377-3p/Egr2 axis[J]. Int Immunopharmacol, 2022, 106: 108614. DOI: 10.1016/j.intimp.2022.108614.
- [58] WANG Y, JIN F, HUANG L, et al. MiR-590-3p protects against ischaemia/reperfusion injury in an oxygen-glucose deprivation and reoxygenation cellular model by regulating HMGB1/TLR4/MyD88/NF- κ B signaling[J]. Histol Histopathol, 2023, 38(8): 941-951. DOI: 10.14670/HH-18-562.
- [59] LEON-CORIA A, KUMAR M, WORKENTINE M, et al. Muc2 mucin and nonmucin microbiota confer distinct innate host defense in disease susceptibility and colonic injury[J]. Cell Mol Gastroenterol Hepatol, 2021, 11(1): 77-98. DOI: 10.1016/j.jcmgh.2020.07.003.
- [60] WANG P, BAO W, LIU X, et al. LncRNA miR143HG inhibits the proliferation of glioblastoma cells by sponging miR-504[J]. Int J Neurosci, 2022, 132(11): 1137-1142. DOI: 10.1080/00207454.2020.1865950.

(收稿日期: 2023-08-26)

(本文编辑: 方引超 吴秋玲)