

Journal of clinical medicine, 2022, 11 (16)

[9] Luo Q W, Gao S, Lv X, et al. A novel tool for predicting the risk of central lymph node metastasis in patients with papillary thyroid microcarcinoma: a retrospective cohort study [J]. BMC Cancer, 2022, 22 (1): 606-618.

[10] 张雨康, 何文, 万芳, 等. 多模态超声对甲状腺微小乳头状癌颈部淋巴结转移的预测价值 [J]. 中华医学超声杂志 (电子版), 2021, 18 (9): 834-840.

[11] Shen H, Lv G, Li T, et al. Construction and validation of a predictive nomogram based on ultrasound for lymph node metastasis of papillary thyroid carcinoma in the cervical central region [J]. Ultrasound Quarterly, 2023, 39: 47-52.

[12] Huang J, Lin C, Chen Y, et al. Clinical preliminary study on the correlation between nodular goitre and papillary thyroid carcinoma [J]. Translational Cancer Research, 2020, 9: 3794-3803.

• 临床研究 •

基于 WGCNA 和机器学习方法筛选冠脉搭桥术后氧化应激相关的核心基因

福建医科大学省立临床医学院 福建省立医院心血管外科 (福州 350001) 陈远翔 林 斌 陈东杰 林先东 翁国星¹

【摘 要】 目的 利用加权基因共表达网络分析 (WGCNA) 和机器学习方法, 筛选出冠脉搭桥 (CABG) 术后氧化应激 (OS) 相关的核心基因, 并预测治疗心肌缺血再灌注损伤 (MIRI) 的靶向药物。**方法** 从 GEO 数据库 CABG 术前、术后心室组织表达谱, 利用 WGCNA 得到术后最关联模块和基因, 从而获得 OS 相关基因 (OSRG), 进一步富集分析。再通过最小绝对值收敛和选择算子 (LASSO) 回归和随机森林算法, 筛选出冠脉搭桥术后核心 OSRG, 术前术后差异表达比较, 预测靶向药物。**结果** WGCNA 结果得到 32 个 CABG 术后 OSRG, 富集分析结果显示这些基因主要参与细胞死亡调控、细胞程序性死亡、细胞凋亡、免疫过程以及多种信号通路的调节。机器学习筛选出 3 个核心 OSRG: ATF3、JUN、VEGFA, 其均在 CABG 术后上调表达 ($P < 0.01$)。并预测 5 种靶向药物。**结论** 本研究通过综合运用 WGCNA 和机器学习方法, 成功筛选出 CABG 术后核心 OSRG, 这些核心基因术后均明显上调, 通过诱导细胞死亡、免疫等方式, 引起 MIRI。

【关键词】 冠脉搭桥; 机器学习; 氧化应激; 心肌缺血再灌注损伤

【中图分类号】 R541.4 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1002-2600(2023)06-0009-04

Identification of core genes associated with oxidative stress after coronary artery bypass grafting using WGCNA and machine learning methods

CHEN Yuanxiang, LIN Bin, CHEN Dongjie, LIN Xiandong, WENG Guoxing.
Department of Cardiovascular Surgery, Fujian Provincial Hospital, Provincial Clinical Medical College of Fujian Medical University, Fuzhou, Fujian 350001, China

【Abstract】 Objective This study aimed to use weighted gene co-expression network analysis (WGCNA) and machine learning methods to identify the core genes related to OS after CABG and predict targeted drugs for treating MIRI. **Methods** Gene expression profiles of pre- and post-operative ventricular tissues from the GEO database were analyzed using WGCNA to identify the most relevant modules and genes after surgery, resulting in OS-related genes (OSRG). Enrichment analysis was then performed. Subsequently, the least absolute shrinkage and selection operator (LASSO) regression and random forest algorithm were employed to screen for the core OSRG following CABG surgery. Differential expression analysis was conducted, and targeted drugs were predicted. **Results** WGCNA identified 32 OSRG after CABG surgery, and enrichment analysis revealed their involvement in cell death regulation, programmed cell death, apoptosis, immune processes, and regulation of various signaling pathways. Machine learning identified three core OSRG: ATF3, JUN, and VEGFA, all of which exhibited significant upregulation after CABG surgery ($P < 0.01$). Additionally, five targeted drugs were predicted. **Conclusion** Through the integrated application of WGCNA and machine learning methods, this study successfully identified core OSRG after CABG surgery, which were significantly upregulated and involved in inducing cell death and immune responses, thereby contributing to MIRI.

【Key words】 coronary artery bypass grafting; machine learning; oxidative stress; myocardial ischemia/reperfusion injury

1 通信作者, Email: gxw001@139.com

冠脉搭桥 (coronary artery bypass grafting, CABG) 是一种有效的血运重建方法。然而, 氧化应激 (OS) 将导致 CABG 术后心肌缺血再灌注损伤 (MIRI), 从而诱发心律失常、心肌顿抑、致死性心肌再灌注损伤等^[1-2]。因此需要深入研究 OS 在 CABG 术后的机制。加权基因共表达网络分析 (WGCNA) 和机器学习方法能够处理繁杂的数据, 在生物信息学方面的应用逐渐成熟^[3-4]。本研究中, 我们利用 GEO 数据库, 采用 WGCNA 筛选出与 CABG 术后 OS 相关基因 (OSRG), 然后通过最小绝对值收敛和选择算子 (LASSO) 和随机森林等机器学习方法, 筛选出 OSRG 的核心基因, 并预测药物。

1 材料与方法

1.1 数据收集与处理 在 GEO 数据库下载数据集 GSE12485 和 GSE12486, 共包含 10 个 CABG 术前心室组织和 10 个术后心室组织。

1.2 筛选 OSRG 将两个数据集标准化后, 利用 R 语言下运行“WGCNA”包。取方差前 50% 的基因构建共表达网络, 进行聚类分析, 并去除离群样本, 然后选取加权系数软阈值 β , 构建分层聚类树和动态树切割函数检测模块, 计算基因显著性和模块隶属度, 将模块与临床特征联系, 提取易感模块和基因。从 GeneCards 数据库获取 807 个 OS 基因 (相关性 >7.0)。将两者取交集, 得到 OSRG。

1.3 功能富集分析 使用 R 包“clusterProfiler” (version 3.14.3) 对 OSRG 进行富集分析, 包括基因本体论 (GO) 富集分析及京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路富集分析, 并绘制圈图。设定最小基因集为 5, 最大基因集为 5 000, $P < 0.05$ 和 $FDR \text{ of} < 0.25$ 。

1.4 机器学习方法获得核心 OSRG 在本研究中, 我们使用 R 包“glmnet”, 建立 LASSO 回归模型; 使用 R 包“randomForest”建立随机森林模型。将两者筛选的基因取交集, 获得核心 OSRG。术前术后核心 OSRG 差异表达比较, 绘制小提琴图。

1.5 药物预测 DrugBank (<https://www.DrugBank.ca>) 是一个通过相似或相反的基因表达谱连接疾病、基因和药物的数据库。在 DrugBank (5.0 版本) 数据库中, 通过“Protein-drug Interactions”模块预测核心 OSRG 的潜在治疗药物。

2 结果

2.1 数据处理结果 原始数据经过标准化处理后, 共 20 549 个基因。从中选取方差 $>50\%$ 的基因用于

构建共表达网络, 并进行聚类分析。通过选择最符合无尺度网络构建的软阈值 ($\beta=16$), 平衡网络节点 (node) 的平均连接度, 构建共表达网络。进行聚类分割时, 设定最小模块大小为 50, 深度分割为 1, 合并阈值为 0.25。最终获得 13 个基因共表达模块。将得到的模块绘制成模块向量特征图, 结果表明模块之间的表达具有相对独立性。将模块与组别进行关联分析, 得到与术后最为关联的模块进行后续研究。结果显示, 淡黄色模块 (lightyellow) ($r=0.66$, $P < 0.01$) 与术后相关性最高, 差异具有统计学意义 (图 1A)。淡黄色模块基因与模块相关性分析, 结果显示, 两者相关 ($r=0.60$, $P < 0.01$) (图 1B)。取淡黄色模块 231 个基因与 807 个 OS 基因取交集, 共获得 32 个 CABG 术后 OSRG (图 1C)。图 1 见封三。

2.2 富集分析 将 32 个 OSRG 进行 GO 和 KEGG 富集分析, 包括生物过程 (图 2A)、细胞组分、分子功能和通路分析 (图 2B)。GO 富集结果显示这些基因主要参与细胞死亡的调控、程序性细胞死亡的调控、免疫过程、细胞凋亡过程的调控等。KEGG 富集的结果主要是白介素-17 (IL-17)、肿瘤坏死因子 (TNF) 等信号通路。

2.3 确定核心基因 采用 LASSO 回归算法, 筛选出 6 个基因: ATF3、DUSP1、EGR1、JUN、S100A8、VEGFA (图 3A)。随机森林算法排序, 选择前 10 个最重要的基因: CCL4、CCL3、JUNB、CXCL8、CXCR4、PTGS2、VEGFA、ATF3、FOS、JUN (图 3B)。两者取交集, 获得 3 个核心 OSRG, 分别是 ATF3、JUN、VEGFA。进一步术前术后差异表达比较, 结果显示核心基因术后均高于术前 ($P < 0.01$) (图 4A)。

2.4 药物预测 预测的靶向药物是伪麻黄碱、长春花碱、厄贝沙坦、三氧化二砷、LGD-1550 (图 4B)。这些药物有望成为潜在的 OS 治疗药物。

3 讨论

本研究旨在将 WGCNA 和机器学习方法结合起来, 以筛选 CABG 术后 OS 相关的核心基因, 并预测潜在的治疗药物。研究结果显示, 通过 WGCNA 分析发现了与术后相关性最高的淡黄色模块, 并从中筛选出 32 个 OSRG。随后, 利用 LASSO 回归和随机森林算法筛选出了 3 个核心 OSRG: ATF3、JUN、VEGFA。这些核心基因在术后呈现上调表达。

本研究深入探讨了 CABG 术后 OS 导致 MIRI

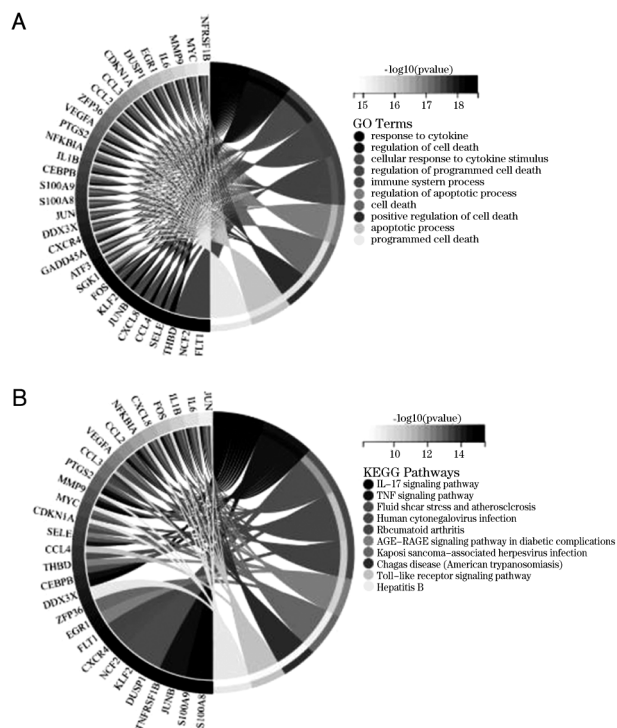


图 2 GO 和 KEGG 富集分析

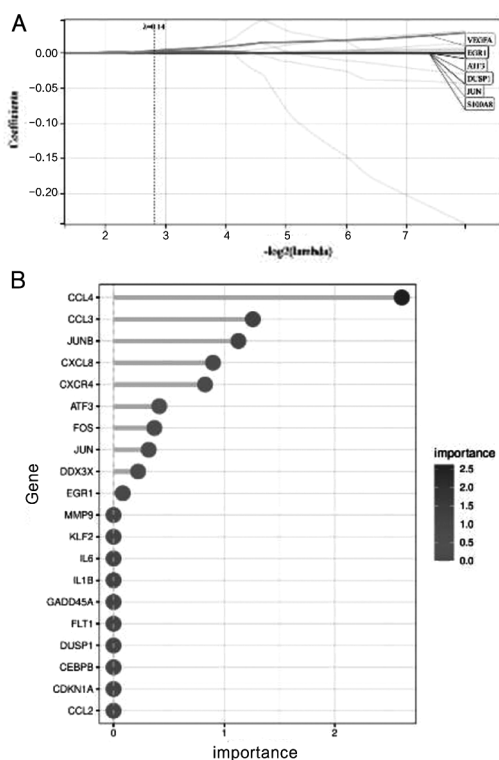


图 3 LASSO 回归和随机森林

的作用机制。淡黄色模块及其中的 OSRG 在术后表达上调,这提示了 OS 在 CABG 术后 MIRI 中的重要作用。富集分析结果显示,OSRG 主要参与细胞死亡调控、细胞程序性死亡、细胞凋亡、免疫过程

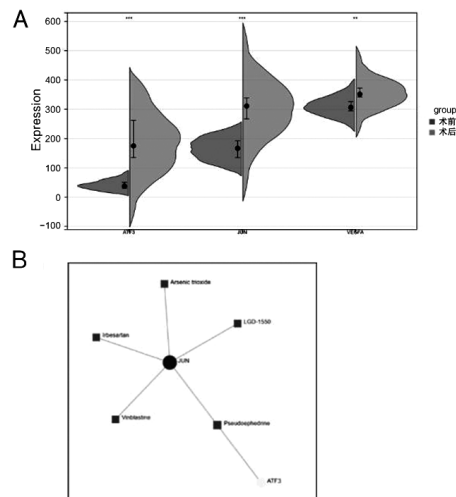


图 4 核心 OSRG 表达比较及药物预测

以及多种信号通路的调节。OS 会产生过量的活性氧,导致蛋白质变性,DNA 损伤,干扰复制,影响蛋白质的正确复制,从而引发细胞死亡^[5]。此外,OS 将会导致线粒体肿胀和外膜破裂,有利于促凋亡因子的沉积和 SMAC/Diablo 从膜间隙进入细胞质,引发细胞凋亡^[6]。另外,通过激活 TNF 信号通路,产生过量的 TNF- α 和随后的心肌细胞肿瘤坏死因子 $\alpha 1$ 型受体,导致心肌收缩功能障碍、肥大、纤维化和细胞死亡^[7]。IL-17 信号通路是免疫的重要通路,在 MIRI 期间连接着内源性免疫和适应性免疫^[8]。

通过 LASSO 回归和随机森林算法,我们筛选出了 3 个核心 OSRG,分别是 ATF3、JUN、VEGFA,并且术后表达均高于术前。这些核心基因过度表达可能在 CABG 术后 MIRI 中起到关键的调控作用。已有研究表明,ATF3 是已知的 OS 应答基因,活性氧可强烈诱导 ATF3 表达,从而保护老鼠不受内毒素休克损害^[9]。然而,在小鼠胚胎中,ATF3 的心脏特异性过表达导致心脏肥大和过早死亡^[10]。JUN,又称 c-Jun,研究表明 c-Jun 可通过负调控 CRAMP 控制心肌凋亡,而 CRAMP 同时被验证为心肌凋亡的保护基因^[11]。VEGFA (血管内皮生长因子 A) 能够诱导血管生成。然而,在冠脉闭塞早期,过度表达的 VEGFA 促进血管通透性增强和血浆成分外渗,引起水肿,最终导致组织损伤和炎症^[12]。同样在 CABG 术后,过度表达 VEGFA 也将可能导致心肌组织水肿,导致 MIRI。由此可见,3 个核心基因 CABG 术后 MIRI 具有重要作用,有望成为治疗的靶点。而我们所预测的靶向药物,需要我们进一步研究。

综上所述,本研究运用 WGCNA 方法,成功筛选出 CABG 术后 OSRG,富集结果显示 OS 通过诱导细胞死亡、免疫等方式,引起 MIRI,机器学习方法进一步筛选出 3 个核心 OSRG 及预测的靶向药物,具有深入研究的价值。

参考文献

- [1] Yang C F. Clinical manifestations and basic mechanisms of myocardial ischemia/reperfusion injury [J]. Tzu Chi Med J, 2018, 30 (4): 209-215.
- [2] 李思源,刘振兵. 氧化应激在心肌缺血再灌注损伤中的研究进展 [J]. 山东医药, 2021, 61 (22): 4.
- [3] 肖倩,黄业保,刘春强,等. 基于生物信息与机器学习鉴定溃疡性结肠炎的诊断生物标志物 [J]. 中国免疫学杂志, 2023, 39 (8): 1713-1718.
- [4] Radulescu E, Jaffe A E, Straub R E, et al. Identification and prioritization of gene sets associated with schizophrenia risk by co-expression network analysis in human brain [J]. Molecular Psychiatry, 2020, 25 (4): 791-804.
- [5] 吕仪,陈蓉,郑雯婧,等. 基于氧化应激的心肌缺血再灌注损伤研究进展 [J]. 中华中医药杂志, 2020, 35 (2): 5.
- [6] Qiao S G, Sun Y, Sun B, et al. Sevoflurane postconditioning protects against myocardial ischemia/reperfusion injury by restoring autophagic flux via an NO-dependent mechanism [J]. Acta Pharmacol Sin, 2019, 40 (1): 35-45.
- [7] Yao Y, Li F, Zhang M, et al. Targeting CaMKII- δ Ameliorates Cardiac Ischemia/Reperfusion Injury by Inhibiting Myocardial Inflammation [J]. Circ Res, 2022, 130 (6): 887-903.
- [8] Kolls J K, Lindén A. Interleukin-17 family members and inflammation [J]. Immunity, 2004, 21 (4): 467-476.
- [9] Hoetzenecker W, Echtenacher B, Guenova E, et al. ROS-induced ATF3 causes susceptibility to secondary infections during sepsis-associated immunosuppression [J]. Nat Med, 2011, 18 (1): 128-134.
- [10] Okamoto Y, Chaves A, Chen J, et al. Transgenic mice with cardiac-specific expression of activating transcription factor 3, a stress-inducible gene, have conduction abnormalities and contractile dysfunction [J]. Am J Pathol, 2001, 159 (2): 639-650.
- [11] Bei Y, Pan L L, Zhou Q, et al. Cathelicidin-related antimicrobial peptide protects against myocardial ischemia/reperfusion injury [J]. BMC medicine, 2019, 17 (1): 42.
- [12] Garcia R, Bouleti C, Sirol M, et al. VEGF-A plasma levels are associated with microvascular obstruction in patients with ST-segment elevation myocardial infarction [J]. Int J Cardiol, 2019, 291: 19-24.

• 临床研究 •

慢性牙周炎患者牙周基础治疗前后龈沟液中 DEL-1 水平的变化

福建医科大学附属口腔医院 (福州 350002) 刘崇武 吴春芳 陈钰玲 钟 泉 黄江涛¹ 伍晓红²

【摘要】 目的 分析牙周基础治疗前后慢性牙周炎患者龈沟液 (gingival crevicular fluid, GCF) 中发育性内皮细胞基因-1 (developmental endothelial locus-1, DEL-1) 水平的变化,探究 DEL-1 与慢性牙周炎之间的相关性。方法 纳入中重度慢性牙周炎患者 20 名,于牙周基础治疗前及治疗后 6 周进行牙周临床检查,同时检测患者 GCF 中 DEL-1 的水平。比较患者治疗前后的探诊深度 (probing depth, PD)、附着丧失 (attachment loss, AL)、出血指数 (bleeding index, BI) 以及 GCF 中 DEL-1 的水平。结果 慢性牙周炎患者经过完善的牙周基础治疗,牙周临床指标 PD、AL、BI 均较治疗前显著降低, GCF 中 DEL-1 水平较治疗前显著增加 ($P < 0.001$)。结论 牙周基础治疗后慢性牙周炎患者 GCF 的 DEL-1 水平可显著提高, GCF 中 DEL-1 的水平有望成为评估牙周基础治疗疗效的客观指标。

【关键词】 发育性内皮细胞基因-1; 慢性牙周炎; 牙周基础治疗; 龈沟液

【中图分类号】 R781.4 **【文献标识码】** B **【文章编号】** 1002-2600(2023)06-0012-05

Changes of DEL-1 levels in gingival crevicular fluid before and after initial therapy of chronic periodontitis

LIU Chongwu, WU Chunfang, CHEN Yuling, ZHONG Quan, HUANG Jiangtao, WU Xiaohong. School and Hospital of Stomatology, Fujian Medical University, Fuzhou, Fujian 350002, China

【Abstract】 **Objective** To observe the changes in developmental endothelial locus-1 (DEL-1) levels in gingival crevicular

基金项目:福建省卫生健康科技计划项目资助 (2022CXB013);福建省自然科学基金项目 (2022J01765)

¹ 福建医科大学口腔医学院; ² 通信作者, Email: 181904719@qq.com

基于 WGCNA 和机器学习方法筛选冠脉搭桥术后氧化应激相关的核心基因

(见正文第 9 页)

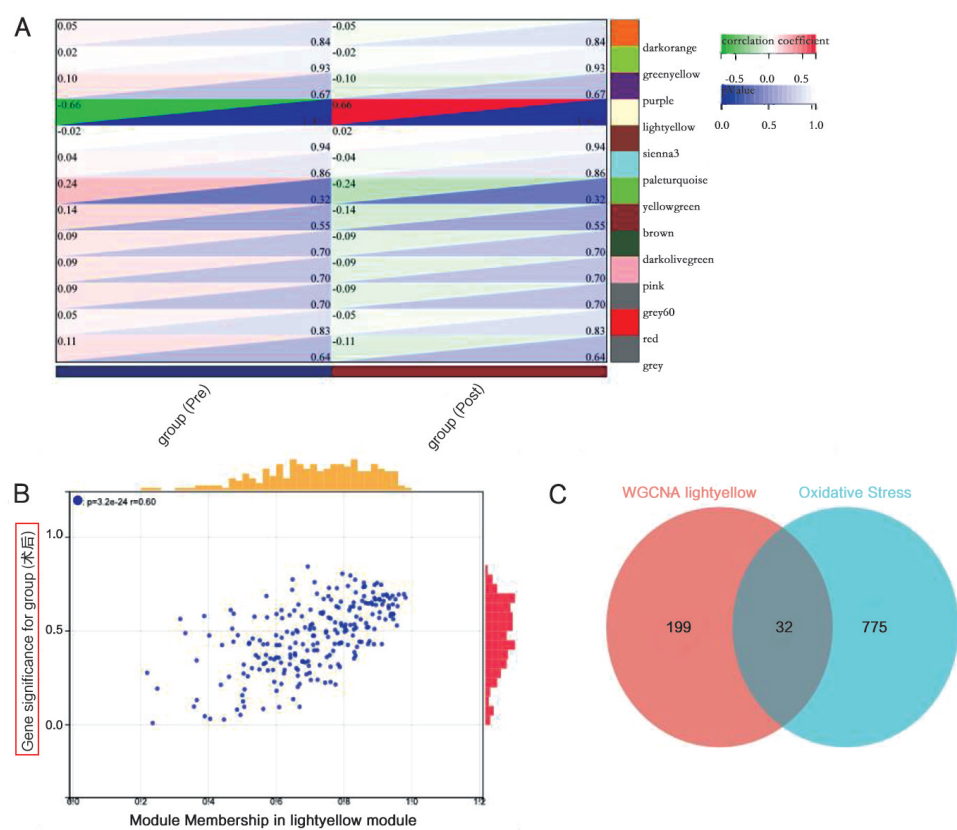
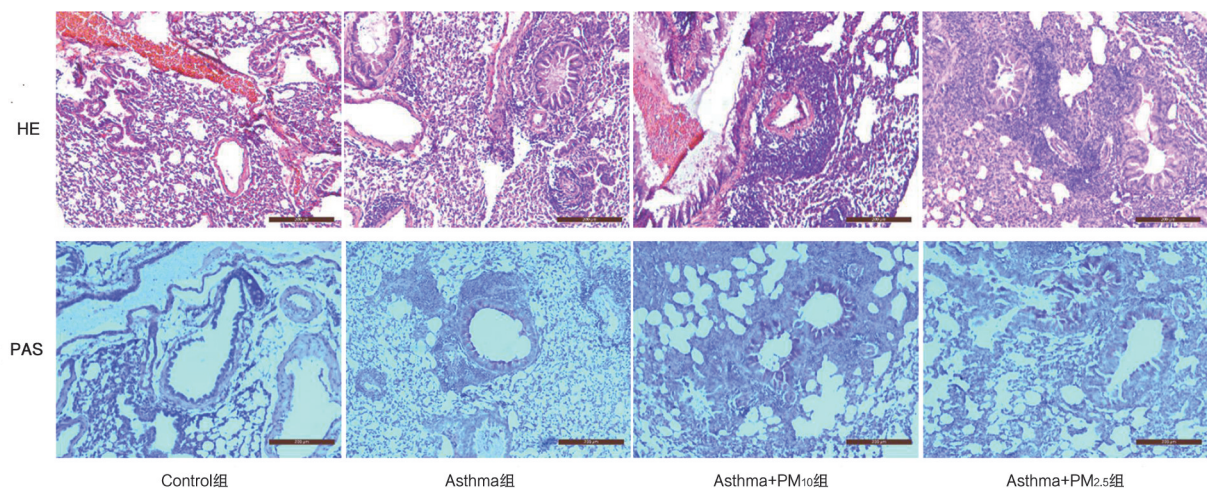


图 1 WGCNA 结果

PM₁₀ 和 PM_{2.5} 对哮喘小鼠 Th17 细胞分化的影响

(见正文第 136 页)



注：肺组织 HE 和 PAS 染色结果（ $\times 200$ ），标尺为 100 μ m。

图 1 不同处理下肺组织病理染色结果