

基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.002508

基于生物信息学对心肌梗死与不稳定型心绞痛差异靶基因的研究分析

伍燕宏,何劲松,杨小英,张 衡,白法文,郑景辉

(广西中医药大学附属瑞康医院心内科一区,南宁 530011)

【摘要】目的:探究心肌梗死与不稳定型心绞痛的生物学机制,为后期临床研究提供航向。**方法:**基于 GEO 数据库对基因芯片 GSE29111 进行挖掘,再利用 GWAS 数据库对差异靶基因进行二次筛选,最后进行生物信息学分析。**结果:**运用 GEO 数据库 GEO2R 鉴定到的差异靶基因,有 188 个蛋白点表达有统计学差异($P<0.05$);经 GWAS 数据库基因位点(gene/region) P 值设定: $-\log_{10}P\geq 3$ 筛选与心肌梗死与不稳定型心绞痛相关的差异靶基因共 7 个,分别是 *MACF1*、*TANC2*、*PSMF1*、*CD59*、*MYO18B*、*GALNT10*、*TFPI*。运用 Metascape 基因注释工具,发现这 7 个差异靶基因主要与蛋白水解的负调节、创伤愈合有关。运用 David 工具对这 7 个差异靶基因在线进行 GO 分析及 KEGG 分析发现,这些差异靶基因与内肽酶活性的负调控、凝血、肽链内切酶抑制剂活性、肌动蛋白结合和补体系统有关。**结论:**心肌梗死与不稳定型心绞痛差异靶基因主要与肽链内切酶抑制剂活性及补体系统相关联,主要调控的差异靶基因是 *CD59*、*TFPI*。

【关键词】心肌梗死;不稳定型心绞痛;基因芯片;差异靶基因;生物信息学

【中图分类号】R541.4

【文献标志码】A

【收稿日期】2019-09-03

Research analysis of the differential target genes of myocardial infarction and unstable angina pectoris based on bioinformatics

Wu Yanhong, He Jinsong, Yang Xiaoying, Zhang Xuan, Bai Fawen, Zheng Jinghui

(Department of Cardiology, Ruikang Hospital Affiliated to Guangxi University of Chinese Medicine)

【Abstract】Objective: To explore the biological mechanism of myocardial infarction and unstable angina pectoris, so as to provide a direction for clinical researchers. **Methods:** Gene chip GSE29111 was extracted based on GEO database, differential target genes were screened on the basis of GWAS database, and all were analyzed via bioinformatics. **Results:** A total of 188 differential target genes identified by GEO database GEO2R had significant differences in protein expression ($P<0.05$). After gene/region P value setting of $-\log_{10}P\geq 3$ in GWAS database, a total of 7 target genes related to myocardial infarction and unstable angina pectoris were screened, including *MACF1*, *TANC2*, *PSMF1*, *CD59*, *MYO18B*, *GALNT10* and *TFPI*. Metascape annotation tool was used and it was found that 7 differential target genes were mainly related to the negative regulation of proteolysis and wound healing. The David tool was used to perform the online GO analysis and KEGG analysis of 7 differential target genes and it was showed that these differential target genes were related to the negative regulation of endogenous peptidase activity, coagulation, endogenous peptidase inhibitor activity, actin binding and complement system. **Conclusion:** Differential target genes of myocardial infarction and unstable angina pectoris are mainly related to the activity of endopeptidase inhibitors and complement system, and main regulated differential target genes are *CD59* and *TFPI*.

【Key words】myocardial infarction; unstable angina pectoris; gene chips; differential target genes; bioinformatics

心肌梗死(myocardial infarction, MI)是冠状动脉闭塞或痉挛导致血流急剧减少,或因血流中断时

间过长使部分心肌发生严重缺血、缺氧导致局部坏死。心肌坏死将不可再生,疤痕组织将逐渐取代坏死心肌区域的心肌细胞,最终患者出现心室重构、心力衰竭等现象,这将严重影响患者日常生活质量,重则导致死亡^[1]。不稳定型心绞痛(unstable angina, UA)是处于急性心肌梗死和稳定型心绞痛之间的临床心绞痛综合征^[2]。目前认为,UA 的病理生理机制是

作者介绍:伍燕宏, Email: 624841386@qq.com,

研究方向:心血管疾病的研究及治疗。

通信作者:郑景辉, Email: jinghuizheng@yeah.net。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:81660776)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20200525.1634.005.html>

(2020-05-26)

动脉粥样硬化斑块破裂后逐渐形成血栓。若治疗不及时,将发展为心肌梗死,危及患者生命安全^[3-4]。由于这两者的疾病作用机制尚未完全诠释,因此本次研究首次运用 GEO、GWAS 两大数据库对心肌梗死与不稳定型心绞痛患者血清基因芯片进行分析鉴定,并用生物信息学对挖掘出的基因进行研究,以揭示心肌梗死与不稳定型心绞痛作用机制,为今后早期预防及治疗奠定基础。

1 资料和方法

1.1 资料来源

登录 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 系统,筛选栏中选择 GEO date,并在输入栏中输入“acute myocardial infarction”查询基因数据芯片 GSE29111。

1.2 方法

将确定的芯片表达谱数据 GSE29111 下载,在 GEO2R 平台内,自动按设计的方案(检测 ACS 后人类全血中的 mRNA 表达水平心肌梗死组与不稳定型心绞痛组)数据做差异靶基因分析,对获得差异靶基因运用 GWAS 数据库进行二次筛选,对最终筛选的差异靶基因运用 Metascape 进行 GO 富集

及 KEGG 通路热图分析。利用 David 6.7 在线对差异靶基因进行 GO 功能富集分析和 KEGG 信号通路分析。

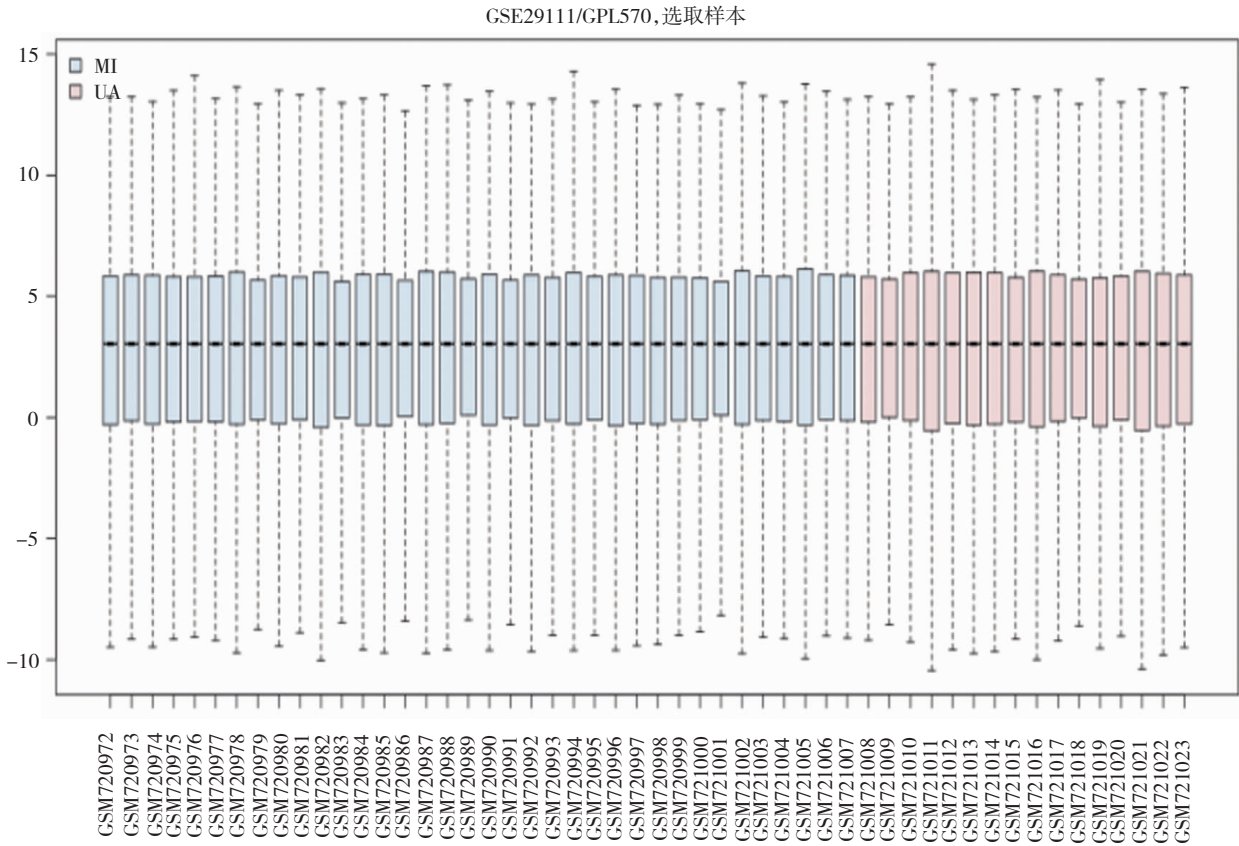
2 结 果

2.1 差异靶基因选取

选取 GSE29111 表达库(图 1),并在 GEO2R 平台中分别对 ACS 后人类全血中的 mRNA 表达水平心肌梗死组与不稳定型心绞痛组数据进行分析,共发现 188 个差异靶基因,再运用 GWAS 即全基因组关联分析数据库(<https://www.gwascentral.org/>)进行二次筛选 P 值设定: $-\log_{10}P \geq 3$,最后发现 2 组数据中共有 7 个差异靶基因纳入标准(表 1)。

表 1 7 个主要差异靶基因

序号	差异靶基因	差异靶基因诠释
1	<i>MACF1</i>	微管-肌动蛋白交联因子 1
2	<i>TANC2</i>	四磷酸肽修饰、锚蛋白修饰和含有 2 的卷曲螺旋
3	<i>CD59</i>	CD59 分子
4	<i>PSMF1</i>	蛋白酶体抑制剂亚基 1
5	<i>MYO18B</i>	肌球蛋白 XVIIIb 抗体
6	<i>GALNT10</i>	多肽 N-acetylgalactosaminyltransferase 10
7	<i>TFPI</i>	重要因子途径抑制剂



2.2 Metascape 分析差异靶基因

7 个差异靶基因导入 Metascape 在线绘制热图分析(图 2),蛋白水解的负调节及愈合反应占显著作用。

2.3 差异靶基因的 GO 分析

2.3.1 差异靶基因生物学过程分析 通过 DAVID 富集分析系统对本实验获得的差异靶基因进行生物学过程(biological process,BP)分析(表 2)。这些差异靶基因主要参与 3 种生物学过程,表现为内肽酶活性的负调控、凝血、子宫胚胎内发育。富集分析结果中 $P<0.05$ 分子功能有 1 项。

2.3.2 差异靶基因分子功能分析 通过 DAVID 富集分析系统对本实验获得的差异靶基因进行基因分子功能(molecular function,MF)分析,差异靶基因参与了 2 类分子途径,表现为肽链内切酶抑制剂活性、肌动蛋白结合,其中 $P<0.05$ 的有 1 项(表 3)。

2.3.3 差异靶基因信号转导通路分析 通过差异靶基因的 KEGG 通路分析 $P<0.05$ 的有 1 条。表现为补体系统(表 4)。

2.3.4 调控的差异靶基因相互作用 通过 Genemania 进行差异靶基因相互作用之间的分析。发现相互作用的差异靶基因主要是 *MACF*、*TANC2*、*GALNT10*、*CKAP5*、*CD59*、*PSMF1*、*TFPI*。

2.3.5 网络反应组学构建 Reactant 数据库是一个汇集了由专家撰写、经同行评阅的有关人体内各项反应及生物学路径的文章数据库。目前该库覆盖 UniProt 数据库中 20 000 个经人工注释过的人类蛋白质中大约 70%以上的蛋白质,对 46 个主要人类生物学研究领域,如细胞凋亡、HIV、流感病毒生活周期、DNA 复制、转录、生理止血机制、碳水化合物代谢途径等进行了注释,并对与 OMIM 疾病表型相关的 1 005 个蛋白质的正常功能进行了记录。

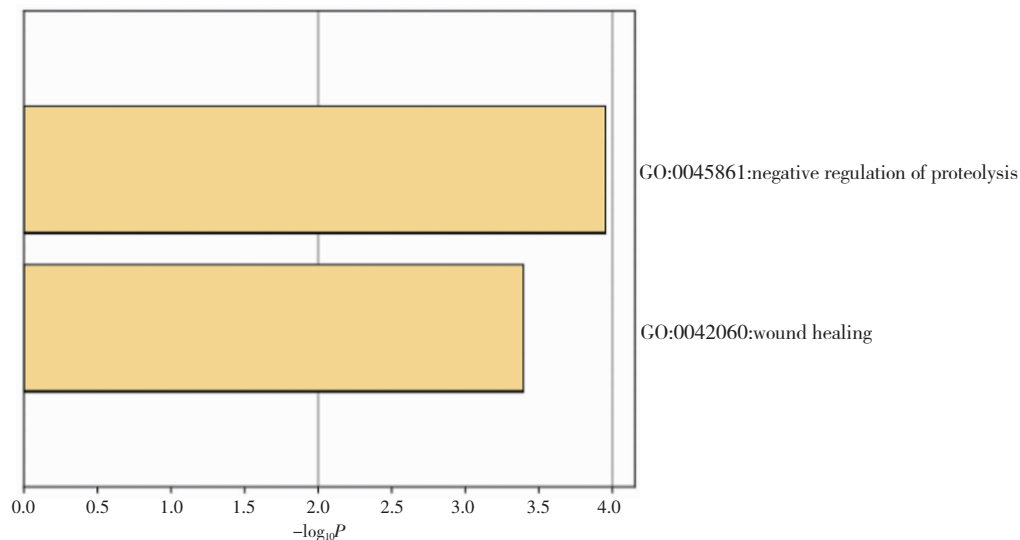


图 2 Metascape 热图分析

表 2 差异靶基因生物学过程分析

种类	术语	总数	总数比例/% ^a	<i>P</i> 值	Benjamini ^b
GOTERM_BP_DIRECT	内肽酶活性的负调控	2	0.2	4.20e-02	8.80e-01
GOTERM_BP_DIRECT	凝血	2	0.2	6.40e-02	8.00e-01
GOTERM_BP_DIRECT	子宫胚胎内发育	2	0.2	6.50e-02	6.70e-01

注:a,差异靶基因在当前功能类的数量占当前有功能注释差异靶基因总数的百分比;b:经 Benjamining 法控制错误发现率来进行 *P* 值校正

表 3 差异靶基因分子功能分析

种类	术语	总数	总数比例/% ^a	<i>P</i> 值	Benjamini ^b
GOTERM_MF_DIRECT	肽链内切酶抑制剂活性	2	0.2	1.20e-02	2.20e-01
GOTERM_MF_DIRECT	肌动蛋白结合	2	0.2	8.00e-02	5.80e-01

注:a,差异靶基因在当前功能类的数量占当前有功能注释差异靶基因总数的百分比;b:经 Benjamining 法控制错误发现率来进行 *P* 值校正

表 4 差异靶基因 KEGG 通路分析

种类	术语	总数	总数比例/% ^a	<i>P</i> 值	Benjamini ^b
KEGG_PATHWAY	补体系统	2	0.2	3.00e-02	1.40e-01

注:a,差异靶基因在当前功能类的数量占当前有功能注释差异靶基因总数的百分比;b:经 Benjamining 法控制错误发现率来进行 *P* 值校正

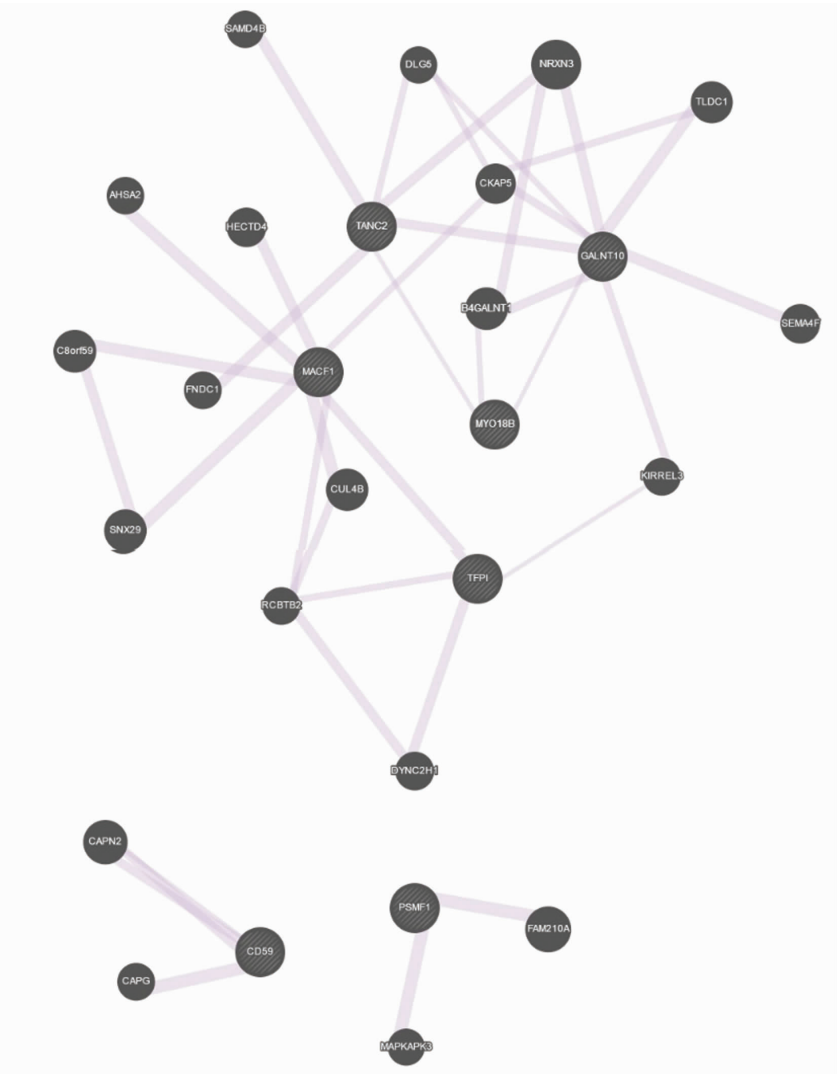


图 3 Genemania 差异靶基因互作网络图

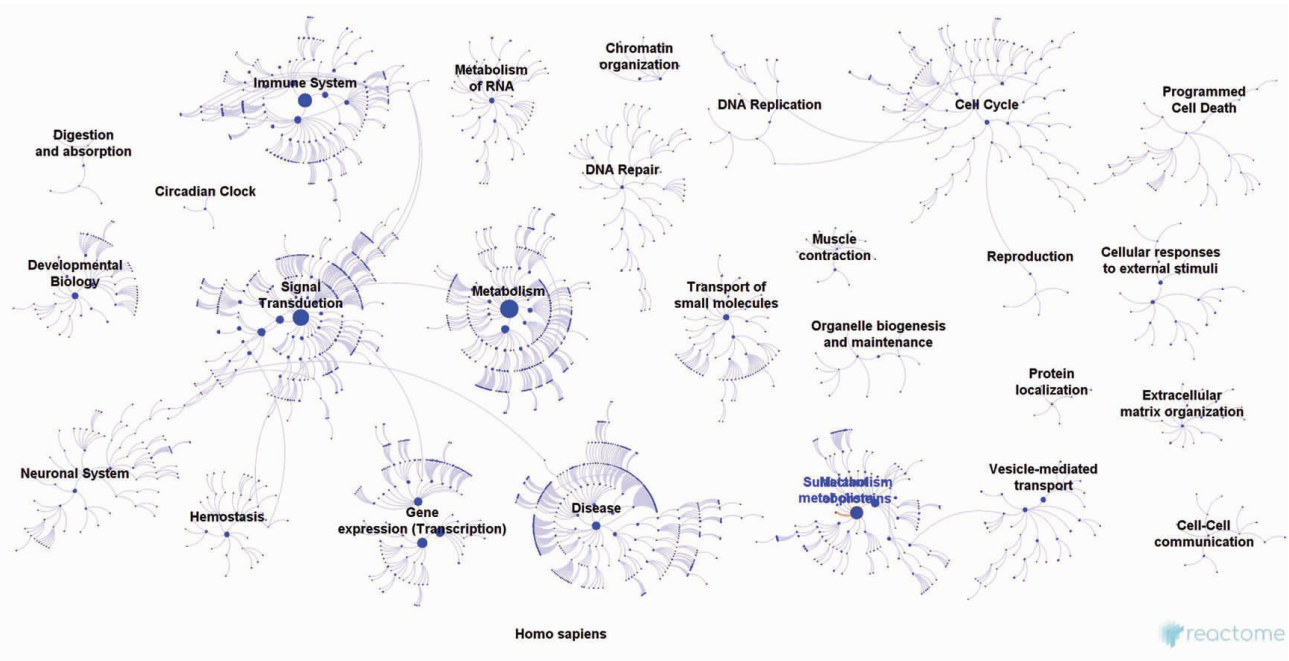
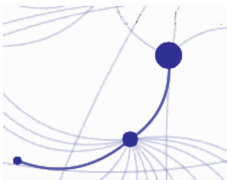
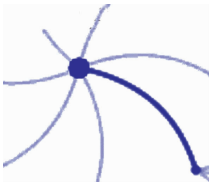
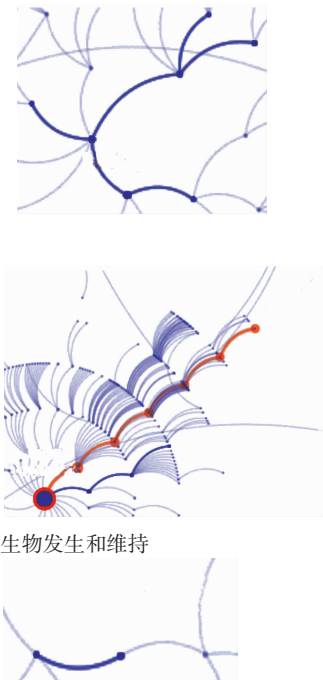
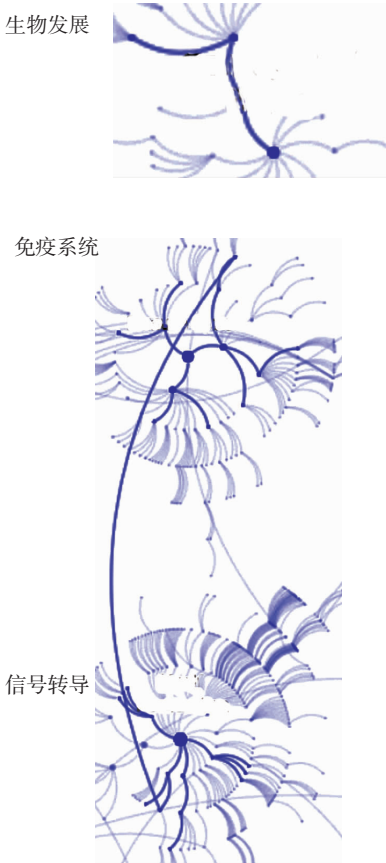


图 4 差异靶基因网络反应组学构建网络图

表 5 6 种差异靶基因示意图列表

靶蛋白	主要成分图	靶蛋白	主要成分图
GALNT10	蛋白质代谢过程 	PSMF1	DNA复制 细胞循环 
CD59	免疫系统 	转录小分子 新陈代谢 	
TFPI	凝血止血 	蛋白质代谢过程 基因表达 	
MACF1	蛋白质代谢过程 免疫系统 	编程性细胞死亡 细胞对外界刺激的反应 	
CKAP5	细胞循环 信号转导 细胞器的生物发生和维持 	生物发展 免疫系统 信号转导 	

将上述 7 种差异靶基因输入 Reactome 数据库分析,最终发现 MACF 参与细胞外基质的组织构建,GALNT10 参与蛋白质代谢过程,CD59 参与免疫系统调节,TFPI 参与凝血止血作用,MACF1 参与细胞外基质、信号转导、免疫系统、蛋白质代谢过程、基因表达等,CKAP5、PSMF1 两者共参与信号通路传导,TANC2 目前尚未被发现。

3 讨论

心肌梗死与不稳定型心绞痛均属于急性冠脉综合征(acute coronary syndrome,ACS)范畴。急性冠脉综合征(acute coronary syndrome,ACS)具有发病急骤、并发症多、病死率高三大特点^[5]。ACS 严重影响全人类的生活质量,并给后人带来严重威胁。虽然当前治疗 ACS 的方式已存在,且能在短时间内将堵塞的血管再通,但后期再发 ACS 的可能仍然不能解除。直至目前,因 ACS 造成的死亡率、心梗致死率及再入院率依然占据首位^[6]。如何有效预防 ACS 是如今研究的热点。本文运用 GEO 及 GWAS 两大数据库对心肌梗死与不稳定型心绞痛的差异靶基因进行研究,为今后治疗 ACS 提供强有力的证据。

本次对血清基因芯片 GSE29111 进行初筛,共找到差异靶基因 188 个。经 GWAS 数据库基因位点筛选与心肌梗死与不稳定型心绞痛相关的差异靶基因,最终有 7 个符合度最高,分别是 *MACF1*、*TANC2*、*PSMF1*、*CD59*、*MYO18B*、*GALNT10*、*TFPI*。对以上 7 个差异靶基因进行生物信息研究发现,这 7 个差异靶基因通过富集 GO 分析及 KEGG 通路分析后最终关系密切在于肽链内切酶抑制剂活性及补体系统。肽链内切酶抑制剂包括 ACEI 抑制剂、ARBs、肾素抑制剂、糜蛋白酶抑制剂、血管紧张肽转化酶、醛固酮抑制剂及针对 RAS 的基因治疗和免疫治疗等。前期研究发现心房钠尿肽(atrial natriuretic peptide,ANP)在心肌梗死后 3~4 d 达最高峰,若心肌持续受损,ANP 浓度可持续达高峰至 7~8 d,若治疗期间未出现心衰和心律失常等事件,ANP 浓度将在心肌梗死后 12 d 恢复正常指标。因此,血液中 ANP 浓度值可作为心肌梗死预后评估指标,心肌梗死后 12 h 检测血浆中 ANP 前体指标升高情况是可预测患者 1 年内的死亡率^[7]。肽链内切酶抑制剂可

通过抑制钠尿肽(natriuretic peptide,NP)降解,提高内源性 NP 浓度水平。有研究显示,输注 NP 可扩张冠状动脉起到潜在保护作用,其机制主要以抑制中性粒细胞损伤为主^[8]。补体系统是机体中天然的细胞毒效应宿主防御系统,可排除外来病原体。近期研究显示,急性心肌梗死患者中梗死区域内补体激活产物沉积导致补体激活产物浓度异常升高^[9]。贺忠梅等^[10]研究证实,心肌梗死后补体系统激活是通过调控心肌组织炎症反应和纤维化过程加重心脏病理损伤。补体系统中血清 C1q 浓度升高与 ACS 有密切关系^[11-13]。

通过 Genemania 进行差异靶基因相互作用之间的分析可知,差异靶基因 *MACF*、*TANC2*、*GALNT10*、*CKAP5*、*CD59*、*PSMF1*、*TFPI* 为 ACS 的主要调控基因。徐颖婕^[14]研究表明,CD59 能降低血脂水平的同时也能维持主动脉细胞增殖与凋亡平衡,减缓动脉粥样硬化斑块损伤发展。刘凤鸣^[15]证实 CD59 可减缓血管中斑块的发展与抑制攻膜复合体(membrane attack complex,MAC)有关。事实上,CD59 还与心力衰竭、高血压有着密切联系。外源性组织因子旁路抑制剂(tissue factor pathway inhibitor,TFPI)能减轻 ACS 严重程度,为降低死亡率提供理论基础,其作用在于抗凝和抑制血栓形成方面为主。血栓及斑块形成时,能抑制血管内膜的增生,延缓血管重塑和血管腔再狭窄,进而延缓冠状动脉粥样硬化性心脏病进程。游琪^[16]研究急性心肌梗死患者血浆 TFPI 浓度在 PCI 术前后变化试验证明,TFPI 不仅可阻止血管内血栓形成的作用,还可防治再灌注后无复流现象。王渊铭等^[17]利用 ELISA 法检测急性心肌梗死、不稳定心绞痛、稳定心绞痛和体检正常人 4 类人群的 TFPI 水平,最终发现急性冠状动脉血栓性事件发生过程中 TFPI 浓度显著升高。金梅花等^[18]研究瑞舒伐他汀对 ACS 患者血浆 TF 及 TFPI 的影响,发现 ACS 患者血浆 TFPI 水平明显比普通治疗组升高,且能抑制血栓形成。

将上述 7 种差异靶蛋白通过网络反应组学构建网络图构建,可以看到 GALNT10 参与蛋白质代谢过程,MACF1 参与细胞外基质、信号转导、免疫系统、蛋白质代谢过程、基因表达等,CKAP5、PSMF1 两

者共参与信号通路传导。从目前文献仅发现 CKAP5 差异蛋白与心血管疾病中心力衰竭有关,其他差异蛋白目前在心血管疾病中尚未有相关文献报道,而在肿瘤、免疫疾病方面关系较大,这不能否定与心血管疾病无关。在心血管疾病中,许多疾病是相互联系的,且心血管疾病目前在代谢疾病中已经有研究。赵肖奕^[19]研究证实,城市空气污染物黑碳水平与代谢综合征患者的血压与心率变异性呈正相关,同时影响血管内皮功能和动脉僵硬度。郭慧君^[20]研究显示,患有代谢综合征的会加重心血管疾病的危险因素。吕赛等^[21]研究认为,高尿酸血症、代谢综合征将逐渐加重冠心病的发生发展。

本次研究通过生物信息学研究最终发现 CD59、TFPI 差异靶基因是心肌梗死与不稳定型心绞痛的发病机制,但仍需要进一步实验加以验证。而其余的差异靶基因是本次研究中所挖掘出的,也需在今后的实验性研究里进一步开展,为今后的心血管疾病治疗打开新的大门,今后将运用更多的基因芯片进行系统分析,希望对实验研究有更大的突破。

参 考 文 献

- [1] Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, et al. Third universal definition of myocardial infarction[J]. *Glob Heart*, 2012, 7(4): 275–295.
- [2] 贺文婷, 秦 越. 曲美他嗪联合瑞舒伐他汀对急性冠脉综合征患者血清炎症因子和左心舒张功能的影响[J]. *陕西医学杂志*, 2016, 45(11): 1522–1523.
- [3] 夏胜勇. 不同剂量瑞舒伐他汀联合曲美他嗪治疗老年冠心病左心功能不全的疗效观察[J]. *老年医学与保健*, 2017, 23(4): 339–340, 348.
- [4] 高 秋, 杨 松, 陈燕春, 等. 经皮冠状动脉介入治疗不稳定型心绞痛应用阿托伐他汀联合曲美他嗪对炎症因子的影响[J]. *河北医药*, 2016, 38(21): 3227–3229, 3233.
- [5] 郑昊钊, 龙 芳, 杨 华, 等. 急性冠脉综合征发病机制及治疗进展[J]. *中国药房*, 2014, 25(30): 2846–2848.
- [6] Hamm CW, Bassand JP, Agewall S, et al. ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation[J]. *G Ital Cardiol (Rome)*, 2012, 13(3): 171–228.
- [7] Nagaya N, Nishikimi T, Goto Y, et al. Plasma brain natriuretic peptide is a biochemical marker for the prediction of progressive ventricular remodeling after acute myocardial infarction[J]. *Am Heart J*, 1998, 135(1): 21–28.
- [8] Matsumura T, Kugiyama K, Sugiyama S, et al. Neutral endopeptidase in neutrophils modulates protective effects of natriuretic peptides against neutrophils induced endothelial cytotoxicity[J]. *J Clin Invest*, 1996, 97(10): 2192–2203.
- [9] Leban N, Jraba K, Chalhoun A, et al. Polymorphism of C3 complement in association with myocardial infarction in a sample of central Tunisia[J]. *Diagn Pathol*, 2013, 8: 93.
- [10] 贺忠梅, 张红霞, 杨 敏, 等. 小鼠心肌梗死后补体系统激活与炎症反应的相关性研究[J]. *心肺血管病杂志*, 2014, 33(1): 98–102.
- [11] Kishida K, Nakagawa Y, Kobayashi H, et al. High serum C1q-binding adiponectin levels in male patients with acute coronary syndrome[J]. *Cardiovasc Diabetol*, 2014, 13: 9.
- [12] Hong ES, Lim C, Choi HY, et al. The amount of C1q-adiponectin complex is higher in the serum and the complex localizes to perivascular areas of fat tissues and the intimal medial laves of blood vessels of coronary artery disease patients[J]. *Cardiovasc Diabetol*, 2015, 14: 50.
- [13] 辛 娜, 吴跃刚, 王 瑶, 等. 冠心病患者血清补体 C1q 水平变化及其临床意义[J]. *检验医学与临床*, 2016, 13(20): 2902–2903.
- [14] 徐颖婕. 补体调节蛋白 CD59 在螺旋藻藻蓝蛋白抗动脉粥样硬化中的调控作用研究[D]. 青岛: 青岛大学, 2013.
- [15] 刘凤鸣. 补体调节分子 CD59 和 Crry 在动脉粥样硬化中的作用和机制[D]. 济南: 山东大学, 2014.
- [16] 游 琪. 急性心肌梗死患者直接介入后无复流与血浆组织因子及组织因子途径抑制物的关系[J]. *现代中西医结合杂志*, 2015, 24(5): 463–465.
- [17] 王渊铭, 马 瑾, 陈 德, 等. 组织因子及其抑制物在急性冠脉血栓性事件中的表达[J]. *血栓与止血学*, 2015, 21(3): 136–138, 143.
- [18] 金梅花, 杨立波, 薛 莉. 瑞舒伐他汀对急性冠脉综合征患者血浆 TF 及 TFPI 的影响[J]. *临床心血管病杂志*, 2018, 34(7): 652–655.
- [19] 赵肖奕. 北京市黑碳及 PM_{2.5} 对代谢综合征患者心血管健康影响的临床及机制研究[D]. 北京: 北京协和医学院, 2014.
- [20] 郭慧君. 508 例代谢综合征患者的心血管病危险因素控制知信行分析[D]. 长春: 吉林大学, 2015.
- [21] 吕 赛, 周玉杰, 刘 巍. 高尿酸血症、代谢综合征与冠心病的研究进展[J]. *心肺血管病杂志*, 2018, 37(1): 76–78.

(责任编辑: 唐秋姗)