

DOI:10.12113/201909003

# IgA 肾病患者与膜性肾病患者外周血单核细胞 mRNA 分析

梁爽, 凡奎\*, 张燕, 谢杨眉

(四川省三台县人民医院 肾内科, 四川 绵阳 621100)

**摘要:**为了寻找诊断、鉴别 IgA 肾病(IgAN)和膜性肾病(MN)的血液特异性标记物,利用公共数据库中的 IgAN 和 MN 患者的外周血单核细胞(PBMCs)的转录组表达谱数据集识别特异性生物标记物,为诊断和鉴别提供简便、可靠的依据补充。从公共基因表达数据库(GEO)下载 IgAN 患者组(n=15)和 MN 患者组(n=8)芯片数据集,筛选前 250 个差异表达基因(DEGs)。通过分析筛选关键基因和途径,进行基因本体(GO)富集分析、京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路分析和蛋白质与蛋白质相互作用关系(PPI)分析等进一步了解 DEGs。通过分析共发现 75 个显著 DEGs,其中 73 个上调基因,2 个下调基因。GO 富集分析的生物学过程(BP)主要包括蛋白质转运、内溶酶体到溶酶体转运、趋化因子介导的信号通路作用等。显著富集差异表达基因 KEGG 通路分析包括 Endocytosis 和 Hepatitis B 的相关信号通路。PPI 筛选出 *EPS15*、*STAT4*、*CCL2*、*SUN2*、*SEC24C*、*SEC31A*、*GOLGB1*、*F2R*、*RAB12* 和 *PTK2B* 等关键基因。成功筛选出核心差异表达基因,为 IgAN 和 MN 的诊断和鉴别提供简便、可靠的依据补充,甚至提供治疗的新靶点。

**关键词:** IgA 肾病;膜性肾病;外周血单核细胞;生物信息学

中图分类号:R692.3 文献标志码:A 文章编号:1672-5565(2020)03-163-06

## mRNA analysis of peripheral blood monocytes in patients with IgA nephropathy and with membranous nephropathy

LIANG Shuang, FAN Kui\*, ZHANG Yan, XIE Yangmei

(Department of Nephrology, Santai People's Hospital of Sichuan Province, Mianyang 621100, Sichuan, China)

**Abstract:** In order to select blood specified markers for diagnosis and identification of IgA nephropathy (IgAN) and membranous nephropathy (MN), transcriptome expression profile data set of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) collected from patients with IgAN and MN was obtained from public database and then analyzed, which provides convenient and reliable basis for diagnosis and identification. Chip data set of patients with IgAN (n=15) and MN (n=8) was downloaded from Gene Expression Omnibus (GEO), from which the first 250 differentially expressed genes (DEGs) were screened out. Gene Ontology (GO) enrichment analysis, Kyoto Encyclopedia of Gene and Genome (KEGG) pathway analysis, and Protein-Protein Interaction (PPI) analysis were conducted to further understand DEGs by analyzing and screening key genes and pathways. A total of 75 significant GENES were selected, including 73 up-regulated genes and 2 down-regulated genes. Biological process (BP) of GO enrichment analysis mainly involved protein transport, endosome to lysosome transport, chemokine-mediated signaling pathway, and so on. Endocytosis and Hepatitis B related signaling pathways were based on KEGG pathway analysis of significantly enriched DEGs. Key genes such as *EPS15*, *STAT4*, *CCL2*, *SUN2*, *SEC24C*, *SEC31A*, *GOLGB1*, *F2R*, *RAB12*, and *PTK2B* were screened out by PPI. Therefore, the core DEGs which were successfully selected in this study provide not only convenient and reliable additional evidence for the diagnosis and identification of IgAN and MN, but also potential therapeutic targets.

**Keywords:** IgA nephropathy; Membranous nephropathy; Peripheral blood mononuclear cells; Bioinformatics

收稿日期:2019-09-13;修回日期:2019-11-13.

作者简介:梁爽,女,主治医师,研究方向:常见肾脏疾病的诊治与研究. E-mail:444922783@qq.com.

\*通信作者:凡奎,男,医师,研究方向:慢性肾脏疾病的诊治与研究. E-mail:cbyfk15@163.com.

IgA 肾病 (IgA Nephropathy, IgAN) 是最常见的原发性肾小球肾炎, 20%~40% 的患者在 20 年内进展为终末期肾病<sup>[1]</sup>。膜性肾病 (Membranous Nephropathy, MN) 是肾病综合征常见的病理类型之一。经肾脏活检可确切诊断和鉴别 IgAN 和 MN, 但肾穿为有创检查, 存在不易操作等因素。因此, 了解 IgAN 和 MN 的疾病发生发展机制以及寻找特异性生物标记物, 能为诊断和鉴别提供简便、可靠的依据补充。

运用传统的研究方法和数据处理分析方式常遇见高维度、小样本、变异大、线性等问题, 不易做到简便的分类和有效的、系统的分析。生物信息学技术通过综合利用生物学、计算机科学和信息技术等多学科技术、手段, 能够精确高效的运算大量、复杂的生物数据。通过下载 IgAN 和 MN 患者外周血单核细胞 DNA 高通量数据集, 分析筛选关键基因和途径, 进行基因本体 (Gene Ontology, GO) 功能、京都基因基因组百科全书 (Kyoto Encyclopedia of Gene and Genome, KEGG) 和显著富集基因蛋白质与蛋白质相互作用 (Protein-Protein Interaction, PPI) 分析等进一步了解差异表达基因 (Differentially Expressed Genes, DEGs)。

## 1 材料与方法

### 1.1 GEO 数据库芯片数据下载

进入 NCBI Gene Expression Omnibus (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>), 下载 GSE73953 数据集, 该数据集包含 15 个 IgAN 样本和 8 个 MN 样本。下载其矩阵文件 SOFT formatted family file(s).SOFT 以及原始数据 GSE73953\_RAW.tar。通过 GEO 数据库评价数据原始值分布。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 筛选差异表达基因 (DEGs)

R 是集统计分析 with 图形显示于一体的一种统计分析软件。它拥有一套完整的数据处理、计算和制图软件系统。其主要功能包括: 数据存储、数组运算、统计分析、统计作图和程序编写等。

下载安装 R 软件。加载 limma 包<sup>[2]</sup>, 对原始数据进行提取和处理, 以及差异表达基因的分析 ( $|\log_{2}FC| > 2, P < 0.05$ )。R 软件采用 R/Bioconductor software version 3.5.1 版本。

#### 1.2.2 差异表达基因 GO 和 KEGG 分析

运用 Cytoscape (<https://cytoscape.org/>), 安装 bing, 将筛选出的前 96 个差异表达基因导入程序, 根据 GEO 中数据研究对象, 选择 Homo sapiens。

运用 DAVID 数据库 (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery, <https://david.ncicrf.gov/>) 对差异表达基因进行 GO 富集分析和 KEGG 通路分析。Corrected P-Value < 0.05 记为有统计学意义。

#### 1.2.3 显著富集差异表达基因 PPI 分析

STRING (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes, <https://string-db.org/>) 是已知和预测蛋白质-蛋白质相互作用的数据库。相互作用包括直接 (物理) 联系和间接 (功能) 联系。它们来源于计算预测、生物体之间的知识转移以及来自其他 (主要) 数据库的相互作用。

运用 STRING 在线数据库, 构建蛋白质互作网络, 取 combined score  $\geq 0.4$ , 下载 PPI 网络数据。通过 Cytoscape 软件 (version 3.6.1) 将 PPI 网络可视化, 并通过 MCODE 插件聚类构建共表达模块。最后, 通过 R 软件计算 PPI 网络中各个节点的连接度。运行后得到蛋白质相互作用关系图。

## 2 结果分析

### 2.1 GEO 数据库芯片数据

数据来自 GEO 数据库 GSE73953 数据集, 下载得到 15 个 IgA Nephropathy 样本和 8 个 Membranous Nephropathy 样本。得到矩阵文件 SOFT formatted family file(s).SOFT 以及原始数据 GSE73953\_RAW.tar。通过 GEO 数据库 GEO2R 评价数据集原始值分布 (见图 1), 基本以中间值为中心表明数据具有可比较性。

### 2.2 差异表达基因 (DEGs)

该数据集包含 15 个 IgA Nephropathy 样本和 8 个 Membranous Nephropathy 样本。通过 R 软件 limma 包<sup>[2]</sup>, 根据限定条件:  $|\log_{2}FC| > 2, P < 0.05$ , 在 IgAN 患者和 MN 患者中得到显著差异表达基因 75 个, 其中 73 个上调表达基因和 2 个下调表达基因。由差异表达基因所得热图 (见图 2a) 和火山图 (见图 2b)。

### 2.3 差异基因 GO 和 KEGG 分析

为进一步了解筛选得到 IgAN、MN 疾病相关的差异表达基因功能和通路, 利用 Cytoscape 和 DAVID 在线数据库对分析得到的差异基因分别进行 GO 富集分析与 KEGG 通路分析。

显著富集差异表达基因 GO 富集分析的生物学过程 (Biological process, BP) (见图 3a) 主要包括蛋白质转运、内溶酶体到溶酶体转运、趋化因子介导的信号通路作用和钙介导信号的调控等。细胞学组分 (Cellular components, CC) (见图 3b) 主要为 COPII 囊

泡、NMDA 选择性谷氨酸受体复合物和高尔基体等。分子生物学功能(Molecular function, MF) (见图 3c) 主要有 NMDA 谷氨酸受体激活、信号传感器激活和钙粘蛋白结合参与细胞与细胞的黏附等。

显著富集差异表达基因 KEGG 通路分析(见图 3d) 显示具有统计学差异( $P<0.05$ )的上调及下调差异表达基因通路,包括 Endocytosis 和 Hepatitis B 的相关信号通路。

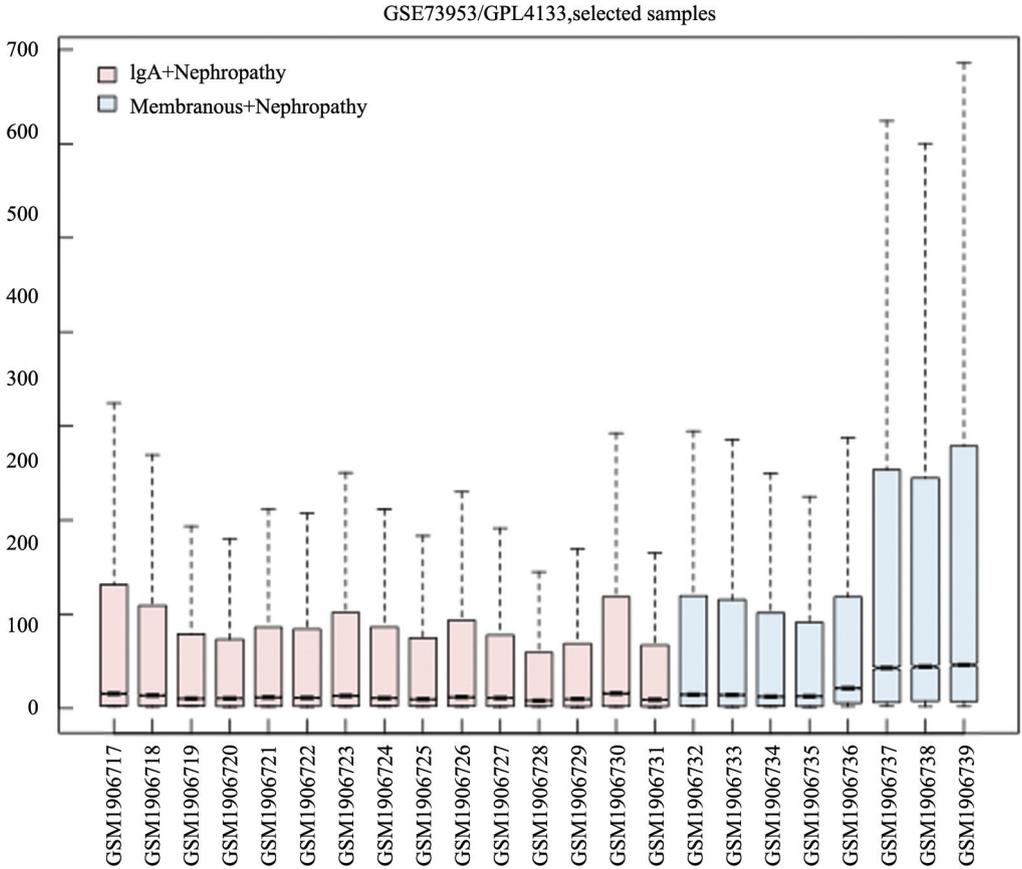


图 1 原始数据集值分布

Fig.1 Values distribution of original data set

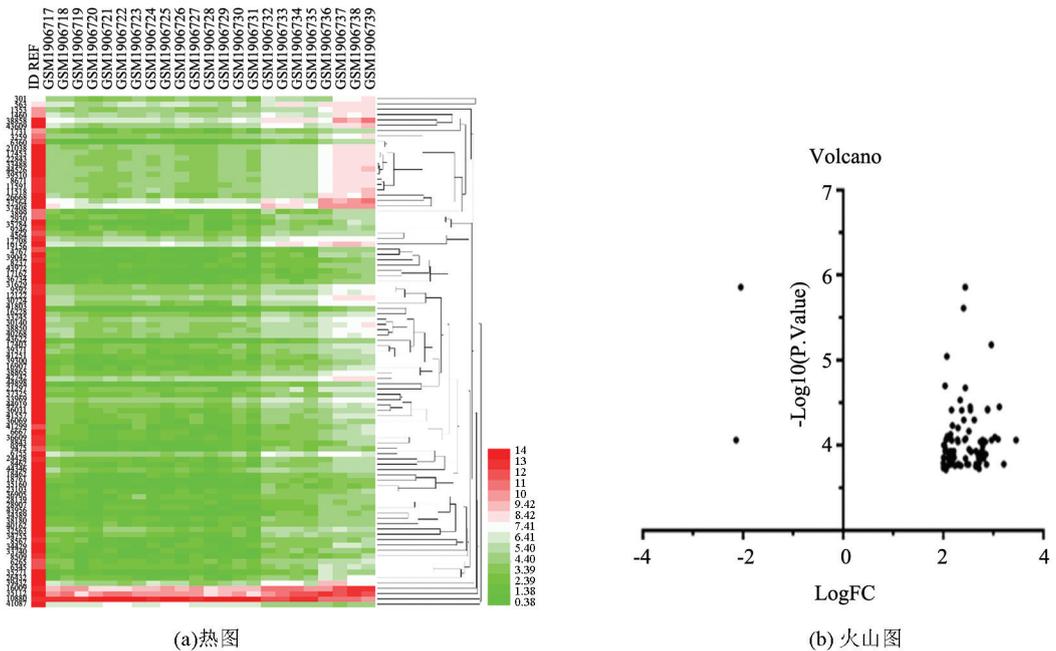


图 2 差异表达基因热图和火山图

Fig.2 Heatmap and volcano map of the DEGs

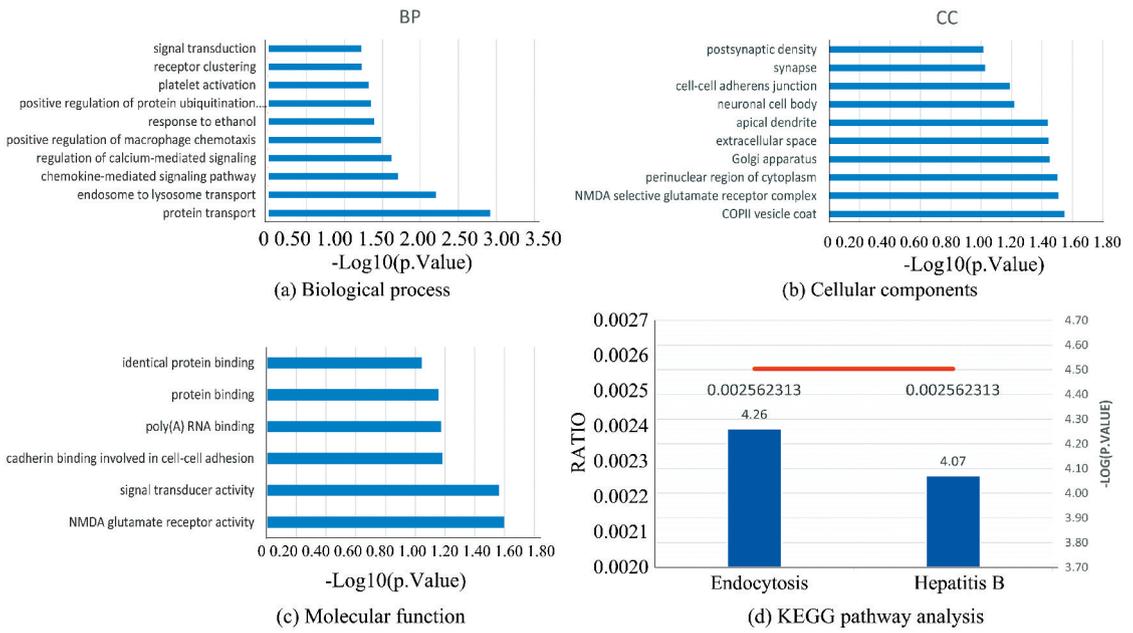


图 3 GO 富集分析和 KEGG 通路分析

Fig.3 GO enrichment analysis and KEGG pathway analysis

2.4 显著富集基因 PPI 分析

为进一步筛选差异表达基因所编码的蛋白质之间的相互作用关系,采用 STRING 工具对差异表达基因蛋白相互作用关系进行梳理,得到蛋白质相互

作用关系图(见图 4)。按照节点数关系筛选得到前 10 个关键基因,包括: *EPS15*、*STAT4*、*CCL2*、*SUN2*、*SEC24C*、*SEC31A*、*GOLGB1*、*F2R*、*RAB12* 和 *PTK2B*。

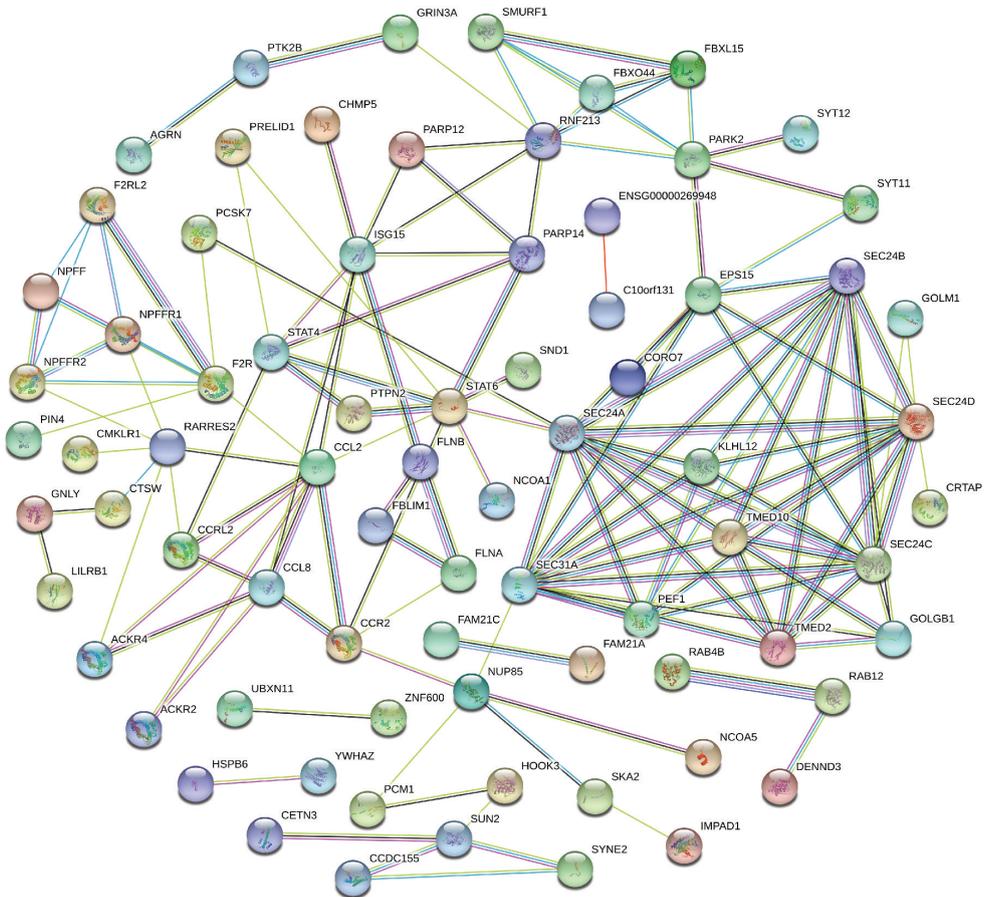


图 4 显著富集差异表达基因蛋白相互作用关系

Fig.4 Protein interaction of significantly enriched DEGs

### 3 讨论

IgAN 目前被认为是世界上最常见的原发性肾小球肾炎之一<sup>[1]</sup>。MN 是肾病综合征常见的病理类型之一,大部分为特发性膜性肾病 (Idiopathic membranous nephropathy, IMN)<sup>[3]</sup>。MN 的主要病理机制为:循环的自体抗体与肾小球内的内源性抗原结合,并在肾小球毛细血管壁中形成免疫复合物的沉积,补体激活对肾小球足细胞 (Podocytes) 的影响和对细胞屏障的破坏,导致 NS 表现<sup>[4]</sup>。

探寻 IgAN 和 MN 的疾病发生发展机制以及寻找特异性生物标记物,以便诊断和鉴别甚至发现新的治疗靶点。生物信息学相关技术通过利用生物学、计算机学和信息技术揭示生物数据所蕴含的奥秘<sup>[5]</sup>。为了寻找可能有助于更好地理解 IgAN 和 MN 分子基础并有助于诊断的活性病变的新标记物,使用外周血单核细胞 (PBMCs) 进行 DNA 分析。通过下载 IgAN 和 MN 患者外周血单核细胞 DNA 高通量数据集,通过筛选差异表达基因、基因富集分析及蛋白质相互作用关系分析。

分析发现,在具有明显表达差异的 250 个基因中,包括 226 个上调的差异表达基因和 24 个下调的差异表达基因。其中 75 个显著 DEGs,包括 73 个上调基因,2 个下调基因。GO 富集分析的生物学过程 (BP) 主要包括蛋白质转运、内容酶体到溶酶体转运、趋化因子介导的信号通路作用等。细胞学组分 (CC) 主要为 COP II 囊泡、NMDA 选择性谷氨酸受体复合物和高尔基体等。分子生物学功能 (MF) 主要有 NMDA 谷氨酸受体激活、信号传感器激活和钙粘蛋白结合参与细胞与细胞的黏附等。显著富集差异表达基因 KEGG 通路分析包括 Endocytosis 和 Hepatitis B 的相关信号通路。PPI 筛选出 *EPS15*、*STAT4*、*CCL2*、*SUN2*、*SEC24C*、*SEC31A*、*GOLGB1*、*F2R*、*RAB12* 和 *PTK2B* 等关键基因。

*EPS15* 为表皮生长因子受体底物基因,参与细胞生长调节<sup>[6]</sup>。可能参与细胞增殖的控制,有丝分裂信号的调节,特别是 EGFR 在网格蛋白涂层凹坑 (CCPs) 的组装中发挥作用,可能参与 IgA 介导的免疫反应<sup>[7]</sup>。*STAT4* 是一种转录因子,它在 T 细胞和单核细胞中转导 IL-12 和 IL-23 的生成,导致单核细胞激活<sup>[8]</sup>,一些证据显示,*STAT4* 可能在多种自身免疫性疾病的进展中发挥着关键的作用<sup>[9]</sup>。相关研究利用炎症相 mRNA 表达谱显示,IgAN 患者体内趋化因子 (C-C motif) 配体 2 (*CCL2*) 表达上调<sup>[10]</sup>,表明 *CCL2* 可能参与 IgA 肾脏病的发病和进

展。细胞学组分 (CC) 分析发现主要存在 COP II 囊泡和高尔基体的差异,研究显示在 prechylomicron 运输囊泡 (PCTV) 与高尔基体对接时,存在 COPII 蛋白,并且是需要 SEC24C 参与<sup>[11]</sup>。*F2R* 基因存在功能多态性,研究显示其启动子多态性改变在结节病中的作用,主要导致炎症的加重<sup>[12]</sup>,IgAN 和 MN 存在炎症改变,*F2R* 对其是否存在具体影响,目前尚无确切研究证据。*RAB12* 在人 PMBCs 磷酸化中起重要作用,在帕金森疾病表现显著<sup>[13]</sup>,而同 *SUN2*、*SEC31*、*GOLGB1* 和 *PTK2B* 在人 IgAN 和 MN 中的具体作用和机制有待进一步研究。

### 4 结论与展望

筛选出核心差异表达基因,特别是 *EPS15*、*STAT4*、*CCL2*、*SEC24C* 和 *F2R*,为 IgAN 和 MN 的诊断和鉴别提供简便、可靠的依据补充,甚至提供治疗的新靶点。研究和掌握 IgAN 和 MN 疾病特异性的发病机制和特异性标记物,对现阶段 IgAN 和 MN 的诊断和鉴别具有重要意义。探讨基因表达及调控,挖掘特异性蛋白质表达和 PPI,有助于寻找新治疗靶点。

### 参考文献 (References)

- [1] ZHANG Yuemiao, ZHOU Xujie, ZHANG Hong. What genetics tells us about the pathogenesis of IgA nephropathy: The role of immune factors and infection [J]. *Kidney International Reports*, 2017, 2(3): 318-331. DOI: 10.1016/j.ekir.2017.02.005.
- [2] RITCHIE M E, PHIPSON B, WU D, et al. *Limma* powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies [J]. *Nucleic Acids Research*, 2015, 43(7): e47. DOI: 10.1093/nar/gkv007.
- [3] RONCO P, DEBIEC H. Pathophysiological advances in membranous nephropathy: Time for a shift in patient's care [J]. *Lancet*, 2015, 385(9981): 1983-1992. DOI: 10.1016/S0140-6736(15)60731-0.
- [4] BECK L H J, SALANT D J. Membranous nephropathy: From models to man [J]. *The Journal of Clinical Investigation*, 2014, 124(6): 2307-2314. DOI: 10.1172/JCI72270.
- [5] 汪凡军, 张楚瑜. 生物信息学在医学上的应用 [J]. *国际检验医学杂志*, 2006, 27(2): 161-163. DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2006.02.025.
- WANG Fanjun, ZHANG Chuyu. The application of bioinformatics in medicine [J]. *International Journal of Laboratory Medicine*, 2006, 27(2): 161-163. DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2006.02.025.

- [6] WANG L, JOHNSON A, HANNA M, et al. Eps15 membrane-binding and -bending activity acts redundantly with Fcho1 during clathrin-mediated endocytosis [J]. *Molecular Biology of the Cell*, 2016, 27 ( 17 ) : 2675 - 2687. DOI: 10.1091/mbc.E16-03-0151.
- [7] PENG Min, YIN Na, ZHANG Wei. Endocytosis of Fc $\alpha$ 1R is clathrin and dynamin dependent, but its cytoplasmic domain is not required [J]. *Cell Research*, 2010, 20 ( 2 ) : 223 - 227. DOI: 10.1038/cr.2009.120.
- [8] WATFORD W F, HISSONG B D, BREAM J H, et al. Signaling by IL-12 and L-23 and the immunoregulatory roles of STAT4 [J]. *Immunological Reviews*, 2004, 202 : 139 - 156. DOI: 10.1111/j.0105-2896.2004.00211.x.
- [9] ZERVOU M L, MAMOULAKIS D, PANIERAKIS C, et al. STAT4: A risk factor for type 1 diabetes? [J]. *Human Immunology*, 2008, 69 ( 10 ) : 647 - 650. DOI: 10.1016/j.humimm.2008.07.004.
- [10] FENG Y, LV L L, WU W J, et al. Urinary exosomes and exosomal CCL2 mRNA as biomarkers of active histologic injury in IgA nephropathy [J]. *The American Journal of Pathology*, 2018, 188 ( 11 ) : 2542 - 2552. DOI: 10.1016/j.ajpath.2018.07.017.
- [11] SIDDIQI S, SIDDIQI S A, MANSBACH C M. Sec24C is required for docking the prechylomicron transport vesicle with the Golgi [J]. *Journal of Lipid Research*, 2010, 51 ( 5 ) : 1093 - 1100. DOI: 10.1194/jlr.M002758.
- [12] PLATE M, LAWSON P J, HILL M R, et al. Role of a functional polymorphism in the F2R gene promoter in sarcoidosis [J]. *Respirology*, 2015, 20 ( 8 ) : 1285 - 1287. DOI: 10.1111/resp.12608.
- [13] THIRSTRUP K, DACHSEL J C, OPPERMANN F S, et al. Selective LRRK2 kinase inhibition reduces phosphorylation of endogenous Rab10 and Rab12 in human peripheral mononuclear blood cells [J]. *Scientific Reports*, 2017, 7 ( 1 ) : 10300. DOI: 10.1038/s41598-017-10501-z.

[责任编辑:吴永英]