

原发性开角型青光眼铁死亡相关基因表达谱的生物信息学分析

周日龙¹, 廖良²

引用:周日龙,廖良. 原发性开角型青光眼铁死亡相关基因表达谱的生物信息学分析. 国际眼科杂志 2023;23(10):1699-1708

基金项目:国家自然科学基金面上项目(No.81973909)

作者单位:¹(100020)中国北京市,北京中医药大学;²(100078)中国北京市,北京中医药大学东方医院眼科

作者简介:周日龙,在读硕士研究生,研究方向:眼底病。

通讯作者:廖良,毕业于北京中医药大学,博士,主任医师,博士研究生导师,研究方向:眼底病. 58273677@qq.com

收稿日期:2023-07-05 修回日期:2023-09-01

摘要

目的:通过生物信息学手段分析原发性开角型青光眼(POAG)进展过程中调控铁死亡相关的关键基因,旨在进一步揭示铁死亡在 POAG 中的生物学机制。

方法:从 GEO 数据库中获得小梁网来源的 GSE27276 数据集,其中包括 19 个 POAG 小梁网组织样本和 17 个正常小梁网组织样本;下载 FerrDb 数据库整理的铁死亡相关基因,将 GSE27276 数据集与铁死亡基因集进行映射,筛选 POAG 中铁死亡相关的预后差异表达基因(DE-FRGs)并进行相关性分析,进一步了解 DE-FRGs 的 GO 和 KEGG 通路富集。应用 LASSO 回归模型与 SVM-RFE 模型两种机器学习的算法筛选铁死亡相关 POAG 的关键基因,将两种模型的筛选结果取交集,获得最佳特征基因,使用受试者特征曲线(ROC)评估临床诊断能力;对最佳特征基因进行单基因基因组富集分析(GSEA)和变异分析(GSVA);借助视乳头来源的 GSE2378 与 GSE9944 数据集验证最佳特征基因的表达水平。

结果:与正常小梁网组织相比,POAG 的小梁网组织有 396 个铁死亡基因存在差异表达,其中 39 个为上调基因,64 个为下调基因,Spearman 相关性分析显示上调基因和下调基因均有一定的相关性。GO 功能和 KEGG 通路富集分析显示,差异基因主要富集在氧化应激反应和铁死亡通路;通过 LASSO 和 SVM-RFE 算法将 18 个 DE-FRGs 确定为关键基因,具有更高的诊断价值。GSEA 和 GSVA 富集分析显示 GDF15、MFN2 和 OTUB1 基因与谷胱甘肽代谢通路密切相关,其中 MFN2 和 OTUB1 分别在高表达组和低表达组中激活谷胱甘肽代谢通路。GSE2378 与 GSE9944 数据集交叉验证明确视乳头标本中 CREB1 的表达水平相对于正常视乳头样本显著升高,这与 GSE27276 数据集小梁网样本表达一致。

结论:基于生物信息学分析挖掘得到 396 个 POAG 的 DE-FRGs,通过构建机器筛选模型和外部数据集交叉验证,筛选出 CREB1 有望成为潜在诊断生物标志物的最佳特征基因,为进一步深入阐明 POAG 铁死亡相关的分子机制和诊断提供靶点。同时筛选的基因还需要进一步体内、

外实验验证,揭示铁死亡在 POAG 中的生物学机制。

关键词:原发性开角型青光眼;铁死亡;生物信息学

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2023.10.19

Bioinformatics analysis of ferroptosis - related gene expression profile in primary open angle glaucoma

Ri-Long Zhou¹, Liang Liao²

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No.81973909)

¹Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100020, China;

²Department of Ophthalmology, Dongfang Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100078, China

Correspondence to: Liang Liao. Department of Ophthalmology, Dongfang Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100078, China. 58273677@qq.com

Received:2023-07-05 Accepted:2023-09-01

Abstract

• **AIM:** To investigate the ferroptosis-related key genes in the progression of primary open angle glaucoma (POAG) through bioinformatics analysis, aiming to gain a deeper understanding of the biological mechanism of ferroptosis in POAG.

• **METHODS:** The GSE27276 dataset, derived from the trabecular meshwork, was obtained from the GEO database. It consisted of 19 trabecular meshwork tissue samples and 17 normal trabecular meshwork tissue samples. The ferroptosis-related genes were obtained from the FerrDb database. Then the GSE27276 dataset with the ferroptosis gene set was mapped, differentially expressed ferroptosis-related genes (DE-FRGs) were identified in POAG, and the correlation analysis was performed. Additionally, the gene ontology (GO) function and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathways of DE-FRGs were further analyzed. This study utilized two machine learning algorithms, namely the LASSO regression model and the SVM-RFE model, to identify the ferroptosis-related key genes of POAG. The screening results from both models were intersected to identify the most significant genes. The clinical diagnostic performance of these genes was evaluated using the receiver operating characteristic curve (ROC); the gene set enrichment analysis (GSEA) and gene set variation analysis (GSVA) were conducted on the

most significant genes; the expression levels of these genes were validated using the GSE2378 and GSE9944 datasets obtained from the optic nerve head.

• **RESULTS:** In comparison to normal trabecular meshwork tissue, a total of 396 ferroptosis genes exhibited differential expression in POAG trabecular meshwork tissue. Among these, 39 genes were up-regulated while 64 genes were down-regulated. Spearman correlation analysis revealed certain correlation between the up-regulated genes and the down-regulated genes. The GO function and KEGG pathway enrichment analysis revealed that the differential genes were primarily enriched in the oxidative stress response and ferroptosis pathways. A total of 18 DE-FRGs were identified as key genes using LASSO and SVM-RFE algorithms, which demonstrated a higher diagnostic value. GSEA and GSVA revealed a significant association between GDF15, MFN2, and OTUB1 genes with the glutathione metabolic pathway. Moreover, it was observed that MFN2 activated the glutathione metabolic pathway in the high expression group, while OTUB1 activated it in the low expression group. The cross-validation of GSE2378 and GSE9944 datasets revealed a significant increase in the expression level of CREB1 in optic nerve specimens compared to normal optic nerve specimens, and it was consistent with the expression observed in trabecular meshwork samples from the GSE27276 dataset.

• **CONCLUSION:** Based on bioinformatics analysis, a total of 396 DE-FRGs were identified in POAG. By constructing a machine screening model and cross-validation of external datasets, CREB1 is expected to be the best characteristic gene for potential diagnostic biomarker, and provide targets for further elucidating the molecular mechanism and the diagnosis of ferroptosis in POAG. However, further *in vivo* and *in vitro* validation is required to elucidate the biological mechanism of ferroptosis in POAG.

• **KEYWORDS:** primary open angle glaucoma; ferroptosis; bioinformatics

Citation: Zhou RL, Liao L. Bioinformatics analysis of ferroptosis-related gene expression profile in primary open angle glaucoma. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2023;23(10):1699-1708

0 引言

原发性开角型青光眼(primary open angle glaucoma, POAG)是一种慢性进行性视神经病变,其特征为视网膜神经节细胞(retinal ganglion cell, RGC)进行性变性和视野缺失,好发于40~80岁人群^[1-2]。POAG虽不危及生

命,但具有早期隐匿性强、中后期致盲率高等特点^[3],已成为导致中老年致盲最常见的原因之一。如果未得到及时有效的治疗,POAG引起的视力丧失不仅影响生活质量,而且造成重大的社会经济负担^[4]。目前,其发病机制尚不完全清楚,而遗传学被证明在POAG的发病机制中起关键作用^[3-5]。铁死亡是2012年新发现的一种铁依赖性程序性细胞死亡模式,其发生机制不同于细胞焦亡、凋亡、坏死和自噬^[6]。铁死亡的特征是线粒体萎缩和线粒体膜密度增加,铁和脂质活性氧的积累^[7]。铁死亡的发生机制是通过脂质自由基的形成和谷胱甘肽(L-glutathione, GSH)的消耗或脂质过氧化物酶4(glutathione peroxidase 4, GPX4)的失活来催化的^[8]。铁循环在铁死亡的发展中起着关键作用。然而,POAG与铁死亡的分子机制尚未完全明确,基于生物信息学的方法探索铁死亡相关的最佳特征基因与通路,为阐明POAG的分子机制提供有力支持(详细流程图见图1)。

1 材料和方法

1.1 材料 本研究的POAG样本和正常样本的基因表达数据是从GEO数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)中获得。其中将小梁网来源的GSE27276数据集^[9]作为训练集,芯片信息:Sentrix Human-6 Expression BeadChip,平台是GPL2507;视乳头来源的GSE2378和GSE9944数据集^[10-11]作为验证集,芯片信息:(1)Affymetrix Human Genome U95 Version 2 Array, GPL8300;(2)Affymetrix Human Genome U133A 2.0 Array, GPL571(表1)。此外,从FerrDb数据库(<http://www.datjar.com:40013/bi2104/>)获取铁死亡相关的调控基因FRG($n=728$)。

1.2 方法

1.2.1 差异表达基因的筛选及相关性分析 运用R语言(ver4.2.2)limma和pheatmap包对数据集基因与铁死亡基因进行映射,以 $P<0.05$ 和 $|\text{Log}2\text{FC}|>1$ 作为过滤条件,获取与铁死亡相关的预后差异表达基因(differentially expressed ferroptosis-related genes, DE-FRGs)以及表达量,并绘制DE-FRGs在正常(Control)组与原发性开角型青光眼(POAG)组的相关性热图。为了进一步了解DE-FRGs的相关程度,采用corrlot包中的Spearman相关对上调和下调的基因进行相关性分析。

1.2.2 GO功能富集分析和KEGG通路富集分析 对DE-FRGs进行功能与通路富集化分析,以确定相关的信号通路,并揭示与生物过程相关的潜在分子机制。使用ClusterProfiler包进行基因本体(gene ontology, GO)富集分析和京都基因与基因组百科全书(kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)通路富集分析,两者均以 $P<0.05$ 作为过滤条件。

表1 GEO数据芯片及其平台数据

芯片	平台	样品		年龄		性别(男/女)		样品类型	类别
		POAG	正常	POAG	正常	POAG	正常		
GSE27276	GPL2507	19	17	-	-	-	-	小梁网	训练集
GSE2378	GPL8300	7	6	74.6±9.1	61.8±9.6	3/4	3/3	视乳头	验证集
GSE9944	GPL8300	13	6	74.6±9.8	56.6±13.2	6/7	2/4	视乳头	验证集
GSE9944	GPL571	6	36	58.7±6.6	58.0±10.9	2/4	28/8	视乳头	验证集

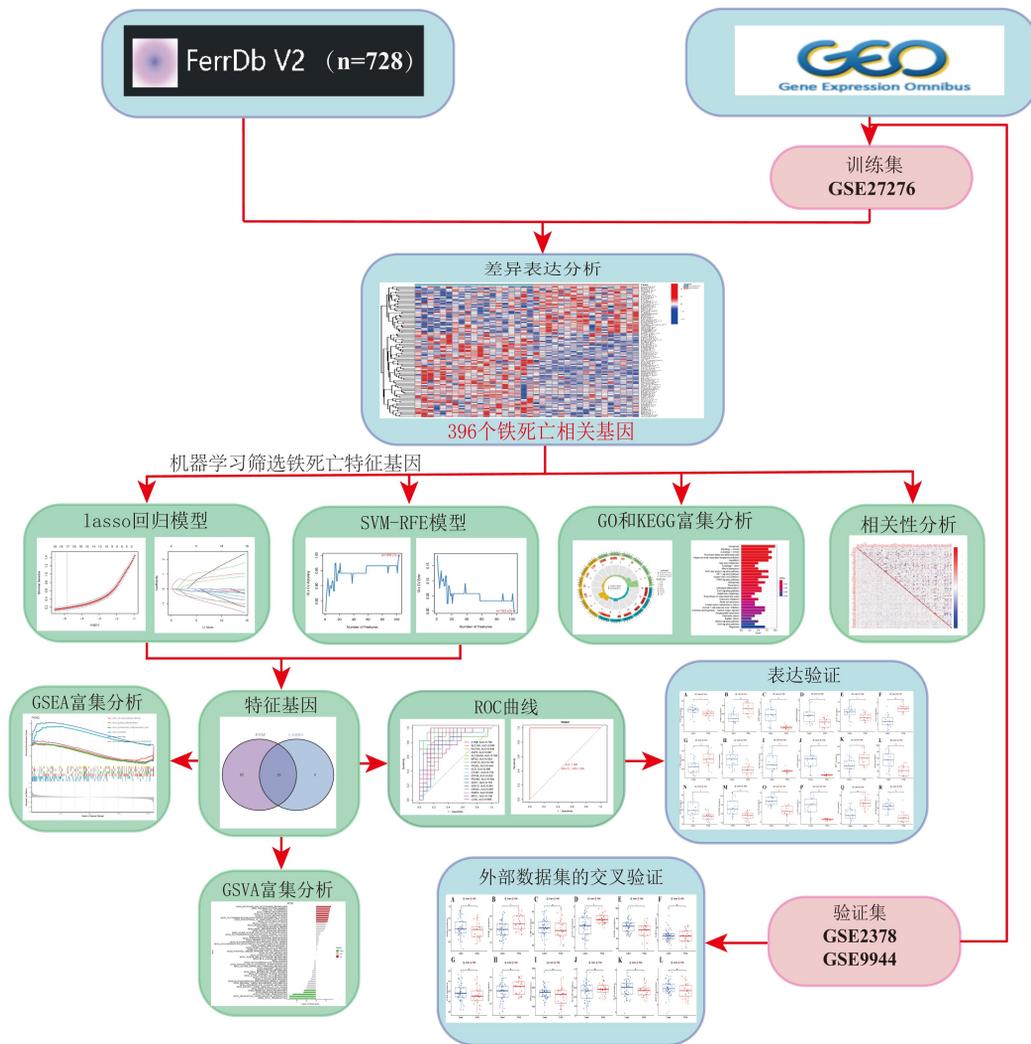


图1 原发性开角型青光眼铁死亡相关基因鉴定的详细流程。

1.2.3 POAG 的最佳特征基因的筛选 通过 glmnet 包中的 LASSO 算法对 DE-FRGs 进行筛选, 鉴定 POAG 的特征基因。同时, 用 SVM 包构建支持向量机-递归特征消除 (SVM-RFE) 模型, 通过其 10 倍交叉验证的平均误判率进行比较, 得到 POAG 的关键基因。将两种模型的筛选结果取交集, 获得最佳特征基因。其诊断能力是通过 ROC 曲线进行判断, 测量曲线下面积 (area under curve, AUC) 可评估特征基因的准确性、敏感性和特异性表达情况。在此基础上, 利用 GLM 包构建了基于关键基因的 Logistic 回归模型, 预测训练数据集中的样本类型, Logistic 回归模型的诊断能力通过 ROC 曲线进行评估。最后, 运用 R 包 ggpubr 将得到的最佳特征基因在 POAG 组和正常组中的表达进行可视化展示。

1.2.4 单基因基因组富集分析 为了进一步探索最佳特征基因的相关途径, 运用 R 中的 enrichplot 包进行单基因基因组富集分析 (gene set enrichment analysis, GSEA)。通过分析训练数据集中所有其他基因与最佳特征基因的相关度, 并根据其相关度的大小进行排序, 排序后的基因则被认为是待检测的基因集。最后, 调用 KEGG 信号通路集作为预定义的基因集, 检测其在基因集中的富集程度。

1.2.5 单基因基因组变异分析 以 KEGG 通路组作为背景

基因组, 使用 gsva、ggpub 和 rlimma 包对 18 个最佳特征基因进行单基因基因组变异分析 (gene set variation analysis, GSEA), 计算其样本的 GSEA 得分差异, 以 $P < 0.05$ 和 $|t| > 2$ 作为差异过滤条件, 获取最佳特征基因在高表达组和低表达组样本的差异情况。若 $t > 0$, 则提示该通路在高表达组中被激活, 反之, 则提示该通路在低表达组中被激活。

1.2.6 最佳特征基因外部数据集的交叉验证 利用 sav 和 limma 包对 3 个数据集的基因进行合并以及重复基因的表达量取均值, 并对整合的数据进行批次矫正, 以相同的筛选标准分析整合的验证数据集中特征基因的表达水平。最后与 GSE27276 训练数据集中最佳特征基因的表达水平进行对比。

2 结果

2.1 差异表达铁死亡相关基因的鉴定及相关性分析 在 728 个铁死亡基因中确定了 396 个 POAG 相关的铁死亡基因, 其中上调基因 39 个, 下调基因 64 个 (表 2)。并绘制 103 个在 POAG 组和正常组之间差异表达 DE-FRGs 的热图 (图 2A)。为了进一步探索上调基因和下调基因之间的相关性, 利用生物信息学的统计学方法进行相关性分析, 结果表明上调基因和下调基因均有较高相关性 (图 2B)。

表2 103个差异表达的铁死亡相关的上调基因和下调基因

基因	调整后 P 值	表达趋势	基因	调整后 P 值	表达趋势	基因	调整后 P 值	表达趋势
CYBB	0.003460956	上调	DCAF7	0.035335	下调	CDKN1A	0.004328	下调
DUOX1	0.013369956	下调	FAR1	0.03254	上调	ACSL3	0.003461	上调
LPCAT3	0.002446793	下调	PHF21A	0.037925	下调	OTUB1	0.008174	下调
TF	0.001506947	下调	SMAD7	0.007378	上调	CD44	0.001926	下调
SLC1A5	8.12×10^{-7}	下调	MTCH1	0.004778	上调	BRD4	0.02251	下调
KEAP1	0.004829011	下调	ACADSB	0.035335	上调	JUN	0.019365	下调
HMOX1	0.001029344	下调	SLC25A28	0.001705	下调	TMBIM4	0.001614	上调
ALOX15B	0.009991436	下调	MFN2	0.000139	下调	PLIN2	0.001507	下调
ULK1	0.038326302	下调	SLC11A2	0.017685	下调	ZFP36	1.33×10^{-6}	下调
GABARAPL2	0.00776953	上调	TGFB1	0.021178	下调	PROM2	2.08×10^{-5}	下调
ATG16L1	0.00217286	下调	LGMN	0.023132	上调	CHMP5	0.008174	上调
WIPI2	0.009357408	下调	IFNA13	0.035335	下调	GCH1	0.009043	下调
ATG13	0.016130998	上调	SNX5	0.008174	下调	FTL	0.037912	上调
SAT1	0.013369956	下调	MICU1	0.021591	下调	HCAR1	0.000397	上调
DPP4	0.025237245	下调	YTHDC2	0.012149	下调	SREBF2	0.048578	上调
SOCS1	0.005985776	下调	IDO1	0.025237	下调	P4HB	0.008533	上调
CDO1	0.029932099	上调	PGRMC1	0.000791	上调	NT5DC2	0.01337	上调
MYB	0.001899071	下调	CIRBP	0.002606	上调	FXN	0.027501	上调
MAPK9	0.032540417	上调	USP11	0.014695	上调	GDF15	0.000101	下调
PRKAA1	0.007068195	下调	NDRG1	0.001097	下调	PRDX1	0.011224	下调
ACVR1B	0.000162137	下调	FADS2	3.71×10^{-7}	上调	AR	0.012149	上调
HILPDA	0.000189251	下调	PIEZO1	0.029932	下调	PARP16	0.03254	下调
HIF1A	0.005380232	下调	ADAM23	0.029932	下调	PDSS2	0.03254	下调
ANO6	0.008173564	上调	TIMP1	0.026439	上调	CREB1	0.000184	上调
LPIN1	0.013369956	上调	KDM6B	0.035335	下调	FABP4	0.001705	下调
TNFAIP3	0.035335223	下调	CFL1	0.01337	上调	SIRT6	0.012149	下调
IDH1	0.029932099	上调	GPX4	0.012149	上调	KDM4A	0.025237	上调
FBXW7	0.027500805	下调	HSPB1	0.03254	下调	MPC1	0.011025	上调
BACH1	0.044189569	上调	RB1	0.016731	下调	SRSF9	0.009991	上调
FADS1	0.005985776	上调	GCLC	0.03254	下调	PROK2	0.001926	下调
USP7	7.22×10^{-5}	下调	SQSTM1	2.68×10^{-5}	下调	LCN2	5.71×10^{-5}	下调
AQP3	4.31×10^{-5}	下调	MUC1	0.008174	下调	MAPKAP1	0.001705	下调
AQP5	7.22×10^{-5}	下调	MT1G	0.016131	上调	GSTM1	0.027501	下调
AEBP2	0.031170344	下调	SCD	5.34×10^{-5}	上调			
PEX2	0.012148695	上调	SRC	0.01337	下调			

2.2 差异基因的 GO 功能富集分析和 KEGG 通路富集分析

DE-FRGs 主要参与对氧化应激的反应、细胞对化学应激的反应、对养分水平的反应、细胞对氧化应激的反应和对金属离子的反应等生物学过程 (biological processes, BP); 主要定位于外膜、细胞器外膜、线粒体外膜、自噬体、自噬体组装位点等细胞成分 (cell component, CC); 主要参与泛素蛋白连接酶结合、泛素样蛋白连接酶结合、血红素结合、双氧化活性和亚铁结合等分子功能 (molecular function, MF) (图 3A, 表 3)。KEGG 富集分析主要集中在铁死亡、线粒体自噬、Kaposi 肉瘤相关疱疹病毒感染、自噬和流体剪切力与动脉粥样硬化等相关信号通路 (图 3B)。

2.3 POAG 最佳特征基因的筛选 在 GSE27276 数据集中运用 LASSO 和 SVM-RFE 两种不同的机器学习算法, 筛选出 POAG 铁死亡相关特征基因。一方面, LASSO 逻辑回归算法筛选出 18 个与 POAG 相关的铁死亡特征基因

(图 4A, B)。另一方面, SVM-RFE 算法确定 103 个 DE-FRGs 均为铁死亡特征基因 (图 4D, E)。LASSO 和 SVM-RFE 模型得到的特征基因取交集处理, 确定了 18 个最佳特征基因 (CYBB、SLC1A5、HILPDA、AQP5、SLC25A28、MFN2、IFNA13、FADS2、SCD、OTUB1、ZFP36、PROM2、GCH1、GDF15、CREB1、FABP4、MPC1 和 LCN2) 进行后续分析 (图 4F)。基于上述 18 个最佳特征基因的 ROC 曲线结果表明, Logistic 回归模型可以区分正常和 POAG 样本, $AUC = 1, 95\% CI: 1.000 \sim 1.000$ (图 4C); 为了区别单个基因的 POAG 样品和正常样本, 生成了 18 个基因的 ROC 曲线, 显示 18 个基因的 AUC 均大于 0.7 (图 4G)。同时 CYBB、FADS2、SCD、CREB1 和 MPC1 在训练集中高表达; SLC1A5、HILPDA、AQP5、SLC25A28、MFN2、IFNA13、OTUB1、ZFP36、PROM2、GCH1、GDF15 和 FABP4 在训练集中低表达 (图 5)。

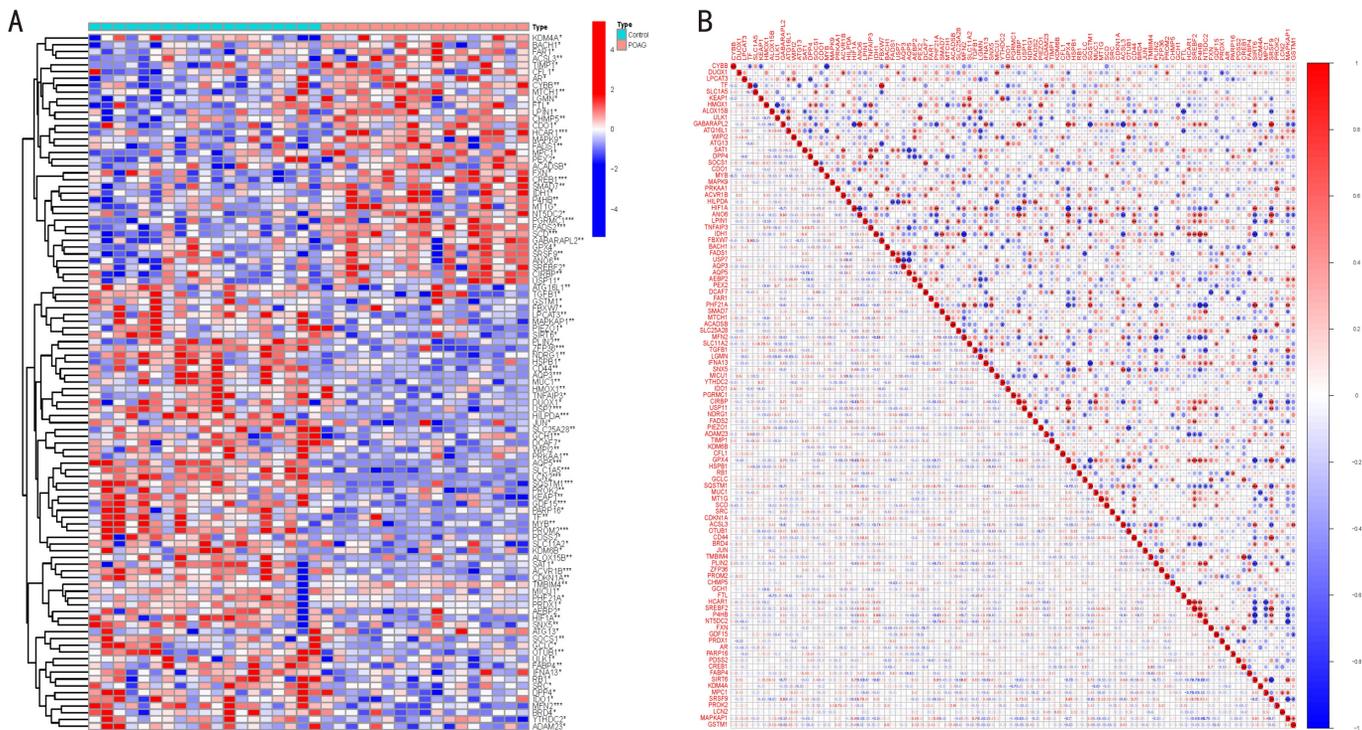


图2 差异表达基因的筛选 A:DE-FRGs 的差异表达图;B:DE-FRGs 的相关性热图。

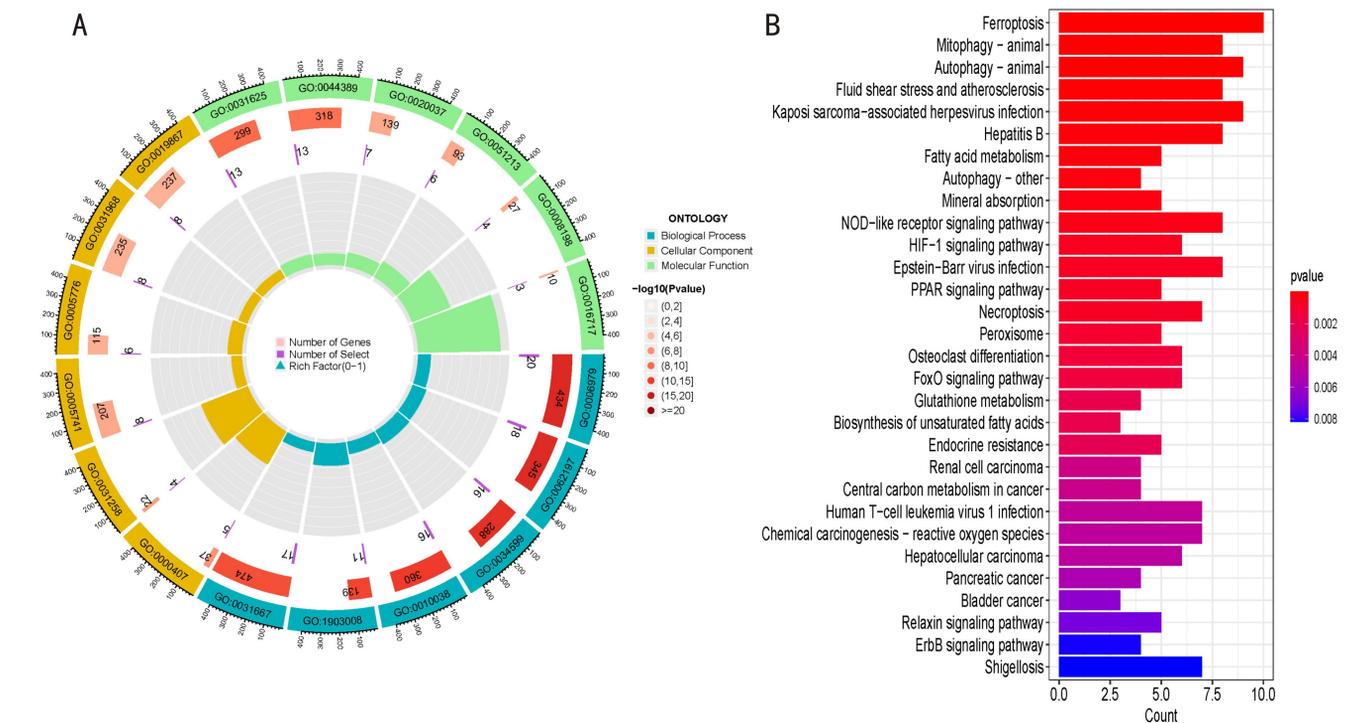


图3 富集分析 A:GO 功能富集分析;B:KEGG 通路富集分析。

2.4 最佳特征基因与各种 POAG 的通路密切相关 通过单基因 GSEA-KEGG 途径分析,旨在找到特征基因区分 POAG 样本和正常样本的潜在通路。提取每个标记基因富集的前 6 条通路(图 6,表 3)。发现这些基因富集在核糖体、氧化磷酸化、血管平滑肌收缩、抗原处理和提呈、溶酶体和各种疾病途径(肥厚型心肌病、系统性红斑狼疮、婴儿利什曼原虫、阿尔茨海默病、亨廷顿病、帕金森病、病毒性心肌炎)。特征基因主要富集在钙离子信号通道和趋化因子信号通路。此外,GDF15、MFN2 和 OTUB1 基因与谷胱甘肽代谢通路密切相关。

根据各特征基因的表达水平结合 GSVA 分析,观察高、低表达组之间的差异性激活途径。MFN2 与 POAG 发病机制有关的各种途径在其高表达组中被富集(图 7A)。如谷胱甘肽代谢、烟酸和烟酰胺代谢、哺乳动物的昼夜节律、核糖核酸聚合酶、类固醇生物合成、N-聚糖的生物合成、糖胺聚糖生物合成-硫酸软骨素、不饱和脂肪酸的生物合成、叶酸生物合成;而低表达组与刺猬信号通路、核黄素代谢、嗅觉转导、神经活性配体-受体相互作用、味觉转导密切相关。OTUB1 在疾病中的低表达可能通过激活谷胱甘肽代谢、Notch 信号通路、三羧酸循环、基础转录因子、

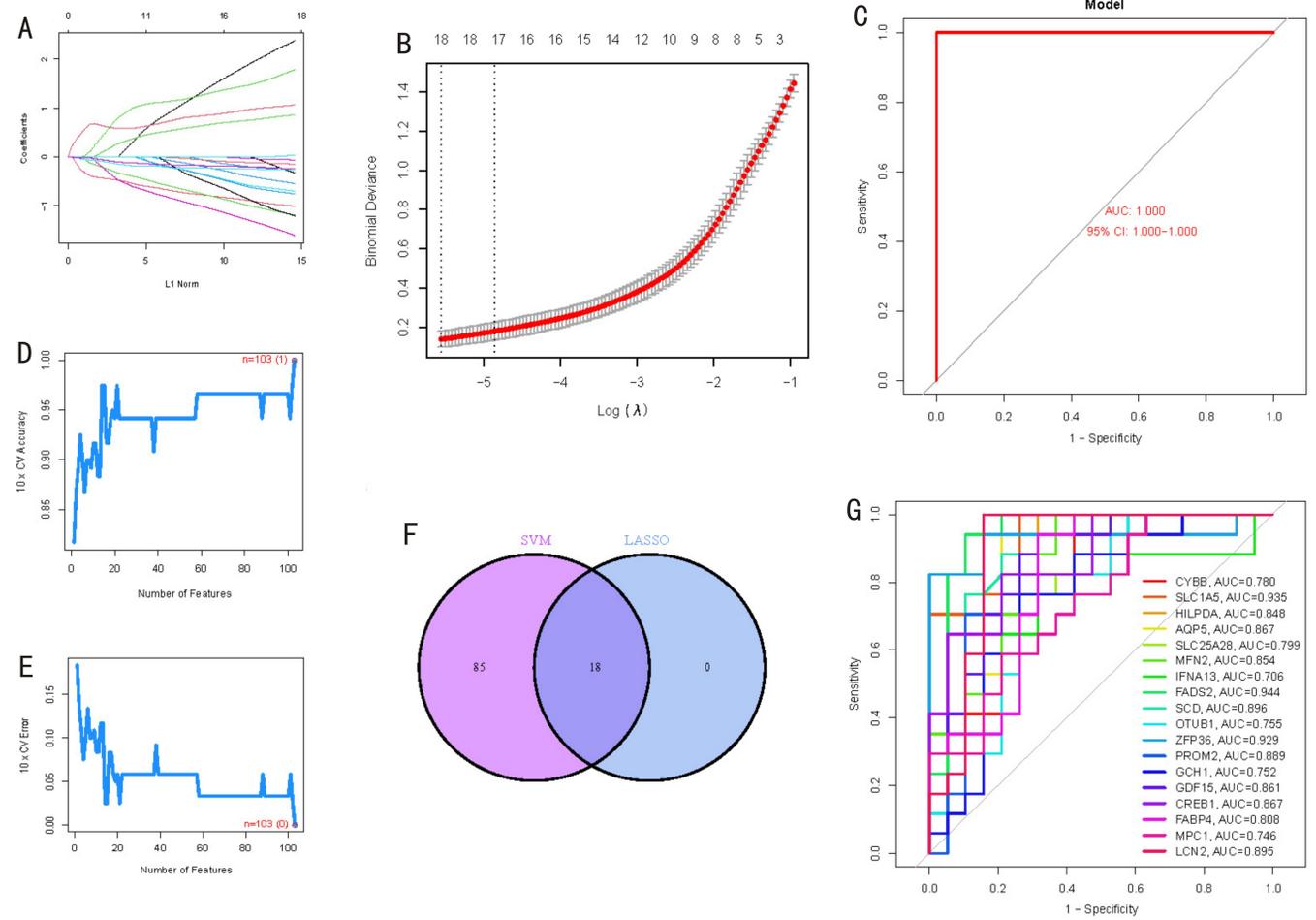


图4 最佳特征基因的筛选 A、B:LASSO 回归模型;C:用于识别疾病样本 AUC 的逻辑回归模型;D、E:SVM-RFE模型;F:LASSO 和 SVM-RFE 模型交集基因的韦恩图;G:18 个标记基因的 ROC 曲线。

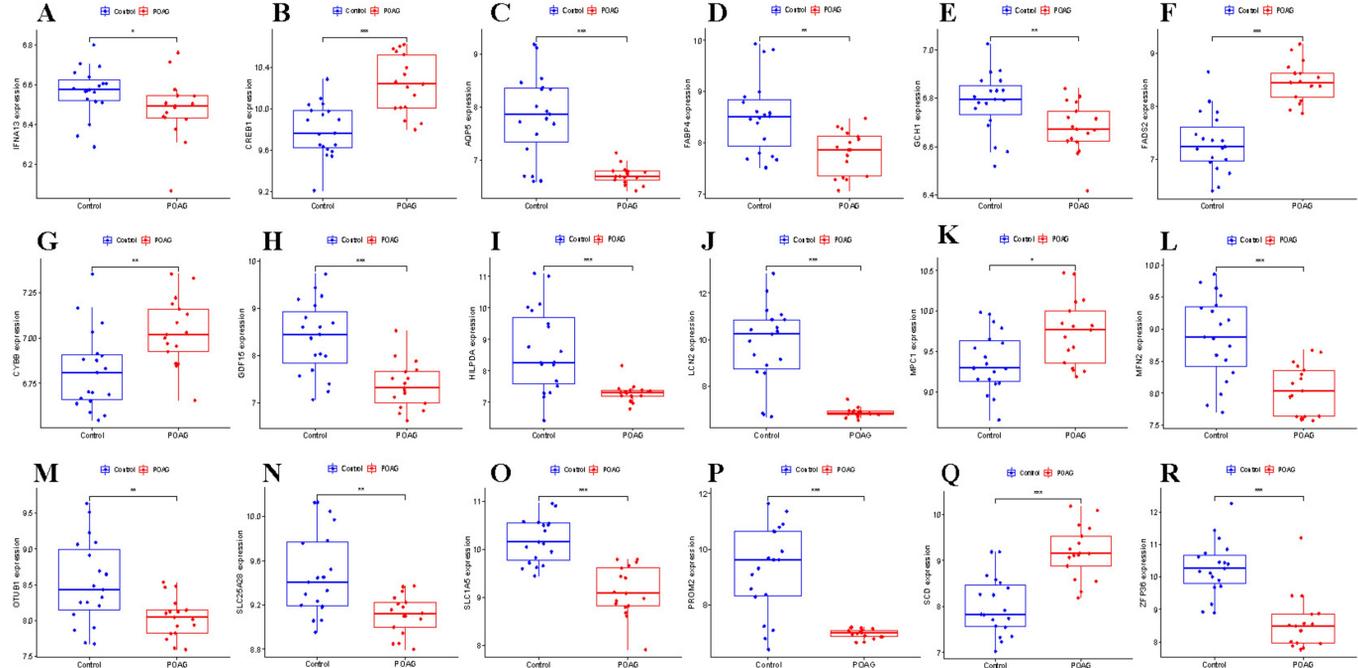


图5 最佳特征基因在训练集的表达水平 A: IFNA13; B: CREB1; C: AQP5; D: FABP4; E: GCH1; F: FADS2; G: CYBB; H: GDF15; I: HILPDA; J: LCN2; K: MPC1; L: MFN2; M: OTUB1; N: SLC25A28; O: SLC1A5; P: PROM2; Q: SCD; R: ZFP36。

不饱和脂肪酸的生物合成、哺乳动物的昼夜节律来诱导 POAG;而 OTUB1 的过表达则激活了肾素-血管紧张素系统、 α -亚油酸代谢、亚油酸代谢、嗅觉转导、抗坏血酸和醛酸代谢、神经活性配体-受体相互作用(图 7B)。

2.5 最佳特征基因的外部数据集的交叉验证 为了进一步验证训练集的可靠性,通过视乳头来源的验证集进行上述 18 个特征基因的表达水平验证,结果显示,POAG 视乳头标本中 CREB1 的表达水平相对于正常样本显著升高,

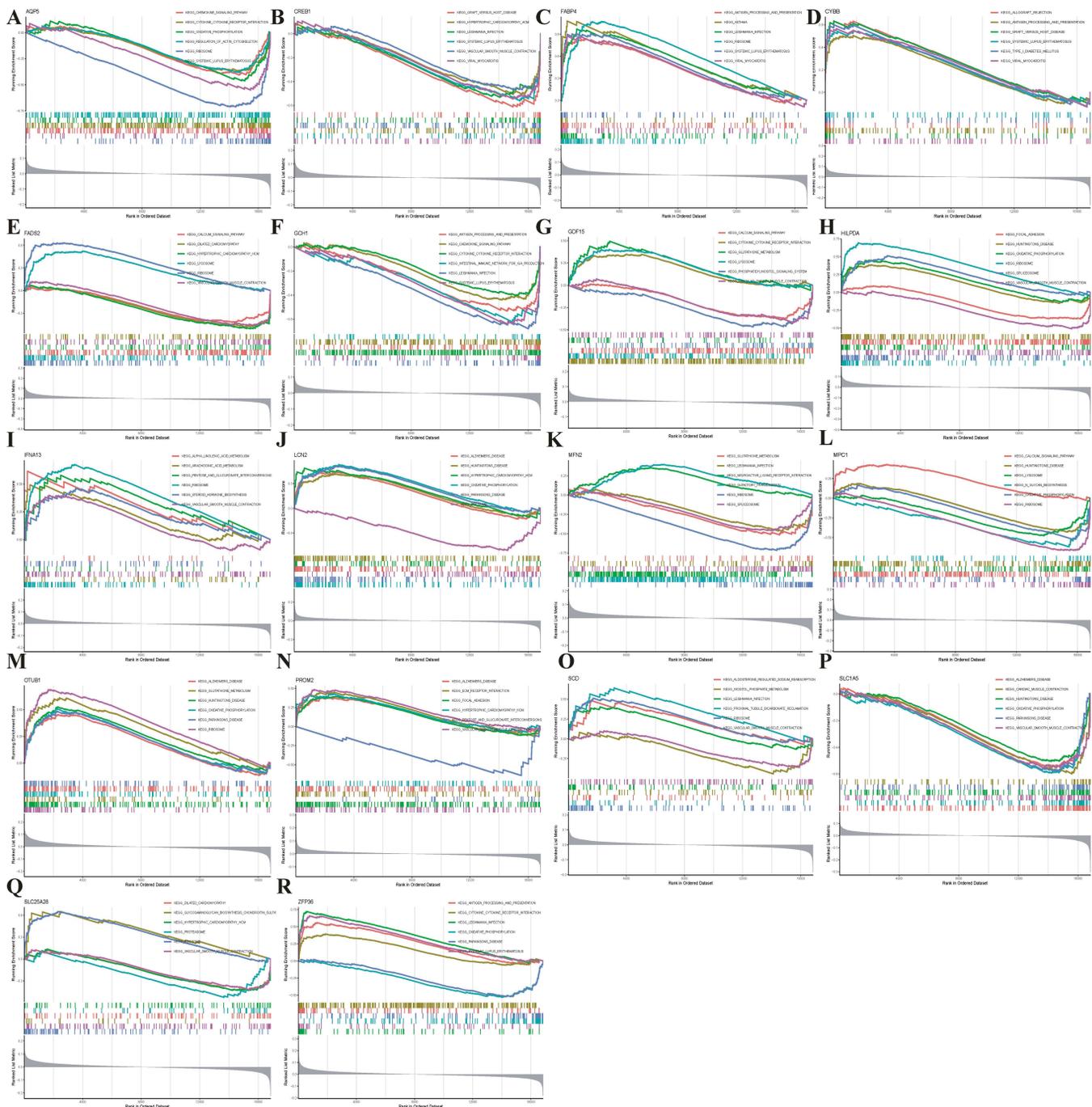


图6 GSEA 富集分析 A: AQP5; B: CREB1; C: FABP4; D: CYBB; E: FADS2; F: GCH1; G: GDF15; H: HILPDA; I: IFNA13; J: LCN2; K: MFN2; L: MPC1; M: OTUB1; N: PROM2; O: SCD; P: SLC1A5; Q: SLC25A28; R: ZFP36。

与GSE27276数据集小梁网样本的表达一致;GCH1和FADS2的表达水平相对于正常样本显著降低,与GSE27276数据集的表达水平却相反;而9个基因包括CYBB、SLC1A5、AQP5、MFN2、SCD、ZFP36、GDF15、FABP4和LCN2则在验证集中表达差异无统计学意义(图8)。

3 讨论

POAG作为一种进行性致盲性眼病,但其发病机制尚不完全清楚。虽然很多研究集中在眼压的作用上,但其他因素,如眼球血流异常、覆膜结构的异常易感性、低颅压、自身免疫和线粒体功能障碍也可能参与^[12]。同时,已经确定多种危险因素可能与POAG的发病有关,例如年龄、眼压升高、家族史等^[13-14]。GO富集分析和KEGG富集分

析结果提示,103个DE-FRGs参与氧化应激的反应和铁死亡相关的通路等。氧化应激影响的主要组织包括小梁网(TM)^[15]和RGC^[16]。在POAG中,过量活性氧的积累可诱发TM损伤,从而导致房水传统流出途径受损^[17],并加剧视乳头和RGC的损伤^[18]。在过去的10a中,越来越多的证据表明铁死亡与青光眼密切相关^[19-21]。蛋白质组学分析^[22]表明,铁死亡参与了N-甲基-d-天冬氨酸(N-Methyl-D-aspartic acid, NMDA)诱导的雄性Sprague-Dawley大鼠视网膜和视神经细胞死亡,并且发现ACSL3(Q63151)和Prnp(P13852)蛋白在NMDA损伤的视网膜中上调并与铁死亡有关。有实验研究证实^[23],在高眼压的青光眼模型中,使用去铁酮(一种铁螯合剂)干预9wk后,视神经损失减少的RGC数量显著增加,这表明铁螯合

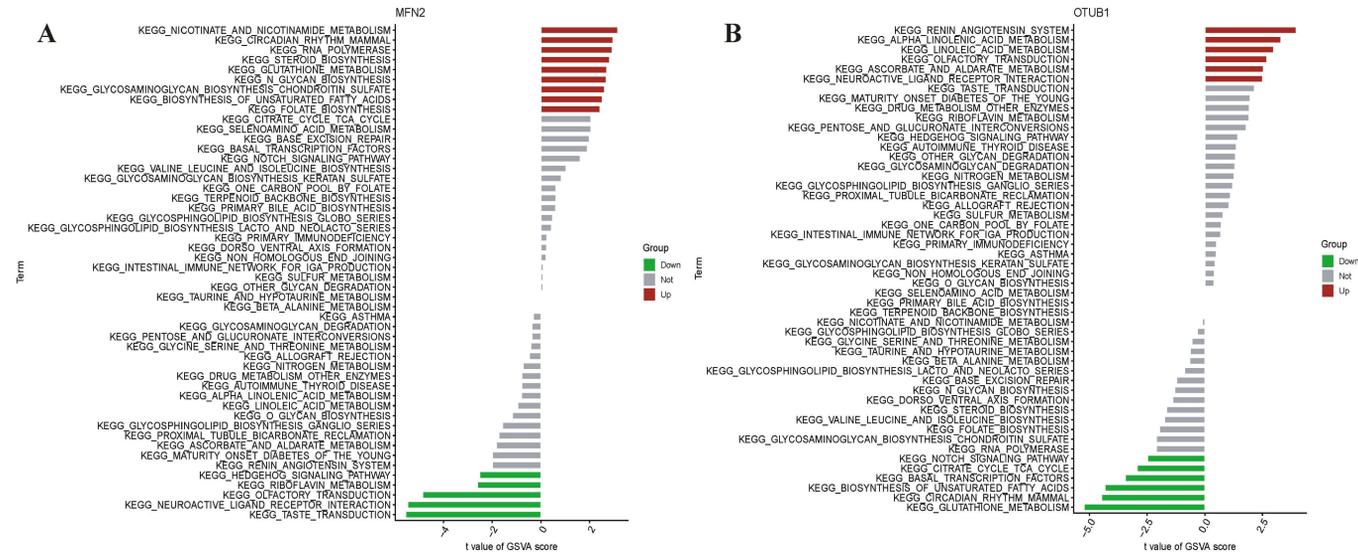


图7 GSEA富集分析 A: MFN2; B: OTUB1。

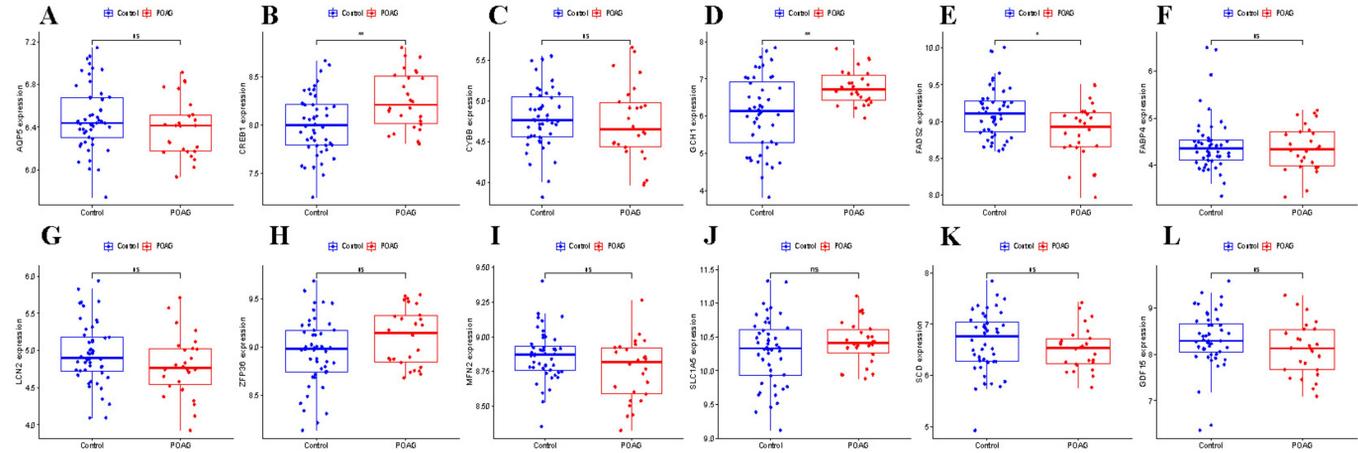


图8 最佳特征基因外部数据集的交叉验证 A: AQP5; B: CREB1; C: CYBB; D: GCH1; E: FADS2; F: FABP4; G: LCN2; H: ZFP36; I: MFN2; J: SLC1A5; K: SCD; L: GDF15。

表3 GO功能富集分析BP、CC和MF排名前6通路

通路类别	ID号	通路名称	基因数
BP	GO:0006979	对氧化应激的反应	20
BP	GO:0062197	细胞对化学应激的反应	18
BP	GO:0031667	对养分水平的反应	17
BP	GO:0034599	细胞对氧化应激的反应	16
BP	GO:0010038	对金属离子的反应	16
BP	GO:1903008	细胞器分解	11
CC	GO:0019867	外膜	8
CC	GO:0031968	细胞器外膜	8
CC	GO:0005741	线粒体外膜	8
CC	GO:0005776	自噬体	6
CC	GO:0000407	自噬体组装位点	5
CC	GO:0031258	板状伪足膜	4
MF	GO:0031625	泛素蛋白连接酶结合	13
MF	GO:0044389	泛素样蛋白连接酶结合	13
MF	GO:0020037	血红素结合	7
MF	GO:0051213	双氧化活性	6
MF	GO:0008198	亚铁结合	4
MF	GO:0016717	氧化还原酶活性	3

对青光眼具有潜在的保护作用。以上研究均表明铁死亡参与了POAG发生的重要环节。

本研究共筛选出CYBB、SLC1A5、HILPDA、AQP5、SLC25A28、MFN2、IFNA13、FADS2、SCD、OTUB1、ZFP36、PROM2、GCH1、GDF15、CREB1、FABP4、MPC1和LCN2 18个与铁死亡有关的特征基因。18个基因的ROC曲线下面积所代表的AUC值均大于0.7,说明这18个基因对于区分POAG样本和正常样本有一定的准确性和特异性。在铁死亡中已经确定谷胱甘肽过氧化物酶-4-谷胱甘肽(glutathione peroxidase 4, GPX-4-GSH)作为主流途径,而谷胱甘肽代谢通路是GPX-4-GSH途径的重要机制之一^[24]。GSEA分析的结果提示GDF15、MFN2和OTUB1基因均与谷胱甘肽代谢通路密切相关。GDF15是TGF-β超家族的成员^[25],先前已被证实是在视神经轴索损伤后视网膜膜中表达上调^[26],而后被检测到房水(aqueous humor, AH)的GDF15表达增加^[27],AH中的GDF15则来源于视网膜神经节细胞层(GCL),认为GCL分泌到AH中的GDF15可能是青光眼性神经变性的可量化指标。MFN2位于1号染色体短臂1p36.22位置上,编码一种线粒体膜蛋白,参与线粒体的聚集和融合,并有助于线粒体网络的

维持和运行^[28]。有研究基于多标记单倍型的关联检验证实了 POAG 与 MFN2 的关联^[29]。MFN2 的 GSAV 分析也证实在高表达组,谷胱甘肽代谢通路被激活。OTUB1 以其去泛素化的特性,首先被确定为 OTU 家族的核心成员^[30],位于人染色体 11q13.1 上,其基因产物是由 271 个氨基酸组成的蛋白质,OTUB1 蛋白的大小为 31kDa,是由一组保守的半胱氨酸、组氨酸、天冬氨酸残基组成的半胱氨酸蛋白酶^[31-33]。目前对该基因的研究主要集中在免疫和癌症等疾病方面^[34],其在 POAG 中的作用尚待进一步研究。OTUB1 的 GSVA 分析发现,谷胱甘肽代谢通路在低表达组中高度表达,这可能是身体对疾病的一种保护机制,控制疾病的继续发展。

在 POAG 的发生发展过程中,早期多为小梁网组织变化,中后期多为视乳头改变及其神经节细胞凋亡,伴随神经纤维层丢失。故将小梁网组织作为训练集,借助视乳头样本进行外部数据集的交叉验证,一则可增加最佳特征基因的局部特异性,二则能有效识别出贯穿于 POAG 的疾病发生发展全过程的潜在生物标志物。外部数据集交叉验证的结果显示,POAG 视乳头标本中 CREB1 的表达水平相对于正常样本显著升高,在训练集(GSE27276 小梁网样本数据集)与验证集(GSE2378、GSE9944 视乳头样本数据集)的表达一致,并且该基因先前均已在视神经相关疾病或铁死亡方面有报道。CREB1 也称为 CREB,该转录调节因子响应有害应激(如缺氧和氧化应激)而被激活,并参与细胞对这些应激的防御^[35],并促进神经元存活^[36]。有研究表明 CREB1 是青光眼最重要的上游调节因子^[37],在 POAG 的发病机制中存在潜在的关键保护作用^[38]。Guo 等^[39]从在分子水平上,已经确定 CREB 是钙离子-钙调蛋白依赖性蛋白激酶 II (calcium-cam-dependent protein kinase II, CaMK II) 的关键下游效应子,当 RGC 受到兴奋性毒性或视神经损伤时,CREB 的转录活性急剧下降,CaMK II 再激活可以挽救受损的 CREB 活性,并且 CREB 活性对于 CaMK II 介导的 RGC 起到充分保护,从而证实介导兴奋性毒性和在视神经损伤模型中起到 RGC 的保护作用。

综上所述,本研究基于生物信息学挖掘构建了 POAG 中铁死亡相关差异基因的模式,运用两种机器学习的模型和外部数据集交叉验证,筛选出 CREB1 表达一致的最佳疾病特征基因作为潜在的诊断生物标志物,为研究 POAG 在铁死亡方面的发病机制和治疗方法提供了新见解。但仍存在一定的局限性,主要体现在以下几个方面:(1) 虽然本研究增加了外部数据集的交叉验证,但样本数量特别有限,尤其是训练集中同一样本来源的数据集;(2) 缺乏进一步的体内外实验来验证 POAG 铁死亡相关特征基因的诊断价值及作用机制,后续将从分子生物学和临床试验等角度解决偏倚结果和结论方面可能存在的局限性。

参考文献

- 中华医学会眼科学分会青光眼学组,中国医师协会眼科医师分会青光眼学组. 中国青光眼指南(2020年). 中华眼科杂志 2020; 56(8):573-586
- 吴艳,杨璐. 原发性开角型青光眼诊断的研究现状. 国际眼科杂志 2021;21(9):1552-1556
- 颀娟娟,陈颖,张国伟,等. 一个中国原发性开角型青光眼家系致

- 病基因研究. 国际眼科杂志 2023;23(1):175-180
- 4 Wang Z, Wiggs JL, Aung T, et al. The genetic basis for adult onset glaucoma: Recent advances and future directions. *Prog Retin Eye Res* 2022;90:101066
- 5 Xie L, Mao M, Wang C, et al. Potential Biomarkers for Primary Open-Angle Glaucoma Identified by Long Noncoding RNA Profiling in the Aqueous Humor. *Am J Pathol* 2019;189(4):739-752
- 6 Hadian K, Stockwell BR. SnapShot: ferroptosis. *Cell* 2020;181(5):1188-1188. e1
- 7 Yang M, So KF, Lam WC, et al. Ferroptosis and glaucoma: implications in retinal ganglion cell damage and optic nerve survival. *Neural Regen Res* 2023;18(3):545-546
- 8 Cao JY, Dixon SJ. Mechanisms of ferroptosis. *Cell Mol Life Sci* 2016; 73(11-12):2195-2209
- 9 Liu YT, Allingham RR, Qin XJ, et al. Gene expression profile in human trabecular meshwork from patients with primary open-angle glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2013;54(9):6382-6389
- 10 Lukas TJ, Miao HX, Chen L, et al. Susceptibility to glaucoma: differential comparison of the astrocyte transcriptome from glaucomatous African American and Caucasian American donors. *Genome Biol* 2008; 9(7):R111
- 11 Nikolskaya T, Nikolsky Y, Serebryskaya T, et al. Network analysis of human glaucomatous optic nerve head astrocytes. *BMC Med Genomics* 2009;2:24
- 12 Quigley HA. Glaucoma. *Lancet* 2011;377(9774):1367-1377
- 13 Kreft D, Doblhammer G, Guthoff RF, et al. Prevalence, incidence, and risk factors of primary open-angle glaucoma - a cohort study based on longitudinal data from a German public health insurance. *BMC Public Health* 2019;19(1):851
- 14 Torabi R, Harris A, Siesky B, et al. Prevalence rates and risk factors for primary open angle glaucoma in the middle east. *J Ophthalmic Vis Res* 2021;16(4):644-656
- 15 Izzotti A, Bagnis A, Saccà SC. The role of oxidative stress in glaucoma. *Mutat Res Mutat Res* 2006;612(2):105-114
- 16 Zanon-Moreno V, Marco-Ventura P, Lleo-Perez A, et al. Oxidative stress in primary open-angle glaucoma. *J Glaucoma* 2008; 17(4):263-268
- 17 Vernazza S, Tirendi S, Bassi AM, et al. Neuroinflammation in primary open-angle glaucoma. *J Clin Med* 2020;9(10):3172
- 18 Tezel G. Oxidative stress in glaucomatous neurodegeneration: mechanisms and consequences. *Prog Retin Eye Res* 2006; 25(5):490-513
- 19 Lin SC, Wang SY, Yoo C, et al. Association between serum ferritin and glaucoma in the South Korean population. *JAMA Ophthalmol* 2014; 132(12):1414-1420
- 20 Sakai O, Uchida T, Roggia MF, et al. Role of glutathione peroxidase 4 in glutamate-induced oxytosis in the retina. *PLoS One* 2015; 10(6):e0130467
- 21 Siu AW, Shan SW, Li KK, et al. Glutathione attenuates nitric oxide-induced retinal lipid and protein changes. *Ophthalmic Physiol Opt* 2015; 35(2):135-146
- 22 Suo LG, Dai WW, Chen XH, et al. Proteomics analysis of N-methyl-d-aspartate-induced cell death in retinal and optic nerves. *J Proteomics* 2022;252:104427
- 23 Cui QN, Bargoud AR, Ross AG, et al. Oral administration of the iron

chelator deferiprone protects against loss of retinal ganglion cells in a mouse model of glaucoma. *Exp Eye Res* 2020;193:107961

24 Ge C, Zhang SJ, Mu HW, *et al.* Emerging mechanisms and disease implications of ferroptosis: potential applications of natural products. *Front Cell Dev Biol* 2021;9:774957

25 Wischhusen J, Melero I, Fridman WH. Growth/differentiation factor-15 (GDF-15): from biomarker to novel targetable immune checkpoint. *Front Immunol* 2020;11:951

26 Charalambous P, Wang XL, Thanos S, *et al.* Regulation and effects of GDF-15 in the retina following optic nerve crush. *Cell Tissue Res* 2013;353(1):1-8

27 Ban N, Siegfried CJ, Lin JB, *et al.* GDF15 is elevated in mice following retinal ganglion cell death and in glaucoma patients. *JCI Insight* 2017;2(9):e91455

28 Cao YL, Meng SX, Chen Y, *et al.* MFN₁ structures reveal nucleotide-triggered dimerization critical for mitochondrial fusion. *Nature* 2017;542(7641):372-376

29 Wolf C, Gramer E, Müller - Myhsok B, *et al.* Mitochondrial haplogroup U is associated with a reduced risk to develop exfoliation glaucoma in the German population. *BMC Genet* 2010;11:8

30 Wiener R, Zhang XB, Wang T, *et al.* The mechanism of OTUB1-mediated inhibition of ubiquitination. *Nature* 2012;483(7391):618-622

31 Makarova KS, Aravind L, Koonin EV. A novel superfamily of

predicted cysteine proteases from eukaryotes, viruses and chlamydia pneumoniae. *Trends Biochem Sci* 2000;25(2):50-52

32 Balakirev MY, Tcherniuk SO, Jaquinod M, *et al.* Otubains: a new family of cysteine proteases in the ubiquitin pathway. *EMBO Rep* 2003;4(5):517-522

33 段菲, 张金玉, 乔树, 等. OTUB1 在肿瘤中的研究进展. *癌症进展* 2017;15(12):1392-1395, 1448

34 Liao YH, Yang MY, Wang KK, *et al.* Deubiquitinating enzyme OTUB1 in immunity and cancer: good player or bad actor? *Cancer Lett* 2022;526:248-258

35 Lonze BE, Ginty DD. Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system. *Neuron* 2002; 35(4):605-623

36 Walton M, Woodgate AM, Muravlev A, *et al.* CREB phosphorylation promotes nerve cell survival. *J Neurochem* 1999;73(5):1836-1842

37 Yasuda M, Tanaka Y, Omodaka K, *et al.* Transcriptome profiling of the rat retina after optic nerve transection. *Sci Rep* 2016;6:28736

38 Colak D, Morales J, Bosley TM, *et al.* Genome-wide expression profiling of patients with primary open angle glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2012;53(9):5899-5904

39 Guo XZ, Zhou J, Starr C, *et al.* Preservation of vision after CaMKII-mediated protection of retinal ganglion cells. *Cell* 2021;184(16):4299-4314. e12