

基于 KEGG 通路和基因互作网络对充血性心力衰竭相关基因的筛选

姜洋, 马彩艳, 郑菊萍, 许琳, 盛洋(浙江省立同德医院, 杭州 310012)

摘要: 目的 筛选与充血性心力衰竭(congestive heart failure, CHF)相关的药物靶点基因, 利用 DAVID 通路数据库和基因互作网络分析目标基因的分布和功能, 促进 CHF 的研究和新药的开发。方法 以“congestive heart failure”检索 NCBI 基因数据库, 提取 CHF 相关基因数据, 采用 DAVID 分析工具提取基因富集的通路数据。对 40 个非冗余基因所显著富集的 11 条 KEGG 通路进行了分析, 同时对富集通路中的基因同 HPRD 人类蛋白互作网络进行匹配, 建立通路中关键基因的互作网络。并对所建立的相关子网进行比较, 筛选和 CHF 相关的药物靶点基因。结果 MMP9、LMNA、DMD、EMD、AGTR1、EDNRB、NOS3 和 TNF 等 21 个 CHF 相关基因需要完善研究, LMNA、MMP9 和 AR 3 个基因可能是 CHF 治疗药物间接作用的重要靶点。结论 CHF 发病与 cGMP-PKG 信号通路、钙离子信号通路、扩张型心肌病、肥厚型心肌病等多个通路相关。MMP9、LMNA、DMD、EMD、AGTR1、EDNRB、NOS3 和 TNF 等 21 个 CHF 相关基因在病理和治疗中都占有重要的地位。通过分析疾病相关基因的代谢通路和互作网络, 有助于了解疾病的分子基础, 并为新药研发提供可借鉴的思路。

关键词: 充血性心力衰竭; 基因互作网络; KEGG 通路; 药物靶点

中图分类号: R965.2 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2019)09-1059-08

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2019.09.006

引用本文: 姜洋, 马彩艳, 郑菊萍, 等. 基于 KEGG 通路和基因互作网络对充血性心力衰竭相关基因的筛选[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(9): 1059-1066.

Screen of Target Genes for Congestive Heart Failure Based on KEGG Pathway and Gene Interaction Network

JIANG Yang, MA Caiyan, ZHENG Juping, XU Lin, SHENG Yang(Tongde Hospital of Zhejiang Province, Hangzhou 310012, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE Screening genes associated with heart failure, using the DAVID pathway database and gene network to analyze the distribution and function of the target genes, to promote the research of congestive heart failure and development of new medicine. **METHODS** “Congestive heart failure” was used to retrieve the gene data from NCBI database. Extraction of gene enriched pathway data by used DAVID analysis tool. Analyses were made on 11 KEGG pathways enriched by 40 non redundant genes, while genes in enrichment pathways were matched with HPRD protein interaction networks at the same time. Constructed a network with the key genes in the pathway. And made comparisons between the subnetworks to screen the target genes related to congestive heart failure(CHF). **RESULTS** Twenty-one genes(MMP9, LMNA, DMD, EMD, AGTR1, EDNRB, NOS3 and TNF, et al) were claimed for further research. LMNA, MMP9 and AR three genes might be the important drug targets for the indirect action of CHF therapeutic drugs. **CONCLUSION** The pathogenesis of CHF is associated with multiple pathways such as cGMP-PKG signaling pathway, calcium signaling pathway, dilated cardiomyopathy pathway, hypertrophic cardiomyopathy pathway and so on. Twenty-one genes(MMP9, LMNA, DMD, EMD, AGTR1, EDNRB, NOS3 and TNF, et al) play important roles in CHF pathophysiology and treatment. Through gene interaction network and pathway analysis of disease associated genes, which can help to understand the molecular basis of diseases and provide a reference for new drug research and development.

KEYWORDS: congestive heart failure; gene interaction network; KEGG pathway; drug target

充血性心力衰竭(congestive heart failure, CHF)是指心脏当时不能搏出同静脉回流及身体组织代谢所需相称的血液供应。往往由各种疾病引起心肌收缩能力减弱,从而使心脏的血液输出量减少,不足以满足机体的需要,并由此产生一系列症状和体征^[1]。心瓣膜疾病、冠状动脉硬化、高血压、内分泌疾患、细菌毒素、急性肺梗死、肺气肿或其他慢性肺脏疾患等均可引起心脏病而产生 CHF 的表

现。CHF 会反复发作,究其原因主要是其病理机制不清,很难找到合适的药物靶点进行针对性的靶向治疗。本研究结合 KEGG 通路和基因互作网络进行融合分析,对 CHF 可能的药物靶点进行识别。

1 研究方法

1.1 检索获取 CHF 相关基因

以“congestive heart failure”检索美国国立生物技术信息中心(National Center for Biotechnology

基金项目: 浙江省医学会临床科研资金项目(2016ZYC-A08); 浙江省基础公益研究计划项目(LGF18H020010)

作者简介: 姜洋, 男, 工程师 Tel: (0571)89975971 E-mail: jybackup@163.com

Information, NCBI)基因数据库, 检索得到 66 个与 CHF 相关的基因。

1.2 采用 DAVID 分析工具对 CHF 相关通路进行分析

KEGG 数据库是一个联系基因组信息和功能信息的知识库, 其子数据库 pathway 汇集了分子交互作用及其反应网络人工通路图^[2]。DAVID 是一个在线功能注释系统, 包括: 基因功能注释、通路注释等。网址为 <http://david.abcc.ncifcrf.gov/>。利用该工具分析通路可以直观观测到查询基因所富集的通路信息、富集通路所含的基因及相应的蛋白信息, 若分析和某一疾病相关的重要通路, 则可根据阈值 $P(P<0.05)$ 确定重要的通路来进行重点分析, 有助于了解疾病的分子基础, 并为新药研发提供可借鉴的思路。

1.3 DAVID 操作过程

本研究针对 66 个 CHF 相关基因进行通路相关路径分析, 具体过程如下, 步骤 1: 进入 function annotation 分析工具, 输入待分析基因 66 个; 步骤 2: 在 “enter gene list” 中输入待分析基因 66 个; 步骤 3: 在 “select identifier” 中选择 “ENTREZ_GENE_ID”; 步骤 4: 在 “list type” 选项中选择 “gene list”; 步骤 5: 提交 “submit list”。

1.4 显著富集通路中基因的互作网络分析

针对在多个富集通路中出现的基因, 结合 HPRD 数据库中人类蛋白互作数据, 建立富集通路中基因的互作网络和 CHF 治疗药物的药物靶点基因网络。网络中节点的度直接反映了该节点对于网络的重要性, 处于网络中心的基因节点往往是比较重要的节点, 可能和疾病存在一定关联。对药物靶点基因网络和富集通路的基因网络进行匹配, 识别共有的网络交集。网络交集节点基因可能是调控 CHF 致病基因的关键基因。

1.5 CHF 常见治疗药物的药物靶标网络分析

CHF 的治疗用药主要包括 β 受体阻滞剂、利尿剂、醛固酮受体拮抗剂、血管紧张素转换酶抑制剂等, 见表 1。本研究以倍他乐克、双氢克尿塞、螺内酯、卡托普利 4 种药物为研究对象, 挖掘这些药物作用的靶受体和其他人类蛋白的相互作用关系, 进而识别网络中高节点度的蛋白, 其可能参与调控 CHF 相关通路的众多靶标, 对 CHF 的发生可能起至关重要的作用。

表 1 充血性心力衰竭常见治疗药物

Tab. 1 Common drugs of congestive heart failure

β 受体阻滞剂 (倍他乐克)	利尿剂 (双氢克尿塞)	醛固酮受体 拮抗剂(螺内酯)	血管紧张素转换酶 抑制剂(卡托普利)
DB00264	DB00999	DB00421	DB01197
P10635(1565)	P55017(6559)	P08235(4306)	P12821 (1636)
P33261(1557)	P00915(759)	P10275(367)	P08253(4313)
O15244(6582)	P00918(760)	P06401(5241)	P14780(4318)
P08183(5243)	P22748(762)	P04150(2908)	P09960(4048)
	Q16790(768)	P19099(1585)	P46663(623)
	O43570(771)	P04278(6462)	P10635(1565)
	Q12791(3778)	Q06432(786)	P02768(213)
	Q4U2R8(9356)	O75469(8856)	P08183(5243)
		P10632(1558)	P46059(6564)
		P15538(1584)	Q4U2R8(9356)
		Q92887(1244)	
		P08183(5243)	
		P46721(6579)	

2 结果与分析

2.1 DAVID 通路分析

利用 DAVID 分析工具对 66 个 CHF 相关基因的 KEGG 路径进行分析, 结果得到 50 个基因富集在 28 条通路上。对其中富集最显著的 11 条通路进行分析, 发现共有 40 个非冗余基因被注释到该 11 条通路上。其中, 出现频率 ≥ 3 次的基因共有 21 个, 见表 2。

表 2 11 条通路中出现频率 ≥ 3 次的基因

Tab. 2 A gene that occurs ≥ 3 times in the 11 pathway

基因出现频率/次	基因 ID
≥ 3	186 1636 1756 2010 3304 3605 4000 4318 5139 7133 1910 4846 5350 1909 185 154 3606 112 153 3569 7124
≥ 5	4846 5350 1909 185 154 3606 112 153 3569 7124
≥ 10	112 153 3569 7124

显著富集的 11 条通路分别如下: hsa04022 为 cGMP-PKG signaling pathway; hsa05200 为 Pathways in cancer; hsa04020 为 Calcium signaling pathway; hsa04060 为 Cytokine-cytokine receptor interaction; hsa04924 为 Renin secretion; hsa05414 为 Dilated cardiomyopathy; hsa04261 为 Adrenergic signaling in cardiomyocytes; hsa05410 为 Hypertrophic cardiomyopathy(HCM); hsa04668 为 TNF signaling pathway; hsa04024 为 cAMP signaling pathway; hsa04080 为 Neuroactive ligand-receptor interaction。以下以其中几条通路为例进行说明。

2.1.1 cGMP-PKG 信号通路 共有 9 个基因 ADCY6(112)、ADRB1(153)、ADRB2(154)、AGTR1(185)、EDNRA(1909)、EDNRB(1910)、

NOS3(4846)、PDE3A(5139)、PLN(5350)参与了此通路, 见图 1。

近来有文献表明激活 PKG 会影响心肌肥大、舒张和硬化。尤其是在心血管中表达的 PKGI 对心肌肥厚和重塑作负性调节起关键作用。心肌细胞的粗肌丝是诱发心肌被动张力和硬化的决定因素, 可通过磷酸化作用来调节^[3]。Fiedler 等^[4]在培养的心肌细胞中首先证实 PKG 通过抑制 L 型钙离子通道使钙调磷酸酶失活, 同时钝化了肥大反应。这种磷酸化作用可以减少以粗肌丝为基础的被动张力, 未来可作为一种潜在的减少心肌硬化的治疗方案。

2.1.2 钙离子(Ca^{2+})信号通路 共有 7 个基因 ADRB1(153)、ADRB2(154)、AGTR1(185)、EDNRA(1909)、EDNRB(1910)、NOS3(4846)、PLN(5350)参与了此通路, 见图 2。

无论何种病因引起的 CHF, 其共同病理特征均有钙稳态失调和心肌收缩舒张功能障碍。正常情况下, 细胞内钙稳态通过细胞膜和肌浆网 2 个 Ca^{2+} 循环来维持, 胞膜存在 3 种钙转运系统: 电压依赖性钙通道(L 型为主)、钠 G 钙交换体(NCX)及

钙泵(PMCA); 肌浆网通过肌浆网钙释放通道(主要为兰尼碱受体 RyR2)、肌浆网钙泵(SERCA2A)及肌浆网腔内钙结合蛋白进行钙转运。上述 Ca^{2+} 蛋白在心脏的收缩功能中起到了核心作用, 一旦这些 Ca^{2+} 蛋白有所异常, 就很可能导致心肌浆网功能失调, 进而导致 CHF。心肌细胞至少有 5 种类型的 Ca^{2+} 电流: 3 种表达于细胞膜表面, L 型 Ca^{2+} 电流(IL-Ca), T 型 Ca^{2+} 电流(IT-Ca)和可透过 Na^{+} 的 Ca^{2+} 电流(ICaTTX)^[5]。另 2 种作用于细胞亚膜受体的通道电流, 即肌质网(sarcoplasmic reticulum, SR)上兰尼丁受体(ryanodine receptors, RyRs) Ca^{2+} 释放通道和 1,4,5-三磷酸肌醇(inositol 1,4,5-trisphosphate, IP3)受体 Ca^{2+} 释放通道。其中 IL-Ca 和 IT-Ca 在正常心律和心律失常中起着显著而关键的作用。在生理上, 心肌的任何电活动都会影响其力学过程, 这个力学过程是由 Ca^{2+} 介导的细胞膜去极化和细胞内钙信号传导过程所控制的。其本质是 2 种 Ca^{2+} 通道之间的通信, 即位于细胞膜上的电压依赖性 L 型 Ca^{2+} 通道和位于胞内肌质网上的 RyRs Ca^{2+} 释放通道, 钙活化作用被认为是这种兴奋-收缩耦联的

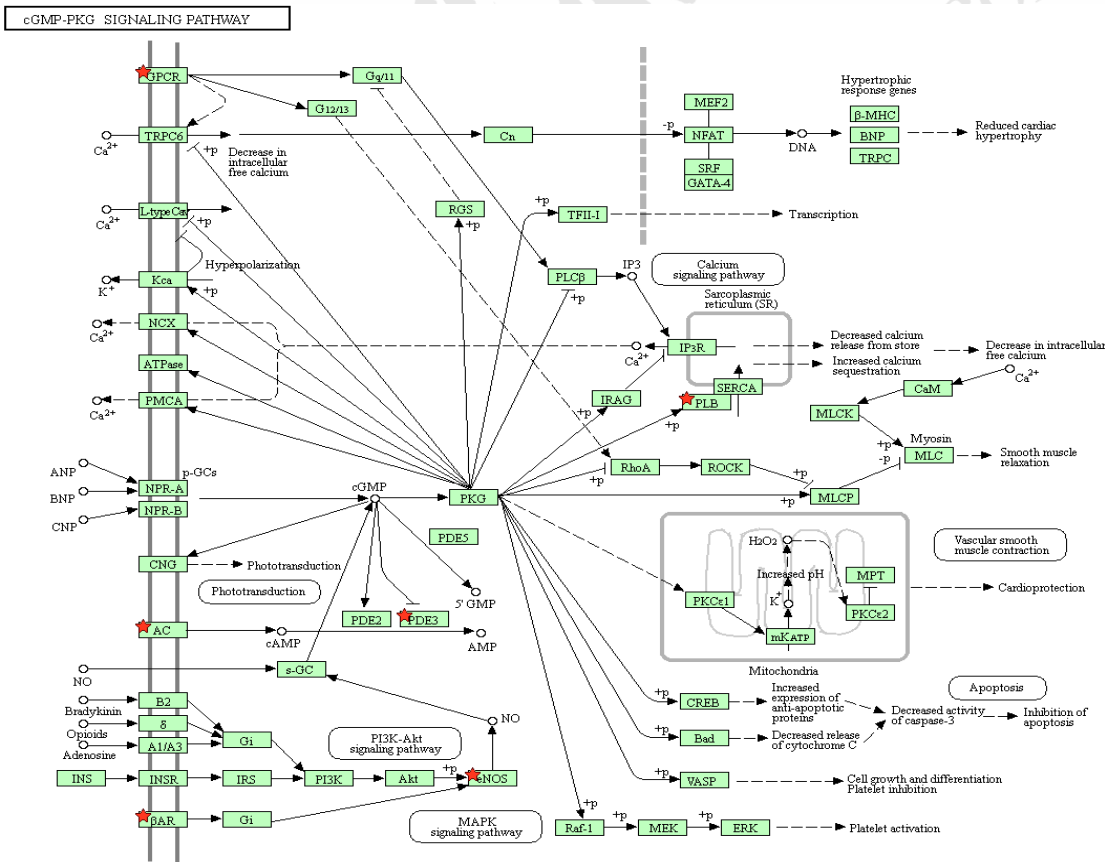


图 1 cGMP-PKG 信号通路

Fig. 1 cGMP-PKG signaling pathway

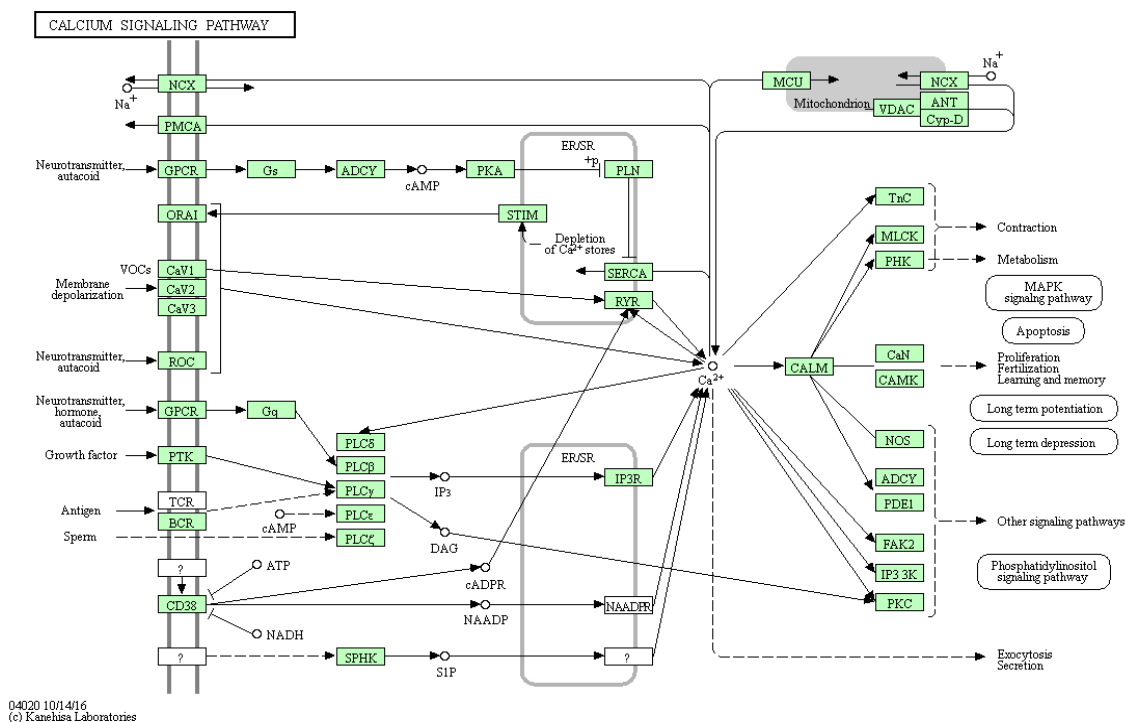


图2 钙离子信号通路

Fig. 2 Calcium signaling pathway

基本单位。在心脏收缩和舒张过程中，心肌细胞遭受大变形而产生的力学作用。当力学作用超载时可导致心肌肥大和心律失常等病变。

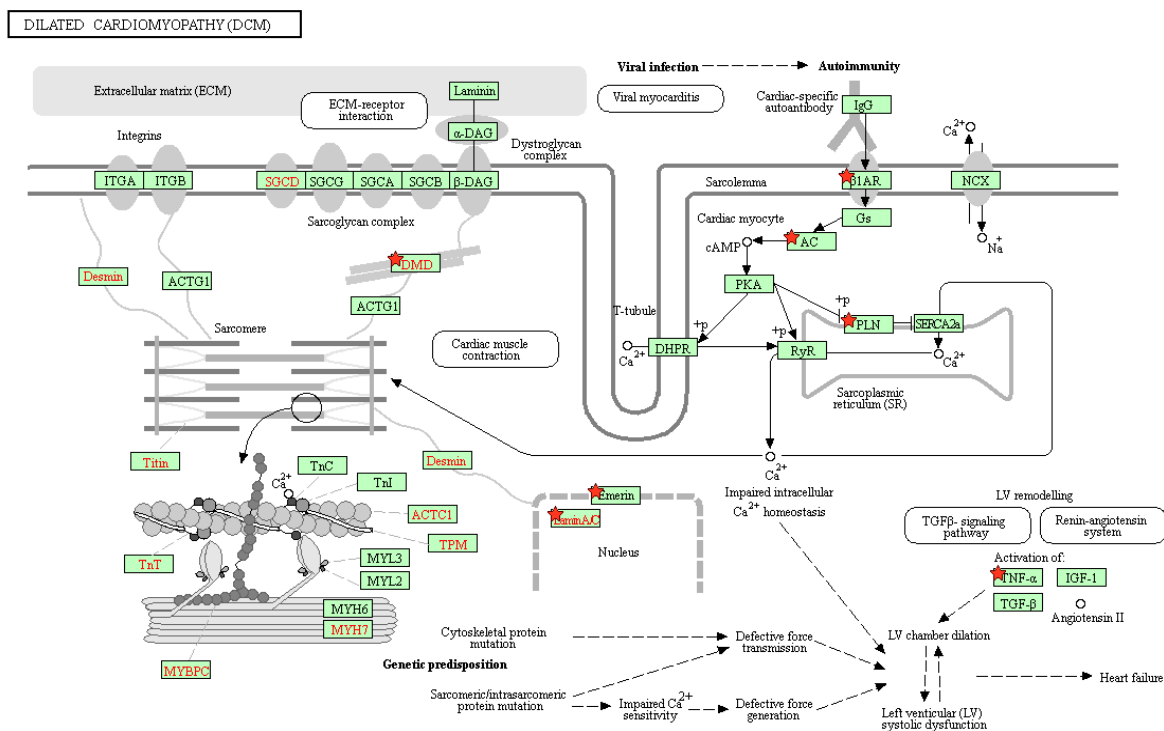
以受磷蛋白(PLN)为例，PLN 是一种小膜蛋白，为 5 个单体结合成的一个五聚体，未磷酸化的 PLB 抑制 SERCA2A 与 Ca^{2+} 的亲合力，降低 SERCA2A 的活性^[6]。PKA 和 CaMK 可催化 PLN 磷酸化，后者与 SERCA2A 解离，消除对 SERCA2A 的抑制作用，使钙泵与 Ca^{2+} 的亲合力增高， Ca^{2+} 转运速度加快。通过 AAV 转入 PLN 突变体能消除心肌梗死大鼠的左心室重构。在羊的动物试验中也发现，通过转入 PLN 抑制性肽，SERCA2A 活性增强，左心室收缩和舒张功能均明显改善。将携带重组受磷蛋白抑制剂(S16EPLN)基因的腺相关病毒转移入心肌梗死后 CHF 大鼠模型体内，可以改善心功能，延缓心室重构。在分离的人心肌细胞中也发现，使用腺病毒载体转入反义 PLN 基因，明显改善心肌细胞的收缩和舒张速率。

2.1.3 扩张型心肌病(dilated cardiomyopathy, DCM)信号通路 共有 7 个基因 ADCY6(112)、ADRB1(153)、DMD(1756)、EMD(2010)、LMNA(4000)、PLN(5350)、TNF(7124)参与了此通路，见图 3。

DCM 以心室扩大、心肌收缩功能减退为特点。随着病情进展，心肌纤维化加重，心脏泵血功能

越来越弱，不仅舒张期心室血容量增多，收缩期血容量也增加，整个心脏时刻处于血液充盈的状态，心脏不断扩大，甚至导致二尖瓣、三尖瓣的关闭不全等结构性病变，最终导致 CHF。

Jones 等发现心脏手术时将编码人 $\beta 2$ -AR 基因的腺病毒转染至猪心肌细胞，有助于改善左心室收缩功能。但持续刺激 β -AR 系统会引起心肌毒性和心律失常，加速 CHF^[7]。ADCY6 基因在这一方面有独特的优势，Lai 等经冠状动脉将编码 ADCY6 的腺病毒转入猪的 CHF 模型，发现其可改善左心室功能、延缓左心室重构，同时 cAMP 的表达明显增加，而 β -AR 和 G 蛋白的数量没有增加^[7]。Renova Therapeutics 正在探索使用 AC6mut 作为 ADCY6 基因移植治疗 CHF 后的下一代产品。ADCY6 是能影响心脏功能的蛋白质，在衰竭的心脏中其功能减弱或者量减少。一项 2 期临床试验表明，ADCY6 基因移植能在 CHF 患者中安全地提升心脏功能，并降低射血指数^[8]。Renova Therapeutics 公司正在开发 ADCY6 基因移植疗法，并已进入名为 FLOURISH 的临床 3 期研究。洪暄等^[9]研究表明，ADRB1 基因多态性与 CHF 无显著相关性，但其没有考虑药物基因组学及不同种族的影响，所以结果尚待完善。Tang 等^[10]研究表明 DMD 基因突变导致了 DCM 伴高钾血症。



114101910
Kanehisa Laboratories

图3 扩张型心肌病信号通路

Fig. 3 Dilated cardiomyopathy pathway

此外，多种核酸蛋白可以结合于心肌细胞核区域，调控核-细胞骨架蛋白相互作用，对于稳定染色质结构、调控细胞转录发挥重要作用。目前发现了3种核酸蛋白与家族性DCM相关，即TMPO、LMNA和EMD，其中EMD是伴X染色体遗传。LMNA基因编码核纤层A/C蛋白。核纤层蛋白是位于核膜内层的一种纤维结构，由3种多肽蛋白构成，即核纤层蛋白A、B、C。LMNA基因通过选择性剪接作用表达这3种蛋白。通过核纤层蛋白与内膜整合蛋白相互作用稳定核孔复合物，从而支持核膜结构。LMNA基因是DCM第2种主要致病基因，通过常染色体显性遗传，LMNA基因突变占总的DCM基因突变类型的6%，其中家族性DCM有7.5%出现LMNA基因突变，而散发性DCM中11%出现LMNA基因突变^[11]。目前发现了114种LMNA基因突变类型。LMNA突变致病的DCM外显率极高，患者常于中年之前发病，并且在60岁之前临床症状完全出现。该基因突变表现出来的临床症状各不相同，但常累及心脏传导系统(窦性心动过缓、房室传导阻滞、房性快速性心律失常)，伴或不伴传导系统疾病的骨骼运动受累，最终发展为CHF。

2.1.4 肥厚型心肌病(hypertrophic cardiomyopathy,

HCM)信号通路 共有6个基因ACE(1636)、DMD(1756)、EMD(2010)、IL6(3569)、LMNA(4000)、TNF(7124)参与了此通路，见图4。

Lwai等研究发现HCM组ACE基因的DD基因型频率显著增高，且DD基因型组的HCM患者左室重量指数与II及ID基因组相比显著增高^[12]。富集通路中高频率CHF时增高的细胞因子形成网络，活性受各种细胞因子调节剂和抗炎细胞因子的影响，其错综复杂的网络调节紊乱可能参与了CHF的发生和发展。如同神经内分泌系统激活致血管收缩剂、舒张剂平衡失调一样，CHF伴随着炎症性细胞因子增加和抗炎因子无明显增高甚至减少。肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor- α , TNF- α)是细胞因子网络的关键部分，其可诱导白细胞介素-1、白细胞介素-6的释放，后者反过来又增强组织细胞对TNF- α 的敏感性^[13]。

肥厚的心室肌使心脏的舒张功能下降，进而导致心功能受影响；此外，过于强劲的收缩使心脏流出的通道受阻，血液甚至泵不出去，这不仅会影响全身各处器官的供血，也会影响冠脉供血，导致心绞痛和晕厥反复发作。部分HCM失代偿，心室腔在晚期也会出现扩大，肥厚的心肌逐渐变薄，进而出现类似扩张型心肌病的表现，导致收

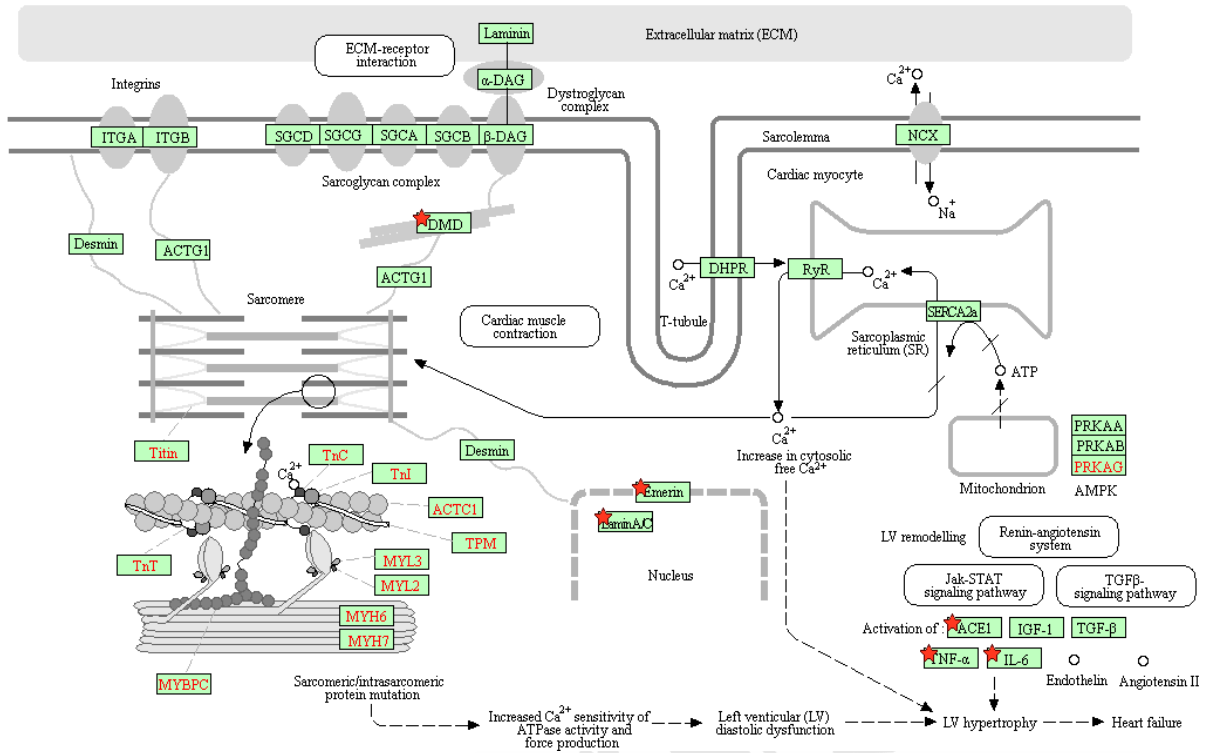


图 4 肥厚型心肌病信号通路

Fig. 4 Hypertrophic cardiomyopathy pathway

缩功能受影响, CHF 进一步加重。

2.2 CHF 相关基因网络分析

共有 40 个“congestive heart failure”相关非冗余基因显著富集在 11 条通路中。其中的 21 个基因在 11 条通路中出现频率 ≥ 3 次。这 21 个基因可能与 CHF 有比较紧密的联系, 因为其参与了与 CHF 相关的众多通路。为了研究这些基因同其他基因可能的相互作用关系, 采用 21 个基因同 HPRD 人类蛋白互作网络数据进行匹配, 建立了有 104 对互作关系的 CHF 人类基因互作网络, 见图 5。

在疾病相关的基因互作网络中, 节点的度数直接反映了此节点基因和该疾病的关联程度。处于中心节点的基因和其他基因存在较多的相互作用, 相互作用包括激活、抑制、调控等。网络中节点度排名前 5% 的 8 个基因分别为 MMP9(4318)、LMNA(4000)、DMD(1756)、EMD(2010)、AGTR1(185)、EDNRB(1910)、NOS3(4846)和 TNF(7124), 它们在网络中处于节点中心位置, 同其他基因存在较多的相互作用, 网络中高节点度基因可能调控其他基因或被其他基因调控。

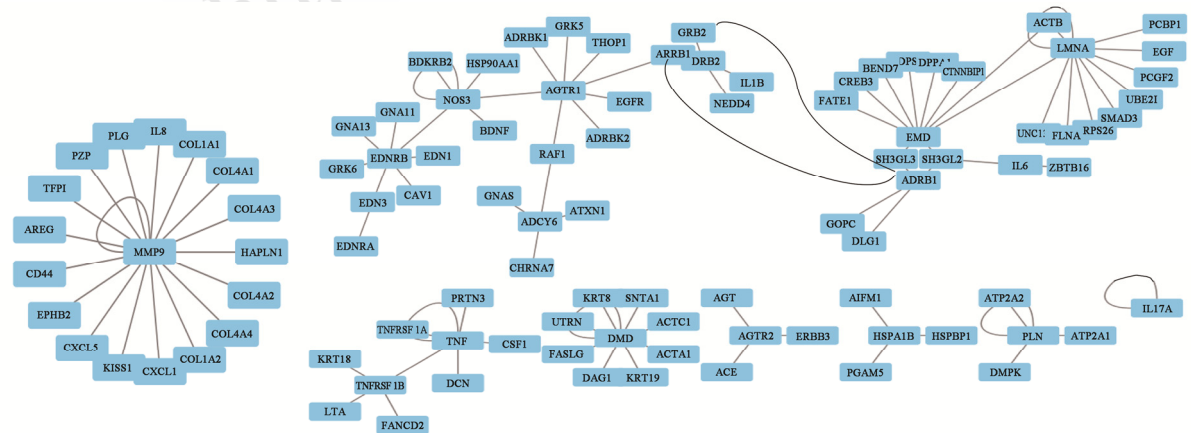


图 5 21 个 CHF 相关基因的人类蛋白互作网络

Fig. 5 Human protein interaction networks with 21 CHF related genes

2.3 高节点度基因的功能富集分析

对排名前 5% 的基因功能进行富集分析, 基因本体(gene ontology, GO)是一个在生物信息学领域中广泛使用的本体。GO 数据库分为 3 个独立的本体, 分别为分子功能、生物过程、细胞组分^[14]。节点度排名前 5% 的基因分子功能主要集中于酶结合、细胞因子结合。生物过程主要集中于细胞表面受体连接信号转导、细胞内信号级联、有机物响应、细胞增殖调控。细胞组分主要集中于细胞质膜、固有膜, 见图 6。

Category	Term	RT	Genes	Count	%	P-Value
GOTERM_MF_FAT	enzyme binding	RT		13	44.8	1.6E-10
GOTERM_MF_FAT	cytokine binding	RT		7	24.1	7.8E-8
Category	Term	RT	Genes	Count	%	P-Value
GOTERM_BP_FAT	cell surface receptor linked signal transduction	RT		21	72.4	5.2E-12
GOTERM_BP_FAT	intracellular signaling cascade	RT		17	58.6	2.9E-10
GOTERM_BP_FAT	response to organic substance	RT		16	55.2	1.3E-12
GOTERM_BP_FAT	regulation of cell proliferation	RT		15	51.7	8.5E-11
Category	Term	RT	Genes	Count	%	P-Value
GOTERM_CC_FAT	plasma membrane	RT		20	69.0	2.1E-6
GOTERM_CC_FAT	intrinsic to membrane	RT		16	55.2	6.4E-2
GOTERM_CC_FAT	plasma membrane part	RT		14	48.3	7.5E-5

图 6 具有高节点度基因的功能

Fig. 6 The function of genes with high node degrees

通过疾病数据库 OMIM 对以上 8 个基因进行分析, AGTR1 基因主要和肾小管发育不全、高血压相关^[15]。DMD 基因、EMD 基因主要和肌营养不良症、心肌病相关^[16-17]; EDNRB 基因主要和瓦登伯格综合症、先天性巨结肠相关^[18]; LMNA 基因主要和心肌病、脂肪代谢障碍、肌肉萎缩症、肌营养不良、心-手综合征等相关; NOS3 基因主要和高血压、冠状动脉痉挛、胎盘早剥相关^[19]; TNF 基因主要和偏头痛、哮喘等相关^[20]; 在 MMP9 受体上开发的药物主要和 CHF、肿瘤相关^[21-22]。

2.4 CHF 常见药物靶点分析

采用表 1 中 CHF 常见的 4 种治疗药物所具有的 31 个蛋白靶标和人类蛋白互作数据库 HPRD 进行关联, 建立 CHF 相关人类蛋白互作网络。网络中共包含 417 个蛋白对应的 485 对互作关系, 节点度>5 的蛋白包括 AR(367)节点度数 152, NR3C1(2908)节点度数 91, SHBG(6462)节点度数 50, MMP2(4313)节点度数 34, MMP9(4318)节点度数 32, PGR(5241)节点度数 31, ALB(213)节点度数 19, NR1H2(8856)节点度数 14, NR3C2(4306)节点度数 12, CA2(760)节点度数 11, CA12(771)节点度数 9, KCNMA1(3778)节点度数 8,

ABCC2(1244)节点度数 5。AR 基因即蛋白 ANDR_HUMAN 和其他 152 个蛋白发生相互作用, 处于网络中心位置。网络中某一基因与周围基因的关系数量, 节点度越大, 代表与它有相互作用关系的基因越多, 表明这个基因邻近基因间的调控关系很复杂, 处于的区域对于网络具有更重要的价值。

3 讨论

CHF 是临床上较为常见的心血管系统疾病之一, 目前尚无满意的特效治疗药物, 而导致这种情况出现的直接原因主要是由于该疾病病理机制复杂, 尚待开发有效的药物靶点及其相应的治疗药物。只有发现合适的药物靶点, 对相关药靶参与的通路进行抑制, 才有可能治愈该疾病。

本研究首先从 NCBI 数据库收集 CHF 相关的基因, 利用 DAVID 数据库对 66 个 CHF 相关基因的 KEGG 路径进行分析, 结果得到 50 个基因富集在 28 条通路上。对其中富集最显著的 11 条通路进行分析, 发现共有 40 个非冗余基因被注释到该 11 条通路上。在 11 条通路中出现频率≥3 次的基因共有 21 个基因。

采用 21 个 CHF 相关基因同 HPRD 人类蛋白互做网络数据进行匹配, 建立了具有 104 对互作关系的 CHF 人类基因互作网络。其中 MMP9、LMNA、DMD、EMD、AGTR1、EDNRB、NOS3 和 TNF 8 个基因在网络中处于节点中心位置, 同其他基因存在较多的相互作用, 网络中高节点度基因可能调控其他基因或被其他基因调控。

同时对 CHF 常见的 4 种治疗药物所具有的 31 个蛋白靶标和人类蛋白互作数据库 HPRD 建立关联, 建立 CHF 相关人类蛋白互作网络。网络中共包含 417 个蛋白产生的 485 对互作关系, 节点度>5 的 13 个蛋白包括 AR、NR3C1、SHBG、MMP2、MMP9、PGR、ALB、NR1H2、NR3C2、CA2、CA12、KCNMA1、ABCC2。把 2 个网络共 34 个基因重新进行富集分析会发现新增加一个显著富集的通路为 pathways in cancer,

MMP9 基因在 2 个网络中都具有较高节点度, 正常情况下基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMPs)和组织金属蛋白酶抑制剂(tissue inhibitor of matrix metalloproteinases, TIMPs)之间处于平衡状态。MMPs 和 TIMPs 的失衡与心室扩张和重构有关, 并将最终导致 CHF。研究提示 IL-17A 基因敲除后 CHF 过程减缓, MMP-2 和 MMP-9 mRNA 表达增强, 提示 IL-17A 直接以及

通过 MMP-2 和 MMP-9 表达参与过负荷 CHF 过程, IL-17A 以及 MMP-2 和 MMP-9 通路是减轻和减缓 CHF 形成、发展的干预靶点之一^[23]。

雄激素受体(androgen receptor, AR)属于核受体超家族中的类固醇受体,一般由 4 个结构域组成,分别为 N 端转录激活区、DNA 结合区、铰链区和配体结合区。AR 是螺内酯的作用靶点,螺内酯是醛固酮的竞争性抑制剂,可以抑制卵巢和肾上腺释放雄激素,增强雄激素的分解。雄激素具有广泛的生物学效应,对心血管系统起调节作用,主要是通过位于睾丸间质细胞、神经系统、肾及肾上腺、心房及心室肌、主动脉及冠状动脉中的 AR 实现。雄激素在机体内作用广泛,心脏组织已经发现存在 AR,国内刘晓柳等^[24]证实了大鼠心脏中 AR 的存在,并证实心内神经节部分神经元能够合成 AR,提示心内神经节可能受雄激素影响。动物试验证明雄激素及 AR 系统参与心脏的正常生长,其作用能调控多个基因的表达,说明心血管系统是雄激素作用的一个靶系统。

国外已有一些小样本临床研究显示生理剂量睾酮可改善男性 CHF 患者的临床症状。研究发现对 CHF 患者予生理剂量睾酮治疗并随访 12 周后,左室射血分数提高,心功能改善,存活率提高。这说明雄激素有可能成为 CHF 新的辅助治疗药物^[25]。

本研究从通路、基因功能、药物靶点和蛋白互作等多个层次来挖掘与 CHF 相关的靶基因。其中 AR、LMNA 和 MMP9 3 个基因可能是 CHF 药物间接作用的重要靶点,将在后续研究中通过实验加以验证。

REFERENCES

- [1] CHEN M, WANG X Q, XU Y Y, et al. Effect of atorvastatin and coenzyme Q10 on hs-CRP, ET-1 and BNP level in chronic heart failure patients [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*(中国现代应用药学), 2017, 34(7): 1042-1045.
- [2] HAN Z Y, TIAN P F. Applications of KEGG database in research of biosynthesis [J]. *Biotechnol bull*(生物技术通报), 2011(1): 76-82.
- [3] 玄春花, 王程瑜, 许东元. cGMP 信号通路在心衰衰竭诊治中的应用研究进展[J]. *中国实验诊断学*, 2017, 21(3): 535-537.
- [4] TAKIMOTO E, KOITABASHI N, HSU S, et al. Regulator of G protein signaling 2 mediates cardiac compensation to pressure overload and antihypertrophic effects of PDE5 inhibition in mice [J]. *J Clin Invest*, 2009, 119(2): 408-420.
- [5] SHRODER E A, WEI Y, SATIN J. The developing cardiac myocyte: maturation of excitability and excitation-contraction coupling [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2006(1080): 63-75.
- [6] 郭晓强, 时兰春. 受磷蛋白与心力衰竭[J]. *心脏杂志*, 2005, 17(5): 487-489.

- [7] 葛均波, 方唯一. 现代心脏病学进展 2017[M]. 第 1 版. 北京: 科学出版社, 2017.
- [8] GAO M H, LAI N C, GIAMOURIDIS D, et al. Cardiac-directed expression of a catalytically inactive adenylyl cyclase 6 protects the heart from sustained β -adrenergic stimulation [J]. *PloS One*, 2017, 12(8): e0181282. Doi: 10.1371/journal.pone.0181282. eCollection 2017.
- [9] HONG X, YU S S, CHEN M, et al. Relationship between ADRB1 polymorphisms and systolic heart failure [J]. *J Shanxi Med Univ*(山西医科大学学报), 2015, 46(3): 202-207.
- [10] TANG J, SONG X, JI G, et al. A novel DMD splicing mutation found in a family responsible for X-linked dilated cardiomyopathy with hyper-CKemia [J]. *Medicine*(Baltimore), 2018, 97(24): e11074. Doi: 10.1097/MD.00000000000011074.
- [11] 孙莉萍. 遗传性扩张型心肌病 LMNA 基因突变的致病机制研究[D]. 北京: 中国协和医科大学, 2010: 32.
- [12] ZHANG L, GUI Q J, PENG J Y. The research progress about correlation between ACE gene polymorphism and cardiovascular disease [J]. *Chin J Cardiovascul Res*(中国心血管病研究), 2010, 8(6): 460-462.
- [13] ZHANG H M, XU H Q, WANG R Y, et al. Affection of heart function and TNF- α , IL-1 level on chronic congestive heart failure combination treated with A and E [J]. *Hei Long Jiang Med J*(黑龙江医学), 2008, 32(9): 658-659.
- [14] ZHANG W, XU J, LI Y Y, et al. Correction to "detecting essential proteins based on network topology, gene expression data, and gene ontology information" [J]. *IEEE/ACM Transact Comput Biol Bioinform*, 2018, 15(3): 1035. Doi: 10.1109/TCBB.2018.2813918.
- [15] QIAN X, GUO D, ZHOU H, et al. Interactions between PPAR γ and AGTR1 gene polymorphisms on the risk of hypertension in Chinese han population [J]. *Genet Test Mol Biomarkers*, 2018, 22(2): 90-97.
- [16] NAKAMURA A. X-Linked Dilated Cardiomyopathy: a cardiospecific phenotype of dystrophinopathy [J]. *Pharmaceut (Basel)*, 2015, 8(2): 303-20.
- [17] BROWN C A, SCHARNER J, FELICE K, et al. Novel and recurrent EMD mutations in patients with Emery-Dreifuss muscular dystrophy, identify exon 2 as a mutation hot spot [J]. *J Hum Genet*, 2011, 56(8): 589-594.
- [18] MORIMOTO N, MUTAI H, NAMBA K, et al. Homozygous EDNRB mutation in a patient with Waardenburg syndrome type 1 [J]. *Auris Nasus Larynx*, 2018, 45(2): 222-226.
- [19] ITO M, NOMURA S. Cardiomyopathy with LMNA Mutation [J]. *Int Heart J*, 2018, 59(3): 462-464.
- [20] HUANG H, NIE W, QIAN J, et al. Effects of TNF- α polymorphisms on asthma risk: a systematic review and meta-analysis [J]. *J Investig Allergol Clin Immunol*, 2014, 24(6): 406-417.
- [21] RADOSINSKA J, BARANCIK M, VRBJAR N. Heart failure and role of circulating MMP-2 and MMP-9 [J]. *Panminerva Med*, 2017, 59(3): 241-253.
- [22] CHANG Y C, CHAN Y C, CHANG W M, et al. Feedback regulation of ALDOA activates the HIF-1 α /MMP9 axis to promote lung cancer progression [J]. *Cancer Lett*, 2017, 403: 28-36.
- [23] 安君, 李永财, 刘旭光, 等. 白介素-17A 对压力过负荷心衰小鼠的影响[J]. *中国老年学杂志*, 2016, 36(5): 1046-1047.
- [24] LIU X L, WU X Q, LI G Q, et al. The expression change of androgen receptor and mRNA in intracardiac ganglia of middle and old-aged male rats [J]. *Chin J Neuroanat*(神经解剖学杂志), 2006, 22(1): 85-88.
- [25] HAN Y, SUN W, SUN G, et al. A 3-year observation of testosterone deficiency in Chinese patients with chronic heart failure [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(45): 79835-79842.

收稿日期: 2018-06-14

(本文责编: 沈倩)