

儿童克罗恩病差异表达基因的生物信息学分析

刘迎春, 梅红*, 高原, 王宝香, 赵玉霞[华中科技大学同济医学院附属武汉儿童医院(武汉市妇幼保健院)消化内科, 武汉 430014]

摘要: 目的 应用生物信息学方法探讨儿童克罗恩病的差异表达基因, 为阐明儿童克罗恩病的发病机制及干预靶点提供新思路。方法 从公共基因表达数据库(Gene Expression Omnibus, GEO)下载儿童克罗恩病相关的基因芯片数据集 GSE9686, 使用在线分析工具 GEO2R 筛选出儿童克罗恩病结肠组织与正常结肠组织的差异表达基因。使用数据库 DAVID 对差异表达基因进行 GO 功能注释和 KEGG 通路分析, 使用 STRING 数据库进行蛋白互作网络(PPI)分析, 使用 Cytoscape 筛选出儿童克罗恩病的关键基因。结果 筛选出 85 个儿童克罗恩病差异表达基因, 包括 63 个上调基因和 22 个下调基因。GO 分析揭示差异表达基因主要富集于趋化因子活性、CXCR 趋化因子受体结合、细胞外空间、细胞外区域、趋化因子介导的信号通路及炎症反应等过程, KEGG 分析揭示差异表达基因主要富集于细胞因子-细胞因子受体相互作用、趋化因子信号通路、TNF 信号通路等。Cytoscape 筛选出了 15 个关键基因, 所有关键基因在儿童克罗恩病结肠组织中表达均上调。结论 采用生物信息学对儿童克罗恩病结肠组织与正常结肠组织的差异表达基因进行综合分析, 可为儿童克罗恩病的早期诊断及靶向治疗提供新的理论依据。

关键词: 生物信息学; 儿童克罗恩病; 差异表达基因

中图分类号: R917 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2020)17-2148-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2020.17.019

引用本文: 刘迎春, 梅红, 高原, 等. 儿童克罗恩病差异表达基因的生物信息学分析[J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(17): 2148-2152.

Bioinformatics Analysis of Differentially Expressed Genes in Children with Crohn's Disease

LIU Yingchun, MEI Hong*, GAO Yuan, WANG Baoxiang, ZHAO Yuxia[Department of Gastroenterology, Wuhan Children's Hospital (Wuhan Maternal and Child Healthcare Hospital), Tongji Medical College, Huazhong University of Science & Technology, Wuhan 430014, China]

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the differentially expressed genes of children's Crohn's disease(CD) by the bioinformatics method, providing a new idea for elucidating the pathogenesis and intervention targets of CD in children. **METHODS** The gene expression dataset GSE9686 related to CD was downloaded from the Gene Expression Omnibus(GEO). The online analysis tool GEO2R was used to screen the DEGs of CD colon tissue and normal colon tissue in children. The GO function annotation and KEGG pathway analysis were performed on the DEGs using the database DAVID. The protein-protein interaction network(PPI) analysis was performed using the STRING database, and the key genes of CD in children were screened using Cytoscape. **RESULTS** Eighty-five DEGs were obtained in Crohn's disease, including 63 up-regulated genes and 22 down-regulated genes. GO analysis revealed that DEGs were mainly enriched in chemo'kine activity, chemokine receptor binding, extracellular space, extracellular region, chemokine-mediated signaling pathway and inflammatory response, and KEGG analysis revealed DEGs were mainly enriched in Cytokine-cytokine receptor interaction, Chemokine signaling pathway, TNF signaling pathway. Fifteen key genes were obtained by Cytoscape, and all of them were up-regulated in CD children. **CONCLUSION** The comprehensive analysis of DEGs between CD colonic tissue and normal colon tissue in children using bioinformatics can provide a new theoretical basis for early diagnosis and targeted therapy of CD in children.

KEYWORDS: bioinformatics; Crohn's disease in children; differentially expressed genes

克罗恩病是一种慢性进行性的炎症性疾病, 病变多见于末段回肠和结肠, 也可累及整个消化道。儿童克罗恩病的发病率正在增加, 发病率为 2.5~11.4/10 万, 流行率为 58/10 万^[1]。大约 25% 的克罗恩病患者在 18 岁之前被诊断出^[2]。然而, 克罗恩病的病因尚不十分清楚, 发病机制也未完

全阐明^[3]。克罗恩病患者的治疗方法涉及多学科, 主要在预防复发, 对儿科克罗恩病的治疗包括肠内营养、皮质类固醇、免疫调节剂、抗菌药物和生物制剂以及心理和精神支持治疗^[4]。近年来有研究表明, PXR、FXR 和 CAR 等主要核受体也有减轻肠道炎症、维持肠黏膜屏障功能的作用^[5]。但目

作者简介: 刘迎春, 女, 硕士, 主治医师 Tel: (027)82433312
Tel: (027)82433312 E-mail: 13808663887@163.com

E-mail: 418274670@qq.com

*通信作者: 梅红, 女, 硕士, 主任医师

前仍没有可以完全治愈克罗恩病的医学治疗方法,治疗目标仍为诱导缓解和维持缓解,防治并发症,改善生存质量。因此,需要探索克罗恩病的潜在机制,以开发新的治疗策略。本研究通过 GEO 数据库下载儿童克罗恩病相关的基因芯片数据集,比较儿童克罗恩病结肠组织与正常结肠组织的差异,获取差异表达基因,并通过生物信息学分析,可为儿童克罗恩病的早期诊断及靶向治疗提供新的理论依据。

在本研究中,笔者进行了全面的生物信息学分析,以了解儿童克罗恩病的发病机制并确定新的治疗靶点。笔者首先从公共数据库(GEO)下载与儿童克罗恩病患者相关的数据集,随后进行一系列生物信息学分析,包括 GO 功能注释和 KEGG 通路分析、蛋白互作网络(PPI)分析及关键基因的筛选。

1 材料与方法

1.1 数据集

在 NCBI 的 GEO 公共数据平台搜索“儿童克罗恩病”,找到一个数据集 GSE9686,其中 GSE9686 包含 11 例儿童克罗恩病患者和 8 例健康对照者,儿童克罗恩病样本取自最接近受影响的结肠段。

1.2 筛选差异表达基因

使用在线分析工具 GEO2R(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/geo2r/>)对数据集 GSE9686 进行分析,以 $P < 0.05$ 且 $|\log FC| \geq 1.5$ 作为差异基因的阈值。

1.3 分析差异表达基因

使用数据库 DAVID 对差异表达基因进行 GO 功能注释和 KEGG 通路分析,使用 STRING 数据库进行 PPI 分析,使用 Cytoscape 插件 Cytohubba 筛选出儿童克罗恩病的关键基因。以 $P < 0.05$ 作为筛选阈值。

2 结果

2.1 差异表达基因

通过在线分析工具 GEO2R,得到基因差异表达火山图,见图 1。其中每个点代表 1 个基因,其中 $|\log FC| \geq 1.5$ 区域的点代表有显著性差异的基因, $\log FC \geq 1.5$ 区域代表基因表达量上调, $\log FC \leq -1.5$ 代表基因表达量下调。中间点代表无显著性表达差异的基因,从数据集 GSE9686 得到 85 个儿童克罗恩病差异表达基因,包括 63 个上调基因和 22 个下调基因。

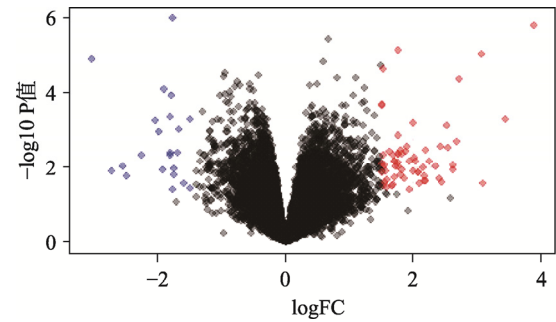


图 1 差异表达基因的火山图

Fig. 1 Volcano plot of differentially expressed genes

2.2 差异表达基因的 GO 功能注释和 KEGG 通路分析

使用数据库 DAVID 对差异表达基因进行 GO 功能注释和 KEGG 通路分析。GO 富集分析包括 3 部分:生物过程(biological process)、细胞组件(cellular component)和分子功能(molecular function)。按照 P 值列出每部分最小的 5 项,结果见表 1~2。差异表达基因主要富集在趋化因子活性(GO: 0008009~chemokine activity)、CXCR 趋化因子受体结合(GO: 0045236~CXCR chemokine receptor binding)、细胞外空间(GO: 0005615~extracellular space)、细胞外区域(GO: 0005576~extracellular region)。

表 1 差异表达基因 GO 富集分析结果

Tab. 1 GO enrichment analysis of differentially expressed genes

类别	基因功能	基因数	P 值
MF	GO:0008009~chemokine activity	12	1.56×10^{-16}
MF	GO:0045236~CXCR chemokine receptor binding	5	4.45×10^{-8}
MF	GO:0020037~heme binding	7	3.26×10^{-5}
MF	GO:0004601~peroxidase activity	4	1.22×10^{-4}
MF	GO:0048248~CXCR3 chemokine receptor binding	3	1.93×10^{-4}
CC	GO:0005615~extracellular space	28	1.83×10^{-12}
CC	GO:0005576~extracellular region	28	1.13×10^{-10}
CC	GO:0005578~proteinaceous extracellular matrix	12	1.39×10^{-8}
CC	GO:0005581~collagen trimer	5	5.91×10^{-4}
CC	GO:0005789~endoplasmic reticulum membrane	11	3.00×10^{-3}
BP	GO:0070098~chemokine-mediated signaling pathway	12	1.36×10^{-14}
BP	GO:0006954~inflammatory response	19	4.57×10^{-14}
BP	GO:0006935~chemotaxis	12	6.23×10^{-12}
BP	GO:0030593~neutrophil chemo taxis	9	5.04×10^{-10}
BP	GO:0032496~response to lipopolysaccharide	11	2.88×10^{-9}

注: MF—分子功能; CC—细胞成分; BP—生物过程。

Note: MF—molecular function; CC—cellular component; BP—biological process.

Tab. 2 KEGG pathway analysis of differentially expressed genes

Note: KEGG—Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes.

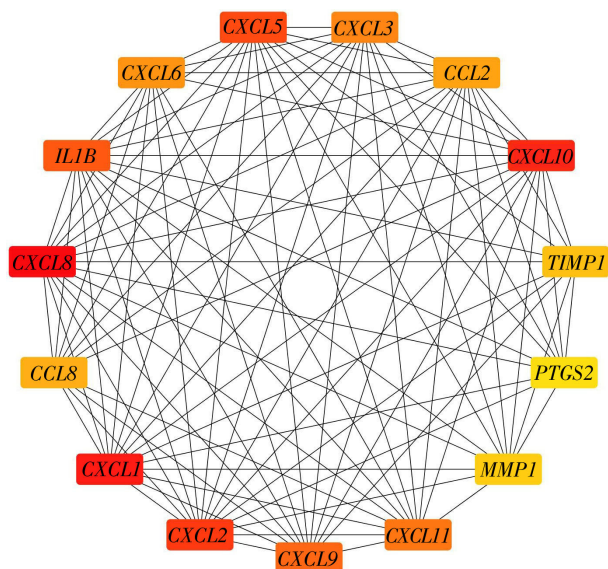


图3 15个关键基因
Fig. 3 Fifteen key genes

新治疗靶点的有用工具^[6]。然而,尚未有通过综合生物信息学分析儿童克罗恩病的研究。本研究通过 GEO 数据库得到了一个与儿童克罗恩病相关的数据集 GSE9686,通过 GEO2R 在线工具的分析,得到了 85 个儿童克罗恩病差异表达基因,其中 63 个上调基因和 22 个下调基因。这也表明儿童克罗恩病的发病机制复杂,并不是某个基因引起的,而是多个基因共同作用引起的结果。笔者进一步分析这些差异表达基因在儿童克罗恩病中的生物学功能。GO 分析结果揭示这些儿童克罗恩病的差异表达基因主要富集于趋化因子活性、CXCR 趋化因子受体结合、细胞外空间、细胞外区域、趋化因子介导的信号通路及炎症反应等过程,KEGG 分析揭示差异表达基因主要富集于细胞因子-细胞因子受体相互作用、趋化因子信号通路、TNF 信号通路等。趋化因子是细胞在常规免疫监测、炎症和发育过程中迁移的重要介质^[7]。趋化因子与 G 蛋白偶联受体结合,引起构象改变,从而触发细胞内参与细胞运动和活化的信号通路^[8]。近年来越来越多的研究发现趋化因子在多种疾病中起着至关重要的作用,其中包括肾病、类风湿性关节炎、动脉硬化、多发性硬化和慢性炎症性肠病^[8]。免疫反应异常是炎症性肠病的重要特点,在炎症反应中,趋化因子是调节白细胞募集的重要因子,多种趋化因子参与了炎症性肠病^[8]。

笔者使用 Cytoscape 插件 Cytohubba 对差异表达基因的 PPI 网络进行关键基因筛选,共筛选出

15 个关键基因,包括 CXCL1、CXCL9、MMP1、CXCL11、CXCL6、CXCL8、CXCL5、CXCL10、CCL2、IL1B、CXCL2、CCL8、CXCL3、TIMP1 和 PTGS2。这些关键基因中包括多种趋化因子: CXCL1、CXCL9、CXCL11、CXCL6、CXCL8、CXCL5、CXCL10、CCL2、CXCL2、CCL8、CXCL3。有研究发现趋化因子(如 CCL2, CCL3, CCL4, CCL7, CCL8 和 CXCL8)在克罗恩病和溃疡型结肠炎患者的黏膜活检中表达上调,并且这种上调与疾病活动相关^[9]。也有研究发现与健康对照组相比,克罗恩病患者血清 CXCL9, CXCL10 和 CXCL11 水平显著升高^[10]。CXCL8 又叫做 IL8,在活动性炎症性肠病中 CXCL8 的水平明显升高,且与消化道炎症水平呈正相关^[11]。隐窝细胞更新对于正常肠内稳态以及损伤后的黏膜再生是必需的,研究发现内源性产生的趋化因子 CXCL10 能够调节隐窝细胞增殖^[12]。小鼠口服硫酸葡聚糖钠后,增殖区上皮中 CXCL10 和 CXCR3 的表达增加^[11]。中和 CXCL10 后能够通过促进隐窝细胞存活而阻止小鼠肠道上皮溃疡^[12]。因此, CXCL10 可以通过控制上皮内固定的动态来成为炎症性肠病的新治疗靶点^[12]。在诱导小鼠结肠炎后, pAdipoR1 小鼠比野生型小鼠产生更严重的症状,研究还发现 pAdipoR1 小鼠的结肠中中性粒细胞趋化因子(CXCL1, CXCL2 和 CXCL5)的表达以及嗜中性粒细胞的浸润增加^[13]。CXCL6 在炎症性肠病患者发炎的肠组织的内皮细胞中高表达,研究还发现 CXCL6 和 CXCL8 可在 IBD 患者的活检组织中检测到,且其水平与疾病活动相关^[14]。在克罗恩病和 UC 患者的黏膜上皮细胞和固有层中 MMP-1, MMP-3, MMP-7 和 MMP10 的表达增加^[15]。与对照组相比, SHIP 敲除的小鼠中发炎肠组织和肠巨噬细胞产生更高水平的 IL1B 和 IL18, SHIP 活性与 IL1B 的产生量呈反比关系^[16]。PTGS2 也叫 COX-2, COX-2 在健康黏膜和炎症性肠病缓解期低表达;然而,在活性炎症性肠病中,其表达水平显著升高,主要表达于上皮细胞、内皮细胞和炎症细胞^[17]。免疫组化结果显示在克罗恩病中 COX-2 的表达水平很高,这表明 COX-2 可能在炎症的发病机理中起作用^[18]。

本研究通过生物信息学方法对儿童克罗恩病与正常儿童结肠组织总的差异表达基因进行分析,结果表明多个基因和通路参与了克罗恩病的

形成。通过对差异表达基因的 PPI 网络图进行分析,筛选出了 15 个关键基因,包括 *CXCL1*、*CXCL9*、*MMP1*、*CXCL11*、*CXCL6*、*CXCL8*、*CXCL5*、*CXCL10*、*CCL2*、*IL1B*、*CXCL2*、*CCL8*、*CXCL3*、*TIMP1* 和 *PTGS2*。其中大部分关键基因是趋化因子,说明趋化因子在克罗恩病的发病机制中扮演着重要角色,因此趋化因子靶向药物研发可能存在巨大价值。Hyun 等^[19]在对小鼠大肠炎动物模型的研究表明,在大肠炎的发展阶段,给予 IP-10 单克隆抗体能减轻临床症状和组织损伤,减少 IP-10 mRNA 的表达以及减少单核细胞在淋巴结和结肠的累积,提示在 IBD 中,阻断 IP-10 可以作为一种有用的辅助治疗。趋化因子及其受体在 IBD 中的作用的研究已取得重大进展,但还有许多趋化因子以及它们的受体在 IBD 中的作用还不清楚,本研究首次通过生物信息学对儿童克罗恩病进行分析,通过对差异表达基因的 PPI 网络图进行分析,筛选出了 15 个关键基因,以此为靶点,可为儿童克罗恩病的早期诊断及治疗提供新的理论依据。

REFERENCES

- [1] VON ALLMEN D. Pediatric Crohn's disease [J]. Clin Colon Rectal Surg, 2018, 31(2): 80-88.
- [2] TURUNEN P, ASHORN M, AUVINEN A, et al. Long-term health outcomes in pediatric inflammatory bowel disease: A population-based study [J]. Inflamm Bowel Dis, 2009, 15(1): 56-62.
- [3] 欧阳钦. 炎症性肠病的病因和发病机制[J]. 实用医学杂志, 2003, 19(5): 448-449.
- [4] SCHULMAN J M, PRITZKER L, SHAOUL R. Maintenance of remission with partial enteral nutrition therapy in pediatric Crohn's disease: A retrospective study [J]. Can J Gastroenterol Hepatol, 2017, 2017: 5873158.
- [5] GUO Y T, SHAO Y Y, LIU J J, et al. Progress in research on nuclear receptors as therapeutic targets for inflammatory bowel diseases [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2020, 37(4): 496-500.
- [6] ZHANG Y Y, SZUSTAKOWSKI J, SCHINKE M. Bioinformatics analysis of microarray data [M]. Totowa, NJ: Humana Press, 2009: 259-284.
- [7] ALLEN S J, CROWN S E, HANDEL T M. Chemokine: receptor structure, interactions, and antagonism [J]. Annu Rev Immunol, 2007, 25: 787-820.
- [8] DING Y B, ZOU K F. Chemokines and their receptors in inflammatory bowel disease [J]. Int J Dig Dis(国际消化病杂志), 2007, 27(1): 44-46.
- [9] BANKS C, BATEMAN A, PAYNE R, et al. Chemokine expression in IBD. Mucosal chemokine expression is unselectively increased in both ulcerative colitis and Crohn's disease [J]. J Pathol, 2003, 199(1): 28-35.
- [10] SINGH U P, VENKATARAMAN C, SINGH R, et al. CXCR3 axis: Role in inflammatory bowel disease and its therapeutic implication [J]. Endocr Metab Immune Disord Drug Targets, 2007, 7(2): 111-123.
- [11] DAIG R, ANDUS T, ASCHENBRENNER E, et al. Increased interleukin 8 expression in the colon mucosa of patients with inflammatory bowel disease [J]. Gut, 1996, 38(2): 216-222.
- [12] SASAKI S, YONEYAMA H, SUZUKI K, et al. Blockade of CXCL10 protects mice from acute colitis and enhances crypt cell survival [J]. Eur J Immunol, 2002, 32(11): 3197-3205.
- [13] PENG Y J, SHEN T L, CHEN Y S, et al. Adiponectin and adiponectin receptor 1 overexpression enhance inflammatory bowel disease [J]. J Biomed Sci, 2018, 25(1): 24.
- [14] GIJSBERS K, VAN ASSCHE G, JOOSSENS S, et al. CXCR1-binding chemokines in inflammatory bowel diseases: Down-regulated IL-8/CXCL8 production by leukocytes in Crohn's disease and selective GCP-2/CXCL6 expression in inflamed intestinal tissue [J]. Eur J Immunol, 2004, 34(7): 1992-2000.
- [15] JIMBO K, OHTSUKA Y, KOJIMA Y, et al. Increased expression of CXCR3 axis components and matrix metalloproteinase in pediatric inflammatory bowel disease patients [J]. Pediatr Int, 2014, 56(6): 873-883.
- [16] NGOH E N, WEISSER S B, LO Y, et al. Activity of SHIP, which prevents expression of interleukin 1 β , is reduced in patients with Crohn's disease [J]. Gastroenterology, 2016, 150(2): 465-476.
- [17] ZHANG C X, GUO L K, GUO X F. Interaction between the polymorphisms of cyclooxygenase-2-1195g/a, mnsod9ala/val genes and the high-fat diets and its correlation with ulcerative colitis [J]. Acta Acad Med Sin, 2015, 37(1): 37-43.
- [18] ROMERO M, ARTIGIANI R, COSTA H, et al. Evaluation of the immunoeexpression of COX-1, COX-2 and p53 in Crohn's disease [J]. Arq Gastroenterol, 2008, 45(4): 295-300.
- [19] HYUN J G, LEE G, BROWN J B, et al. Anti-interferon-inducible chemokine, CXCL10, reduces colitis by impairing T helper-1 induction and recruitment in mice [J]. Inflamm Bowel Dis, 2005, 11: 799-805.

收稿日期: 2019-10-15
(本文责编: 李艳芳)