

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2024.23.055

· 生物信息学 ·

基于线粒体相关的活性氧和谷胱甘肽探讨脑卒中的发病机制*

张鸿宇 门伟业 熊紫怡 宋文君 党雪 英振昊[△]

(山东中医药大学康复医学院 山东 济南 250355)

摘要 目的:基于生物信息学探究线粒体相关的活性氧(ROS)和谷胱甘肽(GSH)的相关基因在脑卒中中的作用及临床意义,进行关键基因的筛选。**方法:**利用高通量基因表达数据库(GEO)获取脑卒中相关靶点,并通过 FerrDb 数据库获取线粒体相关的 ROS 和 GSH 的有关靶点。通过使用 R 语言,对线粒体相关的 ROS 和 GSH 的相关基因在脑卒中中的基因集打分与表达差异进行评估,并免疫浸润分析、聚类分析及聚类后亚组相关特征差异分析。**结果:**线粒体相关的 ROS 和 GSH 基因集在正常组与脑卒中组中有表达差异,且两组免疫细胞与炎症因子表达水平具有较大不同。聚类分析分出的亚组 1 与亚组 2 在临床表型特征、基因表达水平、免疫细胞比例、炎症因子水平及蛋白富集等方面均具有一定不同。**结论:**线粒体相关的 ROS 和 GSH 相关基因在脑卒中的免疫中发挥重要作用,且其关键基因的表达水平不同或可影响不同的免疫途径与临床表型特征。

关键词:线粒体;活性氧;谷胱甘肽;脑卒中;生物信息学;免疫浸润

中图分类号:R734.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2024)23-4595-06

Explore the Pathogenesis of Stroke Based on Mitochondrial Related Reactive Oxygen Species and Glutathione*

ZHANG Hong-yu, MEN Wei-ye, XIONG Zi-yi, SONG Wen-jun, DANG Xue, YING Zhen-hao[△]

(School of Rehabilitation, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Ji'nan, Shandong, 250355, China)

ABSTRACT Objective: To explore the role and clinical significance of mitochondria related reactive oxygen species (ROS) and glutathione (GSH) related genes in stroke based on bioinformatics, and to screen the key genes. **Methods:** Stroke related targets were obtained by gene expression omnibus (GEO) database, and mitochondria related ROS and GSH were obtained by FerrDb database. R language was used to evaluate the gene set scores and expression differences of mitochondria associated ROS and GSH related genes in stroke, as well as immune infiltration analysis, cluster analysis and post-cluster subgroup related feature differences. **Results:** The expression of mitochondrial related ROS and GSH gene sets was different between the normal group and the stroke group, and the expression levels of immune cells and inflammatory factors were significantly different between the two groups. Subgroup 1 and subgroup 2 were different in clinical phenotype, gene expression level, proportion of immune cells, level of inflammatory factors and protein enrichment. **Conclusion:** Mitochondria-related ROS and GSH genes play an important role in the immunity of stroke, and the different expression levels of their key genes may affect different immune pathways and clinical phenotypes.

Key words: Mitochondria; Reactive oxygen species; Glutathione; Stroke; Bioinformatics; Immune infiltration

Chinese Library Classification(CLC): R734.2 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2024)23-4595-06

前言

线粒体是细胞进行有氧呼吸,制造能量的主要场所,大脑神经元细胞的产电活动主要依赖于线粒体通过电子传递链的氧化磷酸化产生 ATP 所提供的细胞生物能^[1]。值得注意的是,在脑卒中发生后,细胞会产生过量的 ROS 导致谷胱甘肽(GSH)等抗氧化物无法控制其引起的氧化损伤,使氧化应激增加并激活细胞凋亡的发生,最终引起脑组织的损伤^[2],并且这类

损伤会导致患者的感觉和认知运动功能衰弱且在很大程度上不可逆转地退化^[3]。由此可见,线粒体相关的 ROS 和 GSH 对脑卒中预后可能有着重大影响,因此,本研究希望能通过生物信息学从线粒体相关的 ROS 和 GSH 的角度明确脑卒中的治疗靶点,以期为临床治疗提供思路。

1 资料和方法

1.1 脑卒中数据集收集及预处理

* 基金项目:山东省中医药科技项目(2020M003)

作者简介:张鸿宇(2000-),男,在读硕士研究生,研究方向:神经、肌骨系统疾患的中医药防治与康复,E-mail: zhy250819@163.com

[△] 通讯作者:英振昊(1981-),男,硕士,副教授,硕士研究生导师,研究方向:神经、肌骨系统疾患的中医药防治与康复,

E-mail: yzhdoctor@163.com

(收稿日期:2024-05-16 接受日期:2024-06-18)

在 GEO 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gds/>) 中检索有关脑卒中的数据集,以 "脑卒中"、"人类" 作为筛选条件,获得数据集 GSE58294 与数据集 GSE16561,使用 R 语言 4.2.3 版本,利用其中的 limma 包完成所有数据集内部的标准化处理,以降低基因属性及测序深度的批次效应,并应用 log₂ 转化基因表达量。获得不同数据集之间共同存在的基因,不同数据集之间的去批次处理通过使用 SVA 包进行,将去批次前与去批次后的效果差异使用主成分分析(PCA)图来展示。

1.2 线粒体相关 ROS 和 GSH 的基因收集与单样本基因集富集分析(ssGSEA)

FerrDb 平台是一个标记因子及与铁死亡关联疾病、收集铁死亡调节因子的数据库,线粒体相关 ROS 和 GSH 的基因通过 FerrDb 平台 (<http://www.zhounan.org/ferrdb/>) 收集。这些基因在每个样本中的表达量通过使用 GSVA 包中的 ssGSEA 方法进行打分,并分析线粒体相关 ROS 和 GSH 的基因在正常组与脑卒中组的差异情况,以观察这些基因在正常组与脑卒中组中的整体表达差异。

1.3 线粒体相关 ROS 和 GSH 的基因集差异基因分析及关键基因的获取

线粒体相关 ROS 和 GSH 的基因集差异基因的分析通过使用 limma 包进行,差异基因的筛选标准为 $P_{adj} < 0.05$ 。并通过支持向量机(SVM)算法及随机森林(RF)算法对获取的线粒体相

关 ROS 和 GSH 的差异基因进行重要性排序,分别使用支持向量机算法及随机森林获得重要性排名前 15 的基因,两者取交集,获得的基因作为该疾病的关键基因,并分析关键基因及其在脑卒中样本之中的基因相关性。

1.4 免疫浸润分析

免疫浸润的结果通过 R 包 "CIBERSORT" 包来计算,求得每种炎症因子与免疫细胞在不同组别中的相对含量;利用该结果得到炎症因子和免疫细胞在不同组别之间的相对含量的差异,随后评估线粒体相关 ROS 和 GSH 的特征基因与免疫细胞之间的相关性。

1.5 聚类分析及聚类亚组信息比较

一致性聚类分析通过使用 Consensus Cluster Plus 包完成,并比较不同聚类亚组相关临床信息,观察不同组别的临床表型。随后选取不同组别的 $P_{adj} < 0.05$ 且 $|\log FC| \geq 0.5$ 的基因并转化为蛋白名称,并使用 proteomaps 数据库将其蛋白功能进行聚类。

2 结果

2.1 脑卒中数据集收集及预处理结果

下载数据集 GSE16561 与数据集 GSE58294,将两个数据集中脑卒中样本与正常样本进行数据集内部的标准化与数据集间的去批次处理,可知两个数据集的批次效应已经去除,可进行下一步的分析。如图 1 所示。

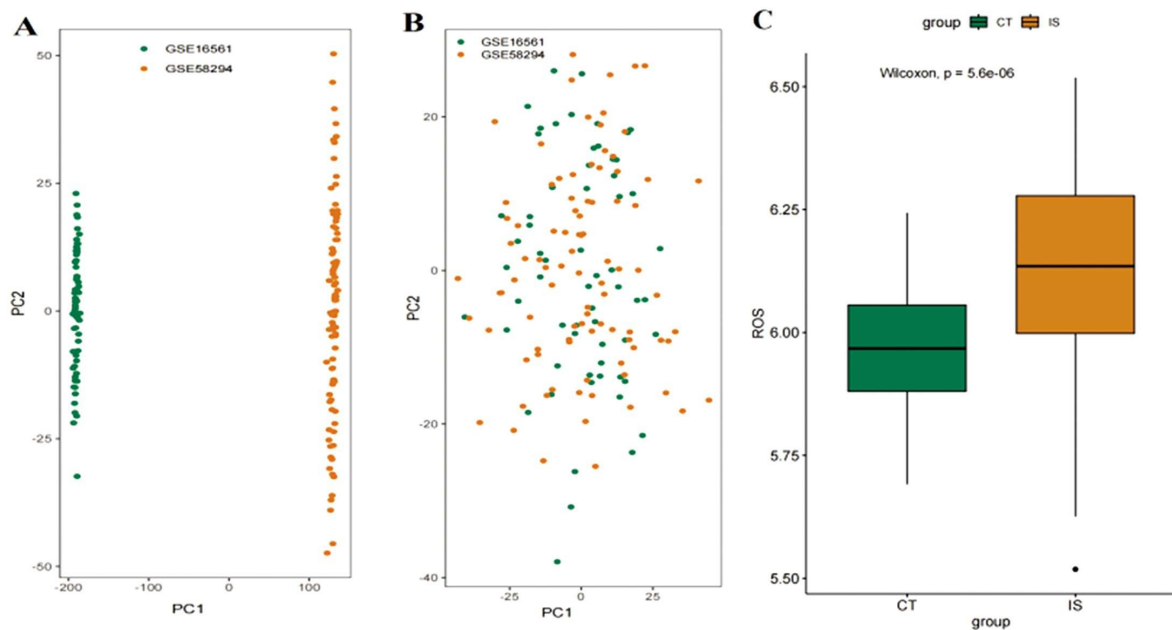


图 1 数据集去批次前后与 ssGSEA 分析结果

Fig.1 Data set before and after batch removal and ssGSEA analysis results

Note: Fig.A: PCA presentation of data before batch removal. Fig.B: PCA presentation of data after batch removal.

Fig. C: Differences in ssGSEA scores of mitochondria-related ROS and GSH genes between normal group and stroke group.

2.2 线粒体相关 ROS 和 GSH 的相关基因收集与 ssGSEA 分析结果

将在 FerrDb 网站获得的在整合的数据集中存在相关信息的基因使用 GSVA 包中的 ssGSEA 方法,对正常组与脑卒中组进行 Wilcoxon 分析,可知线粒体相关 ROS 和 GSH 的相关基因在脑卒中组中表达较高,具有统计学差异 ($P < 0.05$)。如图 1 所示。

2.3 线粒体相关 ROS 和 GSH 的基因集差异基因分析及关键基因的获取结果

进行差异分析后,使用 SVM 算法获得的前 15 个关键基因为 GPX4、SOD1、MSRB2、MGST1、MSRA、TXN2、NIT1、PRDX3、PRDX2、PRDX5、TXNRD1、GPX1、SOD2、ALDH9A1、HAGH,随后使用 RF 算法对基因的重要性进行排序,结果通过使用 Mean Decrease Gini 展示如下。将 SVM 算法与 RF 算法的重要

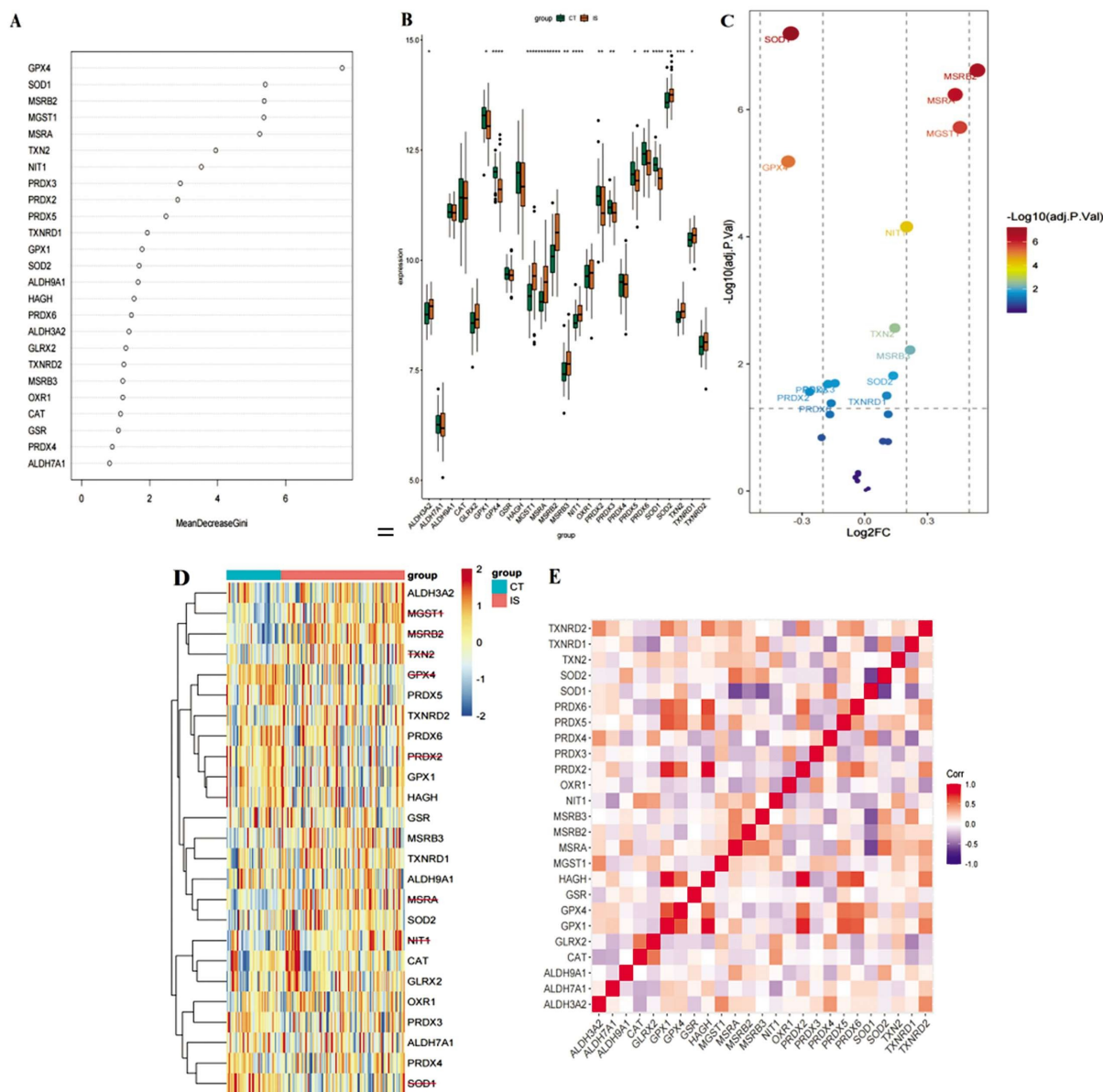


图 2 基因重要性排序及差异基因分析

Fig. 2 Sequencing of gene importance and analysis of differential genes

Note: Fig.A: Random Forest algorithm gene importance ranking. Figure B: Expression difference of key genes in normal group and IS group Boxplot.

Fig. C: Differential gene volcano map. Fig. D: Differential gene heat map. Fig. E: IS sample key gene correlation heat map.

性前 15 的基因取交集,作为该疾病的关键基因,关键基因为: GPX4, MGST1, MSRA, MSRB2, NIT1, PRDX2, SOD1, TXN2。由箱线图可知,关键基因的表达在两组样本中均具有统计学差异 ($P < 0.05$)。由基因相关性热图可知,8 个关键基因在脑卒中样本中, MGST1 与 MSRB2 正相关性最强,而负相关性最强的则是 SOD1 与 NIT1 基因。如图 2 所示。

2.4 免疫浸润分析结果

通过免疫浸润分析发现, T 细胞、CD8T 细胞、髓样树突状细胞在脑卒中组中相对含量较低, 而细胞毒性淋巴细胞、B 系细胞、自然杀伤细胞、巨噬细胞与中性粒细胞在脑卒中组中相对含量较高。CD4, IFNA1, IL11 与 IL5 在脑卒中组相对含量较低, IL15, IL4, IL6 在脑卒中组相对含量较高。且 8 个关键基因均与多种免疫细胞和炎症因子存在较为显著的相关性, 证明或可通过这些关键基因调节疾病免疫相关表型。如图 3 所示。

2.5 聚类分析及聚类亚组信息比较结果

根据 8 个关键基因的表达量使用 R 语言的 Consensu Cluster Plus 包对脑卒中样本进行聚类分析, 可将样本分为亚组 1 和亚组 2。由图可知, 脑卒中样本在亚组 1 中男性与女性发病数量等同, 而亚组 2 则大多为女性。且 MSRA, MSRB2, MGST1, NIT1, TXN2 基因在亚组 1 中相对表达较低, GPX4, PRDX2 则在亚组 1 中相对表达较高, 这些基因的表达差异可能与亚组的临床表型具有一定的关联性。除此之外, T 细胞、CD8T 细胞与髓样树突状细胞在亚组 1 中相对含量较高, 而细胞毒性淋巴细胞、B 系细胞、自然杀伤细胞、巨噬细胞与中性粒细胞则在亚组 2 中相对含量较高。从炎症因子层面进行分析, 则 CD4, CSF2, CSF3, IFNA1, IL11, IL13, IL3, IL5, IL6, PDGFA, TGFB1, TGFB2, TGFB3 与 TNF 在亚组 1 中相对含量较高, 而 HLA-DRB4, IFNG, IL10, IL15, IL1A, IL2, IL4, IL6 与 IL7 在亚组 2 中相对含量较高。如图 4、图 5 所示。

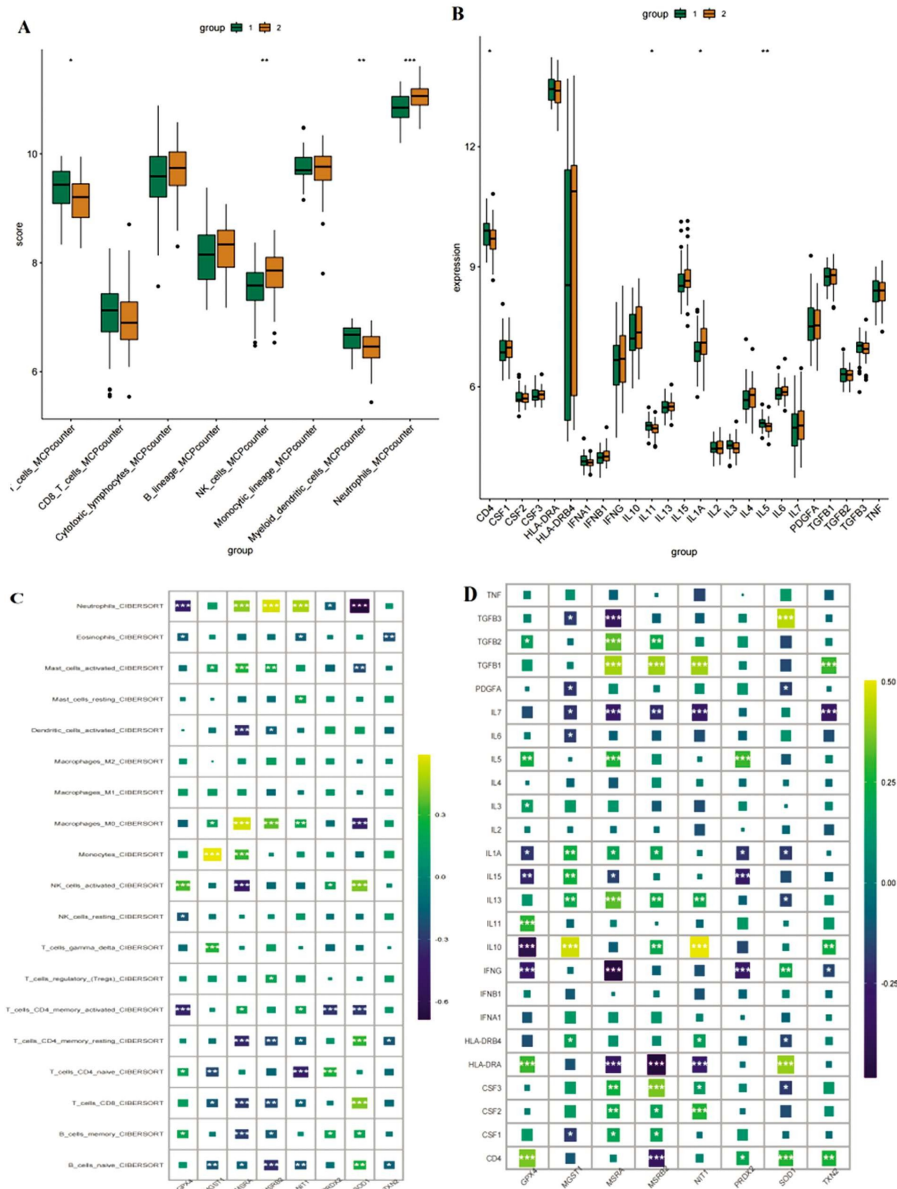


图 3 免疫浸润分析

Fig. 3 Analysis of immune infiltration

Note: Fig. A: Difference in the content of immune cells between the normal group and the stroke group. Fig. B: Difference in the content of inflammatory factors between the normal group and the stroke group. Fig. C: Heat map of the correlation between immune cells and key genes.

Fig. D: Heat map of the correlation between inflammatory factors and key genes.

3 讨论

本文结果发现,在脑卒中中与线粒体相关 ROS 及 GSH 发挥关键作用的基因可能包括:GPX4、MGST1、MSRA、MSRB2、NIT1、PRDX2、SOD1、TXN2 等,8 个关键基因在脑卒中样本中,MGST1 与 MSRB2 正相关性最强,而负相关性最强的则是 SOD1 与 NIT1 基因。MGST1 编码的蛋白质是细胞内可以催化 GSH 与脂质氢过氧化物发生还原反应的酶,其在细胞铁死亡的过程中可以减少过氧化脂质的产生^[4]。此外,线粒体内膜中的 MGST1 可以与线粒体通透性转换调节蛋白相互作用,减少 ROS 对线粒体通透性孔氧化应激诱导的影响,防止进一步引起线粒体功能障碍导致的细胞凋亡和坏死死亡^[5]。MSRA 编码是一种普遍存在且高度保守的蛋白质,它是已知唯一能够还原蛋

氨酸-S-亚砷的酶,而 MSR 蛋白家族中另一种蛋白质 MSRB2 专门用于还原蛋氨酸-R-亚砷^[6],这两种蛋白通过定向清除蛋氨酸-R,S-亚砷来支持氧化蛋白修复和蛋氨酸代谢功能,进而减少 ROS 对蛋氨酸残基的氧化所可能导致的蛋白质功能丧失和结构变化^[7]。SOD1 是一种保护细胞免受超氧自由基有害影响的关键抗氧化酶,在脑卒中发生后,超氧自由基的产生是加重脑损伤的重要原因,其高反应性引起脂质、DNA 和蛋白质的损伤,最终导致神经元死亡^[8],而 SOD1 对超氧自由基的清除作用可能是保护线粒体功能的重要途径,以减轻脑卒中后 ROS 对神经元细胞的损伤。NIT1 主要存在于胞质溶胶和线粒体中,它具有修复代谢物的功能,可以催化脱氨谷胱甘肽中酰胺键的水解,以处理有害的脱氨谷胱甘肽^[9]。NIT1 对脱氨谷胱甘肽的修复作用可以增强脱氨谷胱甘肽的代谢,这可能是维持脑卒中

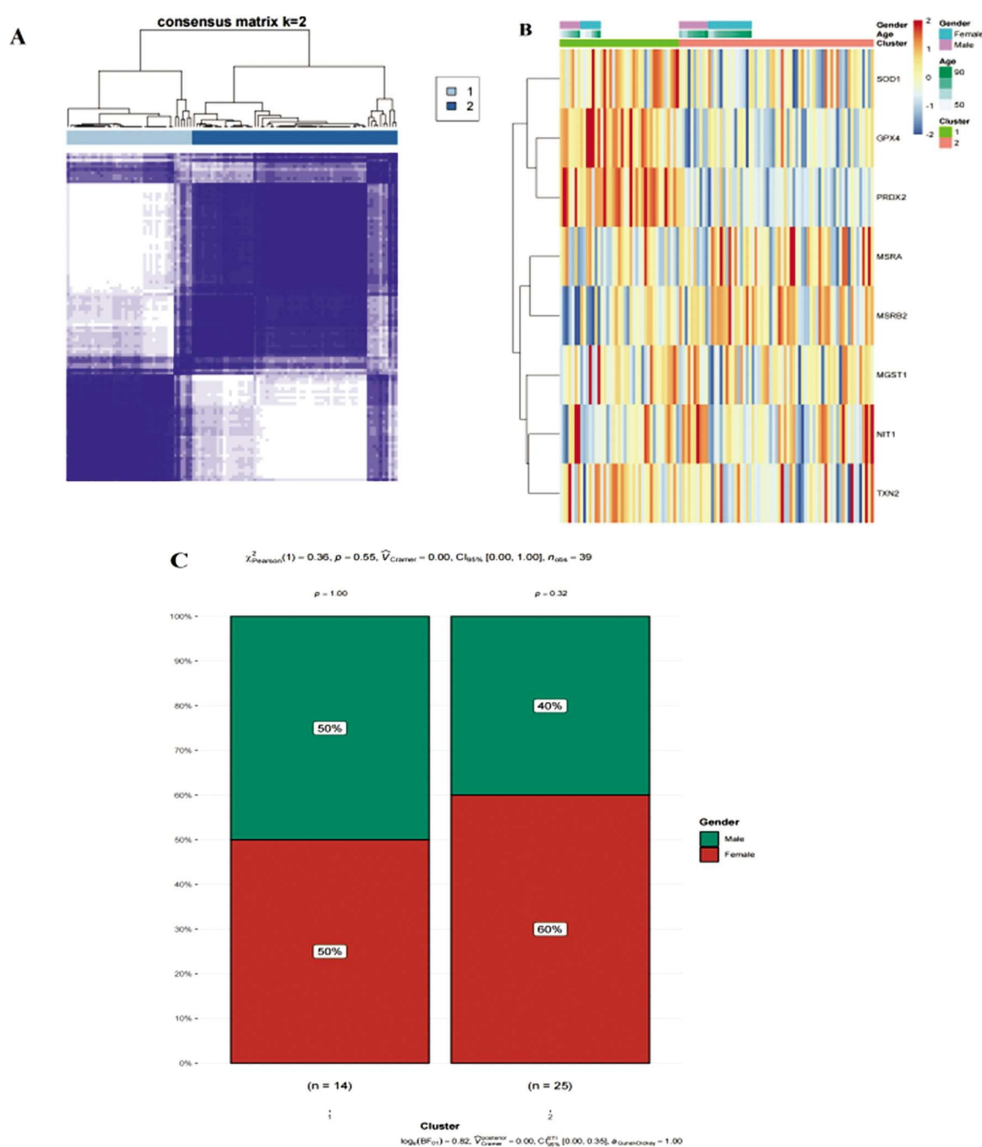


图 4 聚类及亚组临床特征分析

Fig. 4 Clustering and subgroup analysis of clinical features

Note: Fig.A: Cluster classification results of key genes (1-cluster 1,2-Cluster 2).

Fig.B: Subgroup and clinical information, gene expression calorimetry map. Fig. C: Subgroup sex histogram.

后谷胱甘肽氧化还原系统稳定的关键,因此,NIT1 可能是减轻脑卒中后氧化应激损伤的重要治疗靶点。

同时, 线粒体相关的 ROS 和 GSH 亦与免疫密切相关,脑卒中发生后由其诱导的氧化应激反应与免疫反应密切相关^[10], 研究表明, 炎症和氧化应激是中风后损伤的主要原因,线粒体相关 ROS 与 GSH 之间失衡所导致的氧化应激会进一步诱发炎症^[11],且有研究表明线粒体相关的 ROS 与 GSH 在免疫反应中起着直接作用^[12]。CD8 T 细胞作为免疫系统的关键组成部分,其功能失调可能引发过度的免疫反应,从而导致免疫介导的机体损伤或病理反应。CD8 T 细胞的胞内结构域上附着结合着 Src 酪氨酸激酶家族的成员淋巴特异性 Src 激酶 p56(Lck), Lck 已被证明其可以通过触发线粒体细胞色素 c 释放和半胱天冬酶活化,参与线粒体细胞凋亡途径的激活^[13]。此外,CD8 T 细胞可以促进 Lck 激活 T 细胞受体(TCR),参与 T 细胞的活化,启动适应性免疫应答,引起整体神经炎症水平的升高,加重缺血性脑卒中中的神经损伤^[14]。并且,通过观察卒中后小鼠的大

脑组织, 中风侧大脑可以观察到免疫细胞的大量浸润,CD8 T 细胞的百分比显著增加,加重了脑卒中后继发性神经变性介导的神经元细胞死亡^[15]。

综上所述, 本研究采用生物信息学方法对 GEO 数据库的脑卒中数据进行分析,以线粒体相关的 ROS 和 GSH 作为切入点,从而得出线粒体相关 ROS 和 GSH 与脑卒中中具有显著的相关性,为治疗脑卒中提供新的思路和方法。

参考文献 (References)

[1] Fairley LH, Grimm A, Eckert A. Mitochondria Transfer in Brain Injury and Disease[J]. Cells, 2022, 11(22): 3603.

[2] Labarrere CA, Kassab GS. Glutathione: A Samsonian life-sustaining small molecule that protects against oxidative stress, ageing and damaging inflammation[J]. Front Nutr, 2022, 9: 1007816.

[3] Ionescu-Tucker A, Cotman CW. Emerging roles of oxidative stress in brain aging and Alzheimer's disease [J]. Neurobiol Aging, 2021, 107: 86-95.

[4] Dodson M, Anandhan A, Zhang DD. MGST1, a new soldier of NRF2

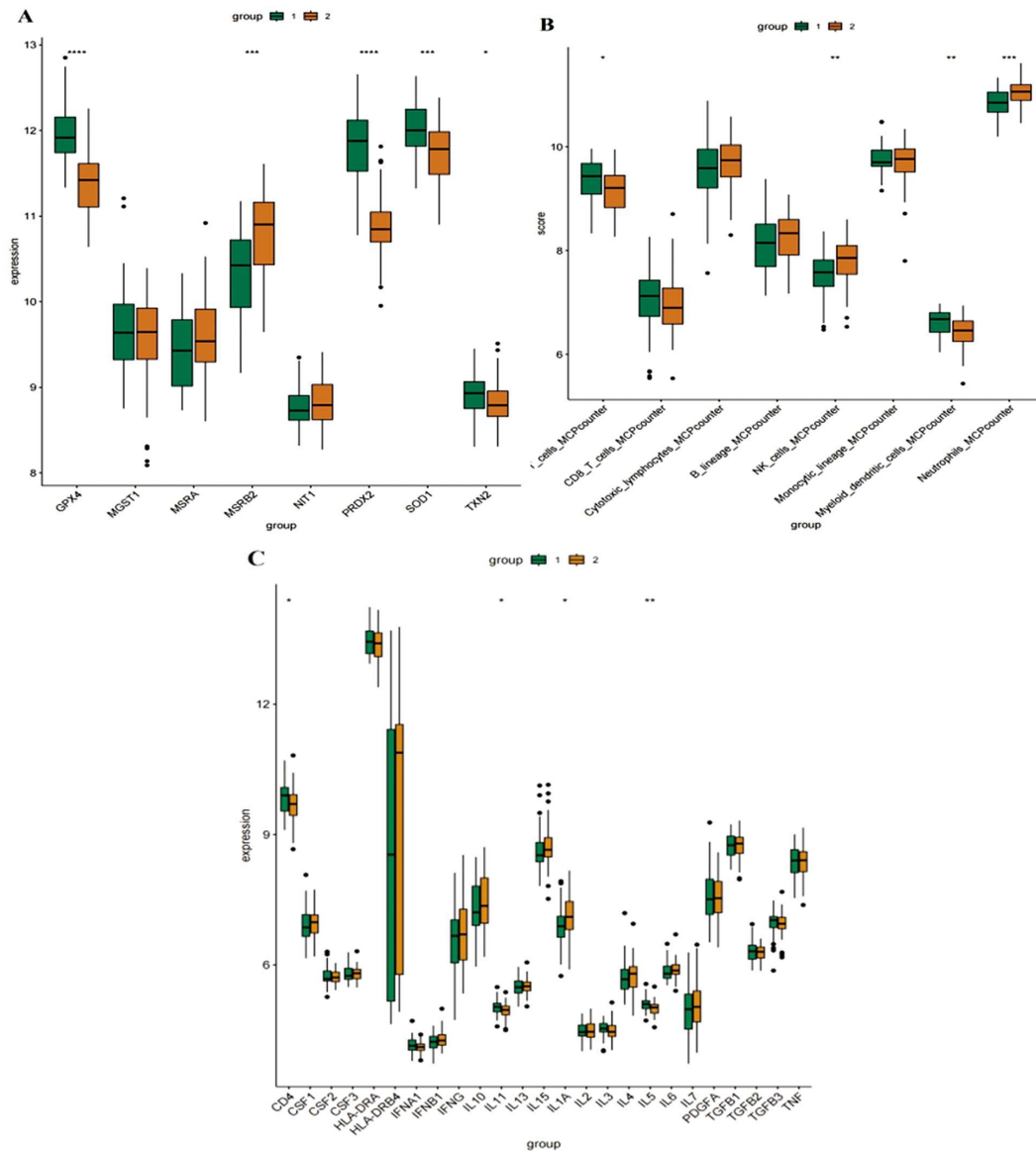


图 5 亚组关键基因及免疫浸润差异

Fig.5 Differences of key genes and immunoinfiltration in subgroups

Note: Fig.A: Subgroup key gene expression differences. Fig. B: Subgroup immune cell content difference.

Fig. C: The content of inflammatory cytokines was different in subgroups.

in the battle against ferroptotic death[J]. *Cell Chem Biol*, 2021, 28(6): 741-742.

[5] Aniya Y, Imaizumi N. Mitochondrial glutathione transferases involving a new function for membrane permeability transition pore regulation[J]. *Drug Metab Rev*, 2011, 43(2): 292-299.

[6] Shi T, Song J, You G, et al. The Function of Selenium in Central Nervous System: Lessons from MsrB1 Knockout Mouse Models[J]. *Molecules*, 2021, 26(5): 1372.

[7] Tarrago L, Kaya A, Kim HY, et al. The selenoprotein methionine sulfoxide reductase B1 (MSRB1)[J]. *Free Radic Biol Med*, 2022, 191: 228-240.

[8] Sorby-Adams A, Prime TA, Miljkovic JL, et al. A model of mitochondrial superoxide production during ischaemia-reperfusion injury for therapeutic development and mechanistic understanding[J]. *Redox Biol*, 2024, 72: 103161.

[9] Niehaus TD, Patterson JA, Alexander DC, et al. The metabolite repair enzyme Nit1 is a dual-targeted amidase that disposes of damaged glutathione in Arabidopsis[J]. *Biochem J*, 2019, 476(4): 683-697.

[10] Cao Y, Yue X, Jia M, et al. Neuroinflammation and anti-inflammatory therapy for ischemic stroke[J]. *Heliyon*, 2023, 9(7): e17986.

[11] Teleanu DM, Niculescu AG, Lungu II, et al. An Overview of Oxidative Stress, Neuroinflammation, and Neurodegenerative Diseases[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(11): 5938.

[12] Muri J, Kopf M. Redox regulation of immunometabolism[J]. *Nat Rev Immunol*, 2021, 21(6): 363-381.

[13] Zhang J, Wu YJ, Hu XX, et al. New insights into the Lck-NF-κB signaling pathway[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2023, 11: 1120747.

[14] Iqneibi S, Saigusa R, Khan A, et al. Single cell transcriptomics reveals recent CD8T cell receptor signaling in patients with coronary artery disease[J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1239148.

[15] Jones KA, Maltby S, Plank MW, et al. Peripheral immune cells infiltrate into sites of secondary neurodegeneration after ischemic stroke[J]. *Brain Behav Immun*, 2018, 67: 299-307.