

利用综合生物信息学技术分析识别强直性脊柱炎 相关葡萄膜炎的关键基因

赵莹^{1,2}, 海环玥^{1,2}, 张晶²

1. 电子科技大学医学院, 四川 成都 610054; 2. 四川省医学科学院·四川省人民医院(电子科技大学附属医院)风湿免疫科, 四川 成都 610072

【摘要】目的 探讨从转录组水平识别强直性脊柱炎(AS)相关葡萄膜炎的生物标志物及潜在机制。**方法** 使用 Illumina HiSeq X Ten 平台对来自 4 例 AS 相关葡萄膜炎患者和 3 例性别及年龄匹配的健康对照组(HCs)的全血样本进行转录组测序。利用 R Studio 4.1.0 分析患者与对照组之间的差异表达基因(DEGs), 并生成热图。通过 KEGG 通路富集分析和 GO 富集分析对 DEGs 进行功能注释及通路分析。利用 STRING 数据库构建蛋白-蛋白相互作用(PPI)网络, 并使用 Cytoscape 软件进行可视化。最后通过定量实时 PCR(qRT-PCR)验证筛选出的关键基因。**结果** Cytoscape 插件使用 EPC 方法筛选出 10 个关键基因。在筛选条件(|Log₂ Fold Change| > 2, P < 0.05)下, 检测到 82 个上调基因和 30 个下调基因(共 112 个)。选取 5 个基因通过 qRT-PCR 进行验证, 结果显示 C1QTNF4 和 NFKBIZ 为重要的关键基因。**结论** 识别出的 DEGs 和关键基因有助于理解 AS 相关葡萄膜炎的分子机制。

【关键词】 强直性脊柱炎相关葡萄膜炎; 生物信息学; 差异表达基因; 关键基因

【中图分类号】 R593.23

【文献标志码】 A

【文章编号】 1672-6170(2026)01-0085-07

Identification of hub genes in ankylosing spondylitis associated uveitis using integrated bioinformatics analysis ZHAO Ying^{1,2}, HAI Huan-yue^{1,2}, ZHANG Jing² 1. School of Medicine, University of Electronic Science and Technology of China, Chengdu 610054, China; 2. Department of Rheumatology and Immunology, Sichuan Academy of Medical Sciences & Sichuan Provincial People's Hospital (Affiliated Hospital of University of Electronic Science and Technology of China), Chengdu 610072, China

【Corresponding author】 ZHANG Jing

【Abstract】Objective To identify biomarkers and the underlying mechanisms of ankylosing spondylitis (AS)-related uveitis at the transcriptome level. **Methods** Whole blood samples were collected from four patients with AS-related uveitis, and three sex- and age-matched healthy controls (HCs) were analyzed using the Illumina HiSeq X Ten platform for transcriptome sequencing. The differentially expressed genes (DEGs) between AS-related uveitis patients and HCs were profiled using R Studio 4.1.0, and a heat map was generated. KEGG pathway enrichment analysis and GO enrichment analysis of DEGs were performed to reveal the functional annotation and pathway of DEGs. The STRING database was used to establish a protein-protein interaction (PPI) network and Cytoscape software to visualize the PPI network. Finally, the screened hub genes were verified using quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR). **Results** Cytoscape plug-in selected 10 key genes obtained by EPC method. Under selection conditions (|Log₂ Fold Change| > 2 and p-value < 0.05), 82 upregulated genes and 30 downregulated genes (n = 112) were detected. Five genes were selected to verify by using qRT-PCR analysis. This indicated that C1QTNF4 and NFKBIZ were most important key genes. **Conclusions** The identified DEGs and hub genes help us to understand the molecular mechanisms underlying AS-related uveitis.

【Key words】 AS-related uveitis; Bioinformatics; Differentially expressed genes; hub genes

强直性脊柱炎(AS)是一种与自身免疫系统密切相关的慢性进展性疾病。AS 患者主要受累于骶髂关节和中轴骨骼(脊柱), 其次是外周关节及其他关节外器官, 包括心血管系统、眼睛和皮肤^[1,2]。长期随访研究发现, 急性前葡萄膜炎(acute anterior uveitis, AAU)是最常见的关节外表现, 发生率可高达 40%。AAU 通常与 HLA-B27 表达相关^[3-6]。反复发作的 AAU 可能导致青光眼、白内障以及严重的视力损害。近年来, 微阵列技术作为功能基因组研究中的重要技术, 对探索多种疾病的致病过程提供了帮助^[6-8]。迄今为止, 通过微阵列技术已识别出多种与 AAU 相关的免疫位点, 包括 HLA-B 和 HLA-

B27。此外, 已有报道指出三个位于非 MHC 区域的位点(ERAP1、IL23R 和染色体间区域 2p15)在全基因组水平上与 AS 相关^[9-11]。然而, AS 相关葡萄膜炎中基因和蛋白表达的致病作用仍不明确。因此, 我们通过全血基因表达谱分析, 采用生物信息学方法比较 AS 相关葡萄膜炎患者与健康对照之间的差异表达基因。为了预测和发现这些差异表达基因(DEGs)之间的关系, 我们构建了蛋白-蛋白相互作用(PPI)网络。此外, 还通过模块挖掘和功能注释对 DEGs 的相互作用网络进行评估。最终, 选取 5 个基因并通过定量实时 PCR(qRT-PCR)进行验证。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2021 年 1 月至 2022 年 12 月在四川省人民医院就诊的 7 例受试者, 其中包括 4 例 AS 相关葡萄膜炎患者和 3 例健康对照者。所有 AS

【基金项目】 四川省科技厅重点研发项目(编号:2021YFS0165)

【通讯作者】 张晶

患者均符合修订的纽约诊断标准^[12]。AS 相关葡萄膜炎的评估基于眼科医生的诊断。这 4 例急性前葡萄膜炎(AAU)患者均处于 AS 和葡萄膜炎的活动期。

1.2 RNA 提取与文库构建 使用 TRIzol 试剂从样本中提取总 RNA,通过 NanoDrop 2000 分光光度计(ThermoScientific, USA)测定 RNA 纯度与浓度,并使用 Agilent 2100 生物分析仪(Agilent Technologies, USA)评估 RNA 完整性。随后采用 TruSeq Stranded mRNA LT 文库制备试剂盒(Illumina, USA)构建文库,转录组测序由上海欧易生物医学科技有限公司完成。

1.3 差异表达基因(DEGs)的分析 去除低质量读数后,有效读数通过 HISAT2 比对至人类参考基因组 GRCh38。用 Cufflinks 计算每个基因的 FPKM 值,并用 HTSeqcount 获取基因的读数^[13-15]。差异表达分析采用 DESeq R 软件包完成^[16]。筛选标准为 $P < 0.05$, $\log_2\text{FoldChange} > 2$ 或 $\log_2\text{FoldChange} < -2$ 的基因定义为差异表达基因(DEGs)。

1.4 DEGs 的功能注释和通路分析 通过对差异表达基因(DEGs)进行层次聚类分析展示了组间及样本基因的表达模式。为了探索差异表达基因(DEGs)潜在相关的生物学过程,本研究分别利用 R 包和 Metascape 在线工具(<https://metascape.org/>)进行了 KEGG 通路分析和 GO 功能富集分析^[17]。

1.5 PPI 网络分析及关键基因的获取 利用 STRING 数据库(版本 11.0, <https://string-db.org/>, 中等置信度=0.04)和 Cytoscape 软件(版本 3.8.2)分别对 DEGs 编码蛋白的 PPI 网络进行了分析与可视化。基因节点通过 cytoHubba 插件和拓扑分析方法进行分析,结果显示通过 EPC 方法获得了 10 个关键基因^[18, 19]。

1.6 qRT-PCR 按照既往方法提取总 RNA。使用 SYBR Prime Script RT-PCR 试剂盒(TaKaRa, 日本)扩增目标基因和 GAPDH,依据生产商说明,利用 Rotor-Gene 6000 实时基因分析仪(Corbett Life Science, 美国)进行 qRT-PCR 反应。反应条件为:95 °C 变性 2 分钟,随后 95 °C 5 秒,55~57 °C 30 秒循环 40 次。熔解曲线范围为 55~95 °C,每个循环温度递增 0.5 °C。本研究中所有样本均重复分析三次,反应结束后使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行相对定量分析。选取 5 个基因进行验证,其基因扩增的引物如下: OSM forward: 5'-GAGCAGCTGACAAGGTCTGG-3', OSM reverse: 5'-CTGTCTGCTTCTGGAGCTGG-3'; HLA-DRB5 forward: 5'-GACTTCACCCAACAGGACTCGT-3', HLA-DRB5 reverse: 5'-TAGCAACCAGGGCCTGAGAA-3'; C1QTNF4 forward: 5'-ACAGCAGCCTAGAGAAAGGG-3', C1QTNF4 reverse: 5'-GCCGACAGGGTGCAGAG-3';

NFKBIZ forward: 5'-TGCTGTCACGTACTIONTGGGTT-3', NFKBIZ reverse: 5'-CCATATGGGGCTCAACCTCG-3'; CD276 forward: 5'-GAGGAGGAGAATGCAGGAGC-3', CD276 reverse: 5'-TGTCCTCATGCTCAGGCTA-3'; GAPDH Forward: 5'-CACGAATUATTCAACGGTTCGATCAAGG-3', GAPDH reverse: 5'-GTTTACACCCATCAAAACATGG-3'。

1.7 统计学方法 采用 Cufflinks 计算 FPKM 值对测序数据进行标准化,并使用 DESeq R 包筛选差异表达基因(标准设定为 $|\log_2\text{FC}| > 2$ 且 $P < 0.05$)。功能注释采用 Metascape 进行 GO 和 KEGG 通路富集分析。网络拓扑分析运用 Cytoscape 中的 EPC 算法鉴定出前 10 个核心基因。

2 结果

2.1 DEGs 的鉴定 如火山图(图 1)和热图(图 2)所示,在 4 例 AS 相关性葡萄膜炎患者和 3 例健康对照中,共检测到 14607 个差异表达基因(DEGs),其中 7205 个基因上调表达,7402 个基因下调表达。其中,82 个上调基因和 30 个下调基因(共计 112 个)符合 $|\log_2\text{FoldChange}| > 2$ 且 $P < 0.05$ 的标准,并被纳入后续分析。前 10 个上调和下调基因的表达谱分别见表 1 和表 2。

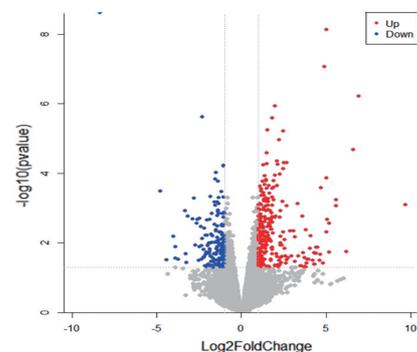


图 1 DEGs 火山图 红色标记 $\log_2\text{FC} > 2$ 的上调基因,蓝色标记 $\log_2\text{FC} < -2$ 的下调基因。DEGs:差异表达基因;FC:差异倍数

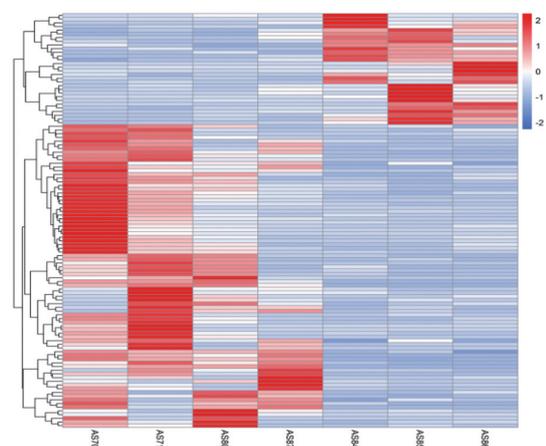


图 2 7 例样本中前 112 个差异表达基因热图

表 1 前 10 位下调基因

基因	基因描述	基础均值	log2FC	P
SPDYC	speedy/RINGO 细胞周期调控因子家族成员 C	15. 68919769	-4. 790922691	0. 000319414
CCL8	C-C 基序趋化因子配体 8	1. 806601731	-4. 420498218	0. 030259081
TREM2	髓系细胞触发受体 2	2. 246677170	-3. 908638764	0. 026867712
SMOC1	SPARC 相关模块化钙结合蛋白 1	2. 032600323	-3. 753750952	0. 029691416
EPHX4	环氧化物水解酶 4	6. 652989889	-3. 343048263	0. 001183459
DPYS	二氢嘧啶酶	4. 719788649	-3. 280141243	0. 020227451
GPM6A	糖蛋白 M6A	2. 501085869	-3. 253396127	0. 036972097
HLA-DRB5	主要组织相容性复合体 II 类 DRβ5	1206. 446048000	-3. 159316785	0. 001698632
DCLK2	类双皮质蛋白激酶 2	6. 776378776	-2. 871022038	0. 002019866
FILIP1L	与肌动蛋白相互作用的蛋白 1 类似物	16. 441937120	-2. 793135480	0. 000504040

RINGO: 卵母细胞中 G2/M 期进程的快速诱导因子 (Rapid Inducer of G2/M progression in Oocytes), SPARC: 富含半胱氨酸的酸性分泌蛋白 (Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine)

表 2 前 10 位上调基因

基因	基因描述	基础均值	log2FC	P
TREML4	髓系细胞触发受体样蛋白 4	150. 43643620	9. 686510802	0. 000778240
KRT19	角蛋白 19	11. 42107196	6. 922860175	0. 000000595
C11orf42	染色体 11 开放阅读框 42	9. 14707449	6. 594815133	0. 000020800
BTNL3	类丁型蛋白 3	118. 30391230	6. 204432153	0. 017870261
LOC101927345	假性锚蛋白重复结构域蛋白 20A12	4. 57695101	5. 590050611	0. 000567716
ADARB2	腺苷脱氨酶 RNA 特异 B2(非活性)	76. 58436881	5. 575993957	0. 000852560
SERPINA6	丝氨酸蛋白酶抑制剂 A 6	3. 42396687	5. 190241832	0. 018594549
FGF8	成纤维细胞生长因子 8	3. 37861543	5. 172682604	0. 002683411
CXCL2	C-X-C 基序趋化因子配体 2	168. 9677091	5. 041476631	0. 002092525
FAT1	FAT 非典型钙粘附蛋白 1	22. 65280049	5. 009789118	7. 12E-09

FAT: 果蝇中首次发现的肿瘤抑制基因, 编码一种非典型钙粘附蛋白

2.2 DEGs 的 GO 与 KEGG 富集分析 在 GO 分析中, 主要术语包括分子功能 (molecular function)、生物过程 (biological processes) 和细胞组分 (cellular components)。在生物过程中, 最显著的 GO 术语包括细胞对生物刺激的响应、炎症反应正调控、白细胞活化调控、MAPK 级联正调控、骨骼系统形态发生、细胞间粘附负调控、细胞内受体信号通路、上皮细胞分化、细胞组分形态发生、脑发育及神经元死亡调控。在细胞组分方面, 最显著

的 GO 术语为质膜锚定结构、网格蛋白包被内吞囊泡、高尔基体扁平膜。在分子功能方面, 最显著的 GO 术语为细胞因子活性、14-3-3 蛋白结合、蛋白质同源二聚化活性、钙依赖性蛋白结合以及羧酸结合。见图 3。KEGG 分析显示, 富集最显著的通路包括趋化因子信号通路、破骨细胞分化、细胞因子-细胞因子受体相互作用、NOD 样受体信号通路、NF-κB 信号通路、癌症转录失调、甲型流感以及 IL-17 信号通路 (图 4)。

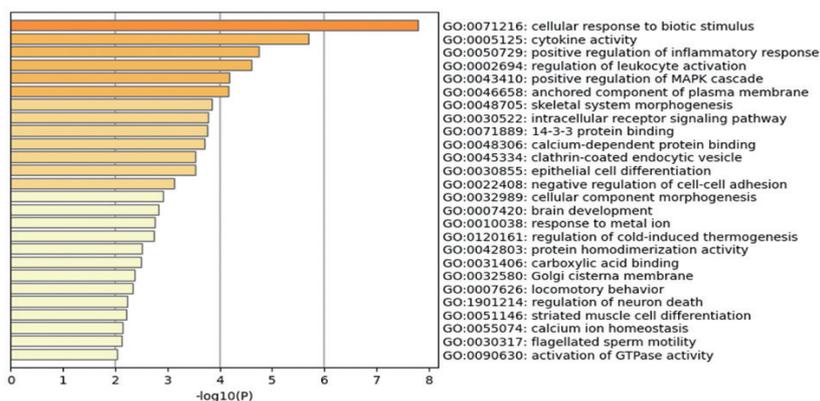


图 3 差异表达基因 (DEGs) 的 GO 富集分析

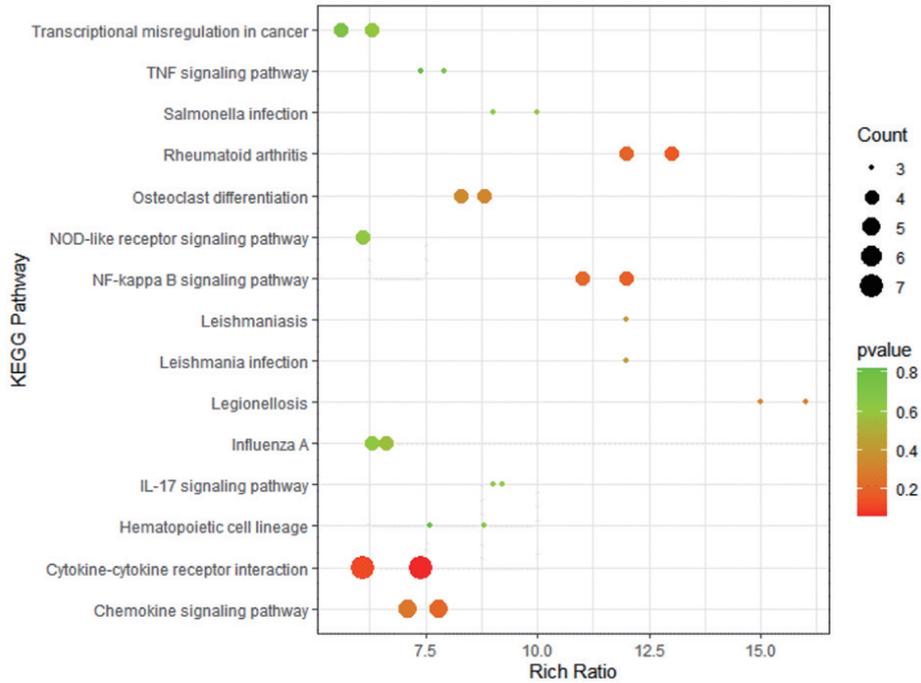


图 4 差异表达基因 (DEGs) 的 KEGG 富集分析

2.3 PPI 网络构建与核心基因 PPI 网络中检测到 49 个节点和 66 个关系对。结合 DEGs 分析, 网络中上调蛋白以红色表示, 下调蛋白以绿色表示 (图 5)。CytoHubba 提供了包括 MCC、MNC、Degree、

Closeness、Radiosity、Stress 和 EPC 在内的 11 种拓扑分析方法。通过 EPC 方法筛选出 10 个核心基因: CXCL8、CXCL2、NFKBIA、NFKBZ、IL1A、IL11、OSM、KRT19、EPCAM 和 PGR (图 6)。

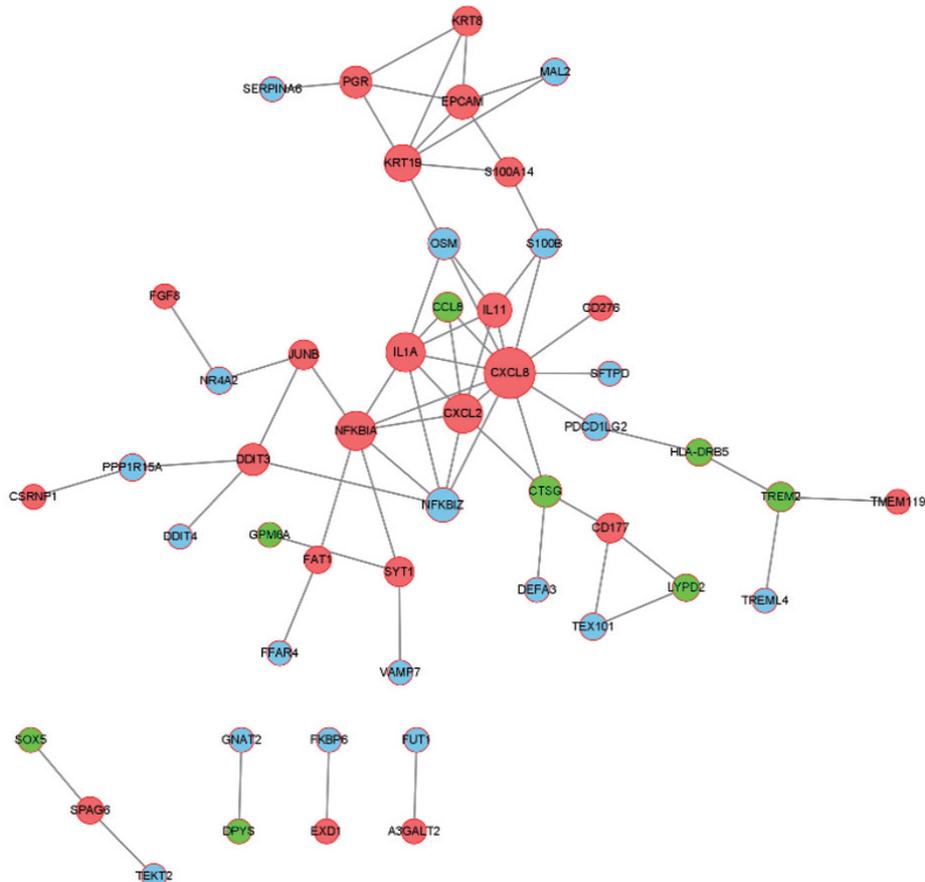


图 5 AAU 患者与健康对照者 DEGs 的蛋白质-蛋白质相互作用分析

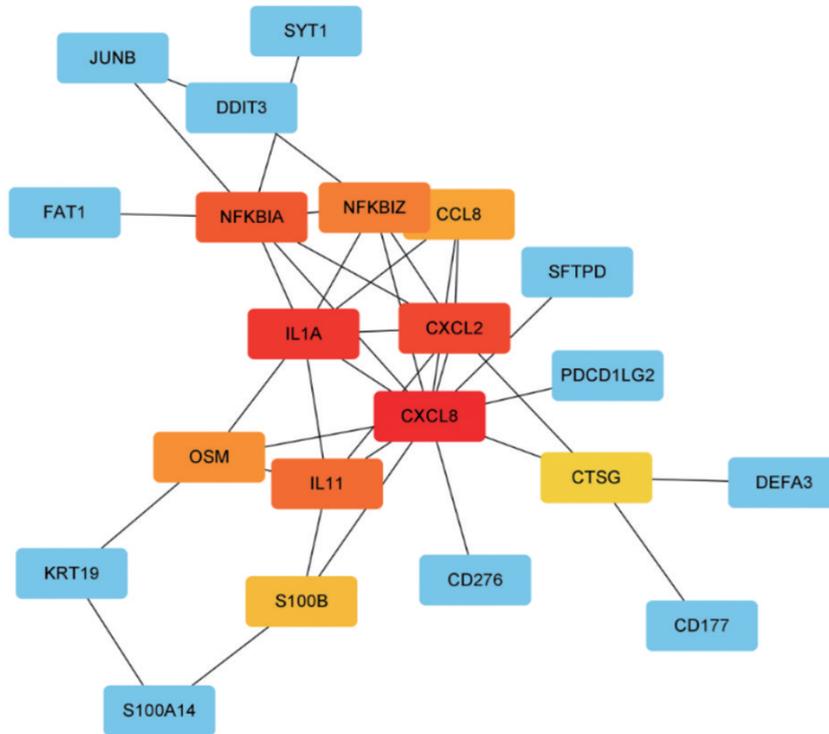


图 6 橙色和红色方框标注通过 cytoHubba 插件 EPC 算法筛选出的前 10 个核心基因

2.4 实时荧光定量聚合酶链式反应 在国家生物技术信息中心 (NCBI) 数据库中检索了符合 $|\log_2\text{FoldChange}| > 2$ 且 $P < 0.05$ 标准的基因信息, 优先 TNF/NF- κ B 通路相关、既往研究较少的基因、在自身免疫性疾病的遗传关联性, 从全基因组差异表达分析中排名前 100 的基因中选取了 5 个候选基因 (OSM、HLA-DRB5、C1QTNF4、NFKBIZ 和 CD276) 进行验证。由于样本量较小且分布不服从正态 (Kol-

mogorov-Smirnov 检验, $P < 0.05$), 数据使用中位数 (四分位距) 表示, 采用 Mann-Whitney U 检验进行两组间比较。qRT-PCR 结果表明, 与健康对照相比, NFKBIZ 在 AS 相关性葡萄膜炎患者中的表达显著上调 (中位数: 14.10 vs 2.35, 差值 11.75, $P < 0.0001$), 而 C1QTNF4 在患者中的表达显著下调 (中位数: 0.41 vs 17.89, 差值 17.48, $P < 0.0001$), 其变化幅度和统计学显著性均显著高于其他检测基因 (图 7)。

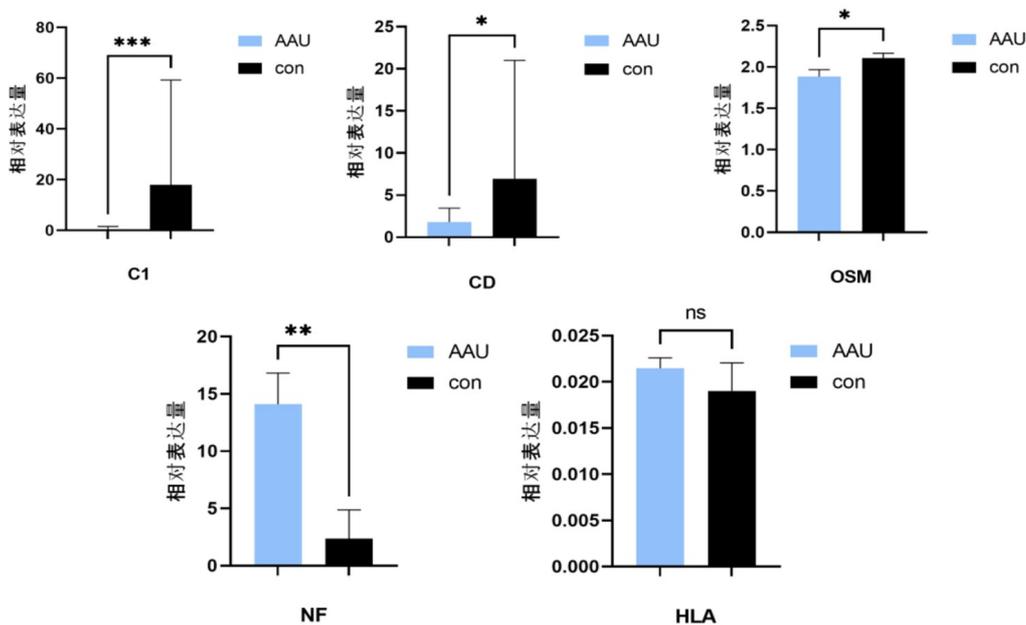


图 7 OSM、HLA-DRB5、C1QTNF4、NFKBIZ 和 CD276 基因在 AS 相关葡萄膜炎患者与健康对照者中的 qRT-PCR 表达结果 * $P < 0.05$, ** $P < 0.0001$

3 讨论

本研究旨在通过生物信息学分析识别与 AS 相关葡萄膜炎相关的差异表达基因 (DEGs) 及其蛋白质-蛋白质相互作用 (PPI) 网络, 为 AS 相关葡萄膜炎的致病机制提供了新的见解。此外, 本研究中确定的核心基因可能有助于发现 AS 相关葡萄膜炎的潜在诊断、生物标志物以及治疗靶点。我们检测并验证了在 AAU 患者中表达的 5 个核心基因, 包括 OSM、HLA-DRB5、C1QTNF4、NFKBIZ 和 CD276。qRT-PCR 结果表明, C1QTNF4 和 NFKBIZ 在 AS 组与对照组间呈现显著差异表达。

C1QTNF4 (C1q 和 TNF 相关蛋白 4, CTRP4) 是 CTRP 家族的第四个成员, 其结构具有独特的双球状结构域^[20, 21]。在本研究中, CTRP4 的表达显著下调, 其功能涉及对白细胞介素-6 (IL-6) 介导信号通路的正调控。Li 等在 2011 年首次研究了 CTRP4 的功能, 并指出 CTRP4 能够诱导 IL-6 的表达, 激活 HepG2 细胞中的 STAT3 和 NF- κ B 信号通路^[22]。此外, CTRP4 还参与骨代谢的调节, 并促进成骨细胞分化, 这可能使其成为骨代谢疾病的潜在治疗靶点^[23]。实际上, 作为一种脂肪因子, CTRP4 作用于其靶细胞的表面受体。然而, 目前尚未确定 CTRP4 的特异性受体, 其在免疫和炎症中的作用仍不明确^[24]。这些结果表明, CTRP4 具有多种功能, 而该基因的下调可能是调节 AS 相关葡萄膜炎炎症网络的关键因素。

本文结果显示 NFKBIZ 显著上调。NFKBIZ 能够正向调控 T 辅助 17 细胞的分化。该基因编码的 I κ B- ζ 蛋白是一种 NF- κ B 的新型负调控因子。I κ B- ζ 在受到脂多糖或 IL-1 β 刺激后会显著诱导表达^[25]。Eto 等研究表明 NF- κ B 与 I κ B- ζ 存在双向调控关系^[26]。作为进化保守的转录因子, NF- κ B 调控胚胎发育、细胞凋亡、炎症反应等多种生物学过程^[27, 28]。因此, 我们推测 NFKBIZ 基因的上调与 NF- κ B 的正常生物学功能密切相关。NF- κ B 可能在 AS 相关葡萄膜炎中起关键作用^[29, 30]。

本研究也存在一些局限性。首先, 样本量相对较小。其次, 尽管我们检测并验证了 AS 相关葡萄膜炎患者和健康对照者之间 DEGs 的表达水平, 但尚未明确 AS 相关葡萄膜炎的潜在相关通路。未来需要开展进一步研究, 以扩大样本量并识别与 AS 相关葡萄膜炎致病进展相关的信号通路。

综上, 一些关键的核心基因 (如 C1QTNF4 和 NFKBIZ) 可能在 AS 相关葡萄膜炎的发病机制中发挥重要作用。本研究识别了若干可能促进进一步研究的关键通路和子模块。因此, 对整合的 RNA-Seq 数据和网络生物学的分析为 AS 相关葡萄膜炎的发病机制提供了新的见解。

【参考文献】

- [1] Ebrahimiadib N, Berijani S, Ghahari M, et al. Ankylosing spondylitis [J]. *Journal of Ophthalmic & Vision Research*, 2021, 16(3): 462-469.
- [2] Taitt HA, Balakrishnan R. Spondyloarthritis [J]. *Immunology and Allergy Clinics of North America*, 2023, 43(3): 593-612.
- [3] Wakefield D, Clarke D, McCluskey P. Recent developments in HLA B27 anterior uveitis [J]. *Frontiers in Immunology*, 2020, 11: 608134.
- [4] Fiorillo MT, Haroon N, Ciccio F, et al. Editorial: ankylosing spondylitis and related immune-mediated disorders [J]. *Frontiers in Immunology*, 2019, 10: 1232.
- [5] Pyare R, Majumder PD. Clinical spectrum of HLA-B27-associated ocular inflammation [J]. *Nepal J Ophthalmol (NEPJOPH)*, 2022, 14(28): 116-134.
- [6] Biggioggero M, Crotti C, Becciolini A, et al. The management of acute anterior uveitis complicating spondyloarthritis: present and future [J]. *BioMed Research International*, 2018, 2018: 9460187.
- [7] Kang S, Song J. Robust gene selection methods using weighting schemes for microarray data analysis [J]. *BMC Bioinformatics*, 2017, 18(1): 389.
- [8] Song ZY, Yuan D, Zhang SX. Role of the microbiome and its metabolites in ankylosing spondylitis [J]. *Frontiers in Immunology*, 2022, 13: 1010572.
- [9] Robinson PC, Clauhsuis TA, Cortes A, et al. Genetic dissection of acute anterior uveitis reveals similarities and differences in associations observed with ankylosing spondylitis [J]. *Arthritis & Rheumatology (Hoboken, NJ)*, 2015, 67(1): 140-151.
- [10] Rosenbaum JT, Asquith M. The microbiome and HLA-B27-associated acute anterior uveitis [J]. *Nature Reviews Rheumatology*, 2018, 14(12): 704-713.
- [11] Parthasarathy R, Santiago F, McCluskey P, et al. The microbiome in HLA-B27-associated disease: implications for acute anterior uveitis and recommendations for future studies [J]. *Trends in Microbiology*, 2023, 31(2): 142-158.
- [12] van der Linden S, Valkenburg HA, Cats A. Evaluation of diagnostic criteria for ankylosing spondylitis. A proposal for modification of the New York criteria [J]. *Arthritis and Rheumatism*, 1984, 27(4): 361-368.
- [13] Trapnell C, Williams BA, Pertea G, et al. Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation [J]. *Nature Biotechnology*, 2010, 28(5): 511-515.
- [14] Roberts A, Trapnell C, Donaghey J, Rinn JL, et al. Improving RNA-Seq expression estimates by correcting for fragment bias [J]. *Genome Biology*, 2011, 12(3): R22.
- [15] Anders S, Pyl PT, Huber W. HTSeq--a Python framework to work with high-throughput sequencing data [J]. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 2015, 31(2): 166-169.
- [16] Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2 [J]. *Genome Biology*, 2014, 15(12): 550.
- [17] Kanehisa M, Araki M, Goto S, et al. KEGG for linking genomes to life and the environment [J]. *Nucleic Acids Research*, 2008, 36 (Database issue): D480-484.
- [18] Szklarczyk D, Morris JH, Cook H, et al. The STRING database in 2017: quality-controlled protein-protein association networks, made broadly accessible [J]. *Nucleic Acids Research*, 2017, 45(D1): D362-D368.