

生物信息学在动脉粥样硬化中的应用进展

杨玉先¹, 张帆², 崔庆华³, 赵冬¹

(1. 首都医科大学附属北京潞河医院 内分泌代谢与免疫性疾病中心 糖尿病防治重点实验室, 北京市 101149;

2. 北京大学第三医院老年内科, 北京市 100191; 3. 北京大学基础医学院医学生物信息学系, 北京市 100191)

[专家简介] 赵冬, 主任医师, 硕士研究生导师, 主要从事糖尿病及其慢性并发症相关机制研究。主持和参与市级课题、区级课题 10 余项, 获得“北京市先进工作者”“通州区科技带头人”“通州区杰出人才奖”等。以第一作者或通信作者在《ATVB》《Stem Cell》《Diabetes》《JAHA》等发表 SCI 论文 13 篇, 核心期刊文章 17 篇。先后担任中国研究型医院学会糖尿病学专业委员会委员、中国老年保健医学研究会老年骨质疏松分会委员、中国老年医学学会内分泌代谢分会委员、北京医学会内分泌分会委员等, 以及担任科技部国家重点研发计划“重大慢性非传染性疾病防控研究”重点专项基金评审专家、《中国医药导报》编委、《国际内分泌代谢杂志》特邀审稿专家等。

[关键词] 动脉粥样硬化; 生物信息学; 基因组学; 蛋白质组学; 代谢组学

[摘要] 动脉粥样硬化(As)是一种慢性炎症性疾病, 是心脑血管疾病共同的病理基础, 但其病理过程复杂, 分子水平发病机制尚不清楚。近几年, 基因芯片、蛋白芯片、高通量测序、代谢组学等技术的广泛应用, 有助于进一步了解其分子机制, 探索新的 As 基因和靶点。而生物信息学的快速发展, 使得数目庞大、结构复杂的生物信息得以获取并利用, 并从中挖掘出有价值的医学信息, 揭示了一些复杂的生物学过程和病理状态, 其中 As 的分子水平发病机制逐渐被认识, 包括 As 基因组学、蛋白质组学、代谢组学及药物靶点预测等, 揭示了炎症反应、免疫应答、氧化磷酸化、脂代谢异常及能量循环异常与 As 发病高度相关。本综述将从以上方面对生物信息学在 As 研究中的应用展开讨论。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A



Progress in the application of bioinformatics in atherosclerosis

YANG Yuxian¹, ZHANG Fan², CUI Qinghua³, ZHAO Dong¹

(1. Beijing Key Laboratory of Diabetes Research and Care, Center for Endocrine Metabolism and Immune Diseases, Luhe Hospital of Capital Medical University, Beijing 101149, China; 2. Department of Geratology, Third Hospital of Peking University, Beijing 100191, China; 3. Department of Biomedical Informatics, Center for Noncoding RNA Medicine, School of Basic Medical Sciences, Peking University, Beijing 100191, China)

[KEY WORDS] atherosclerosis; bioinformatics; genomics; proteomics; metabolomics

[ABSTRACT] Atherosclerosis (As) is a chronic inflammatory disease, which is the common pathological basis of many cardiovascular and cerebrovascular diseases. But the pathological procedure involved is complicated, and the molecular mechanism is still unclear. In recent years, microarray, proteomics, High-throughput sequencing and metabolomics are used widely, helping us further understand the molecular mechanism. At the same time, the rapid development of bioinformatics largely speeds up the requirement and analysis of biomedical data. Among this, the pathogenesis of atherosclerosis is gradually recognized, including atherosclerosis genomics, proteomics, metabolomic and drug target prediction and so on. This revealed that inflammation, immunity, oxidative phosphorylation, lipid metabolism and energy dysfunction were highly correlated with the pathogenesis of atherosclerosis. This review will discuss the applications of bioinformatics in As.

[收稿日期] 2019-11-26

[修回日期] 2019-12-02

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(81670462)

[作者简介] 杨玉先, 硕士研究生, 研究方向为糖尿病下肢血管病变相关机制, E-mail 为 yx.yang93@ccmu.edu.cn。通信作者 崔庆华, 博士, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为心血管生物信息学, E-mail 为 cuiqinghua@bjmu.edu.cn。通信作者 赵冬, 主任医师, 硕士研究生导师, 研究方向为糖尿病及其慢性并发症相关机制, E-mail 为 zhaodong@ccmu.edu.cn。

动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)是一种慢性炎症性疾病,是心脑血管疾病的重要病因^[1-2],其主要病理过程是内皮细胞损伤,巨噬细胞吞噬氧化的低密度脂蛋白(LDL)胆固醇变成泡沫细胞集聚在动脉壁内皮下形成脂质斑块^[3-4]。一般认为急性心脑血管事件是由不稳定性斑块破裂、血栓形成堵塞血管所引起^[5],而诱导这些病理生理过程改变的分子机制并不完全清楚。另外,As患者缺乏临床症状,诊断往往滞后,其重点在于早发现,早干预,并减少急性心脑血管事件的发生,但As涉及的病理机制十分复杂,其分子水平机制尚不清楚。近几年,随着基因芯片、高通量测序、代谢组学、蛋白质组学及医学生物信息学的发展,As的分子水平发病机制逐渐被认识到。

生物信息学是多种学科交叉形成的新型学科,它应用数学、统计学和信息学方法与技术对生物数据进行获取、储存、处理和分析,从数据中挖掘潜在的生物信息。目前,基因组学、转录组学和蛋白质组学等组学研究是当前生物信息学研究的热点。另外,生物信息学在基因克隆、结构及功能分析中发挥重要作用。生物信息学利用高通量筛选 cDNA 微阵列文库可进行基因表达的系统分析,揭示一些非常复杂的生物学过程和病理状态,如心血管疾病、糖尿病并发症、癌症的进展等。最终能够为临床疾病的诊治提供帮助。

一些公共数据库的发展也促进了生物信息学的发展,如美国国立生物技术信息中心(NCBI)在2000年7月首次发布了基因表达谱库(gene expression omnibus, GEO)数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)^[6],它储存了大量的基因表达信息,可上传和储存高通量生物芯片数据,实现对基因表达数据的检索、浏览和分析,为进一步的生物信息分析提供数据来源。持续更新关于人类基因和遗传紊乱的数据库——在线《人类孟德尔遗传》(online mendelian inheritance in man, OMIM),主要着眼于可遗传的或遗传性的基因疾病,包括文本信息和相关参考信息、序列纪录、图谱和相关其他数据库。另外基因芯片技术的发展,有利于同时比较成千上万个基因的表达变化,全面筛选某一表型或某一疾病的所有相关基因,还可揭示不同基因表达变化之间的相互关系,从而为研究基因与基因之间的内在联系提供线索。

越来越多的公共网站及计算机软件的开发为基因及蛋白的功能注释、功能富集、蛋白相互作用及可视化、通路富集分析提供了可能。如通过采用

富集分析数据库(database for annotation, visualization and integrated discovery, DAVID)^[7]数据库可实现GO(gene ontology)功能注释及KEGG通路(kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)富集分析;应用蛋白相互作用数据库(search tool for the retrieval of interacting genes/proteins, STRING)(<http://string-db.org/>)^[8]和Cytoscape可实现蛋白相互作用网络构建和可视化;Stanford Microarray Database(SMD)^[9]可对基因进行染色体定位等;BLAST软件可实现生物序列的相似性搜索等。总之,生物信息学的发展,使得研究者可以对基因组学、蛋白质组学、代谢组学等多方面数据进行分析,形成复杂的基因、环境及其相互作用网络,为理解As复杂的发病机制及个体化治疗奠定了基石。

1 动脉粥样硬化与基因组学

1.1 动脉粥样硬化与易感基因

As不是单基因病,其发生发展和许多基因有关,应用传统的生物学方法对大量的基因进行表达和功能研究,不仅费时费力,且存在一定的盲目性,限制了基因组学及蛋白组学的发展,而生物信息学在基因功能预测及结构分析中有很多优势。

2005年彭瑾瑜等^[10]应用GenBank数据库和BLAST对胆固醇损伤内皮细胞后获得的差异表达基因进行分析,通过电子克隆获得其全长cDNA序列,该序列包含了与氧化磷酸化密切相关的9个亚基,对其中的细胞色素氧化酶亚基II(COX2)进行生物信息学分析,如基因序列注释和蛋白质序列的功能注释,获得了COX2基因及其编码蛋白的相关信息,如开放阅读框、分子量、等电点、亲疏水性、蛋白结构等,并且发现该蛋白参与电子传递,可能与细胞的氧化应激有关。

As的发病机制假说有很多,主要有内皮细胞损伤学说、平滑肌细胞迁移增殖学说、单核细胞源性泡沫细胞形成细胞学说等。2013年马长剑^[11]结合As三大学说中的关键基因进行预测。通过数据库中Web站点进行检索,逐条查看和记录后形成二级数据库,对miRNA序列的字段组成、名称、常用标识、靶基因定位、功能描述等相关资料进行收集保存,录入了As相关基因127个基因,其中致病基因24个,密切相关基因78个,候选基因25个。并对上述基因及其特异性的miRNA进行预测,发现血管内皮损伤方面有miR-126、miR-15b、miR-16、miR-

20a、miR-20b 特异性表达。其中 miR-126 可抑制 TNF- α ,减轻内皮细胞炎症,稳定斑块。miR-15b、miR-16、miR-20a、miR-20b 可增加血管内皮生长因子的表达,促进血管发生。在血管平滑肌细胞迁移增殖方面 miR-21、miR-221/222、miR-143、miR-145 特异性表达。miR-21 促进血管平滑肌细胞的增殖,抑制其凋亡^[12]。miR-221/222 促进血管平滑肌细胞的增殖,并且可以靶向调控内皮细胞的炎症^[13], Yilmaz 等^[14]对 89 例 As 患者和 93 例健康对照组的 miRNA 表达水平进行了分析,发现 miR-221/222 水平在 As 患者中显著下降,可作为 As 诊断的生物标志物。miR-143、miR-145 促进平滑肌细胞分化,抑制其去分化,平衡其增殖和凋亡,最终起到阻止血管发生病理变化的作用。在单核/巨噬细胞吞噬脂质成为泡沫细胞方面,miR-146a 特异性表达下调。Yang 等^[15]发现 miR-146 通过负性调节 TLR4,从而抑制 TLR4 依赖的信号通路的激活,影响细胞骨架重排、脂质摄取和炎性细胞因子分泌,减少氧化型低密度脂蛋白在巨噬细胞的积累和减轻炎症反应。

为挖掘 As 易感基因,2017 年王文栋等^[16]从 PubMed、OMIM 和 GEO 数据库检索 As 易感基因,共获得 As 易感基因 454 个。利用富集分析数据库 (DAVID)进行 GO 功能注释并进行富集,关联到 24 个注释单元,主要涉及血脂异常位点、冠状动脉疾病风险位点、心血管疾病标记基因位点和 As 易感基因位点等。应用 STRING 软件进行蛋白相互作用分析,其中 44 个编码蛋白存在相互作用关系,涉及多种生物学过程和分子功能, APOC1、ABCG5、ABCG8、APOA4、APOC3、APOE、PCSK9、APOA1、CETP、LDLR、LPL、APOB、LPA、LCAT、ANGPTL3、LIPG、ABCA1、APOA5、NR1H3、PON1 和 PLT 为蛋白相互作用网络的中心节点,这些基因参与脂代谢,与 As 发生、发展相关。

As 早期患者通常无症状,并且可能持续数十年,目前早期预测患者 As 风险的方法缺乏。而家族性高胆固醇血症 (familial hypercholesterolemia, FH) 是 As 发展的重要危险因素。FH 特征在于高胆固醇水平,特别是低密度脂蛋白 (LDL)。2016 年 Wang 等^[17]从 GEO 数据库中下载了微阵列数据 (GSE13985),该数据集来自 5 个 FH 和 5 个健康对照的血样,从中筛选出差异表达基因 (differentially expressed genes, DEGs) 共 394 个,其中表达上调基因 125 个,下调基因 269 个。应用 STRING 和 Cytoscape 对 DEGs 进行蛋白相互作用网络构建和可视化。发现核糖体蛋白 L9 (RPL9)、L35 (RPL35) 和 S7

(RPS7) 是蛋白相互作用网络的中枢节点。KEGG 通路分析显示 DEGs 在核糖体和氧化磷酸化途径中显著富集。推测核糖体和氧化磷酸化途径可能与 As 的发展密切相关。

1.2 动脉粥样硬化早晚期斑块差异表达基因谱

为研究人类早晚期颈动脉斑块基因表达变化,2017 年, Tan 等^[18]从 GEO 数据库中下载原始数据 GSE28829,该数据集包含 16 例晚期和 13 例早期人类颈动脉粥样斑块的样本,通过 Morpheus 软件,应用信噪比法筛查早晚期斑块中 DEGs,共获得了 42 450 个基因,选出了前 100 个上调和下调的基因,其中上调最显著的是 C2 基因,下调最显著的是 H2AFV 基因。功能性富集分析及通路分析显示这些基因主要参与破骨细胞分化、细胞因子受体相互作用、趋化因子信号通路、溶酶体和金黄色葡萄球菌感染、局灶性粘连等信号通路等。随后进行蛋白相互作用网络分析,识别出前 10 个中心基因,分别是 UBA52、RPL38、ITGAL、ICAM1、IL7R、IL7、REL、REL、NFKBIA 和 VAV1,其中最有意义的是 UBA52,这些基因主要参与斑块中免疫细胞的募集,并推断出 6 个模块,这些模块主要参与趋化因子信号通路、细胞周期、B 细胞受体信号通路、局灶性黏附和肌动蛋白细胞骨架的调控。该研究表明,免疫系统和炎症是预防 As 的重要靶点。

为了研究颈动脉粥样硬化斑块进展过程中的基因表达特征和潜在分子机制,2018 年, Liu 等^[19]从 GEO 数据库中获取了 GSE28829 数据集 (包含 13 个早期和 16 个晚期颈动脉粥样硬化斑块的基因表达数据),鉴定出 DEGs 758 个,其中下调基因 515 个,上调基因 243 个。对 DEGs 进行 GO 分析、通路富集分析及蛋白相互作用分析,发现 GO 分析提示上调基因与免疫应答相关,在免疫系统信号通路中富集,下调基因与细胞黏附相关,在肌肉收缩相关通路中富集。在蛋白相互作用网络分析中, ITGAM 和 ACTN2 在上调基因和下调基因中的连通性最高。这些结果表明,免疫系统和平滑肌细胞骨架的异常与颈动脉粥样硬化斑块的进展有关。

1.3 动脉粥样硬化不稳定斑块差异基因表达谱

不稳定斑块破裂、血栓形成所引起的堵塞血管是心脑血管病的重要发病基础^[5],不稳定斑块的特征是脂质核心大而软,纤维帽薄^[20],其病理生理机制主要包括斑块内炎症反应的增加、新生血管形成和细胞大量凋亡,而诱导这些病理生理过程改变的分子机制并不完全清楚。应用生物信息学研究不稳定斑块发病相关的基因,揭示不稳定斑块形成

的分子机制,对于实现不稳定斑块的早发现及早干预,预防急性心脑血管的发生至关重要。

因此,2015年奈文青等^[21]从 Array Express 数据库下载基因表达谱数据 E-MTAB-2055,该芯片数据的样本包含 24 例稳定斑块组织和 24 例不稳定斑块组织的基因表达情况,通过基因芯片技术分析稳定斑块和不稳定斑块间 DEGs 共 439 个,其中上调基因 232 个,下调基因 207 个,上调基因最大的基因是 heme oxygenase 1 (HMOX 1),下调基因最大的基因是 alpha-actin (ACTC 1)。共同构成了 As 不稳定斑块差异基因表达谱。运用生物信息学,采用 DAVID 数据库进行 GO 功能注释及 KEGG 通路富集分析,GO 富集分析显示 15 个生物学过程,其中免疫应答、免疫防御、炎症应答、细胞因子等富集显著性最高。进行 KEGG 通路富集结果显示 9 个通路,其中免疫相关通路富集最多。用 STRING 数据库进行蛋白相互作用网络分析并进行聚类分析,获取了 4 个风险模块,其中 TY-ROBP、CXCR4、VCL、APOE 分别是 4 个模块中的枢纽基因,在促进不稳定斑块形成过程中发挥重要作用。

1.4 动脉粥样硬化与巨噬细胞

巨噬细胞吞噬 ox-LDL 后向泡沫细胞的转化是 As 发生和发展的关键步骤,为了发现泡沫细胞中差异调节的基因,2007 年 Thomas 等^[22]用抑制消减杂交法比较了泡沫细胞和非泡沫巨噬细胞基因表达情况,确定了 3 个上调的基因,其中包括基质金属蛋白酶 12。还发现了 11 个下调基因,其中精氨酸酶的表达量和活性下调最显著。炎症和氧化还原参与了 As 的发生和发展,炎症过程中巨噬细胞会积聚,可能极化为促炎 (M1) 或抗炎 (M2) 两种表型^[23-24],两者的平衡对 As 的发展有影响^[25-26]。2014 年,da Rocha 等^[27]从 GEO 数据库中获取了数据集 GSE28829 (包含人类颈动脉早期和晚期动脉粥样硬化斑块的基因表达情况) 和 GSE9874 (包含 As 患者和健康人巨噬细胞的基因表达谱),并比较了人类抗氧化基因 (HAG) 和 M1/M2 基因的表达水平。发现与早期斑块相比,晚期斑块中 HAG 和 M1 基因的活性 (表达) 明显增加。与健康者相比,As 患者巨噬细胞中 HAG、M1 和 M2 基因的表达明显升高,在泡沫细胞中 M1 基因增加。表明人类抗氧化基因、巨噬细胞表型在 As 发生及发展中发挥作用。2018 年,Huang 等^[28]对极化的 M1 和 M2 型巨噬细胞的整体蛋白体进行了研究,并与未极化的 M0 巨噬细胞进行了比较。发现 M1 型巨噬细胞有许多促炎蛋白的表达增加,其中表达上调最多的 3 种蛋白

是干扰素诱导表达蛋白 (IFITs: IFIT1、IFIT2 和 IFIT3),它们在抗病毒防御中起重要作用。此外,在人原代巨噬细胞 M1 型中,IFIT1、IFIT2 和 IFIT3 的 mRNA 表达显著上调,并且 IFIT1 也在 ApoE^{-/-} As 模型小鼠主动脉窦和肱动脉的巨噬细胞亚群中表达。基于这些结果,作者提出 IFITs 可能是 As 的标记物。

1.5 动脉粥样硬化与非编码 RNA

2018 年,Zhang 等^[29]为了研究 circRNAs 在动脉粥样硬化中的生物学功能。以高脂饮食喂养兔子诱导动脉粥样硬化,对照组兔子喂正常饮食,利用 RNA-seq 分析了两组兔子颈动脉组织样本中 circRNA、miRNA 和 mRNA 的表达谱。发现在动脉粥样硬化中许多 miRNAs、mRNAs 和 circRNAs 发生显著变化。进一步用 miRanda 工具预测 miRNA 靶相互作用,并构建一个差异表达的 circRNA-miRNA-mRNA 三重网络。GO 富集分析表明网络中的基因参与了细胞黏附、细胞激活和免疫应答。另外,还生成了一个失调的 circRNA 相关的竞争性内源 RNA (ceRNAs) 网络,发现 7 个 circRNA 与动脉粥样硬化相关。这些环 RNA 也在细胞黏附、细胞活化和免疫反应中起作用。这些结果表明,circRNAs 与其竞争的 mRNA 之间的串扰可能在动脉粥样硬化的发生发展中起重要作用。

2 动脉粥样硬化与蛋白质组学

目前,大量研究集中在寻找 As 新的血浆生物标志物,更好的预测心血管事件的发生。然而,血浆中含有超过 90 万种蛋白质^[30],经典的实验技术只能检测有限数量的蛋白。而蛋白质组学可以同时成千上百种蛋白进行筛选和鉴定,可以检测血浆、血清、组织等,应用广泛。

2006 年,Almofti 等^[31]采用二维电泳及质谱的方法对 As 模型大鼠的主动脉组织进行了蛋白质组学研究,鉴定出 46 种差异表达蛋白,其中 18 种蛋白表达丰度增加,包括一系列与氧化相关的酶,如过氧化物酶 2、NADH 脱氢酶铁 S 蛋白 6,还有参与炎症反应的黏附分子,如层粘连蛋白 A。丰度下降的蛋白有 28 种,包括 CaM-KII 抑制蛋白、二磷酸果糖醛缩酶等。其中 CaM-KII 抑制蛋白与氧化还原敏感性相关。本研究表明,As 发病机制与炎症及氧化还原密切相关。

Tabibiazar 等^[32]采用蛋白微阵列测量了

ApoE^{-/-} As 模型小鼠不同进展阶段中 30 种血清炎症标志物,并与正常对照小鼠相比,发现 22 个标志物表达水平有差异,包括趋化因子 (Ccl2、Ccl9、Ccl11、Ccl19、Ccl21、Cxc11、Cxc12)、细胞因子 (Il2、Il4、Il5、Il6、Il10、Il12) 及炎症因子 (Csf1、Csf2、Csf3、Ifng、Tnfsf11),进一步应用支持向量机等机器学习的方法建立分类器,可以很好的区分 As 不同发病阶段,表明这些差异表达的血清蛋白与疾病严重程度密切相关。

Lepedda 等^[33]利用 NCBI 数据库,采用质谱方法等蛋白质组学方法从 19 例人颈动脉粥样硬化稳定斑块和 29 例不稳定斑块组织中分离蛋白质,并鉴定出 33 种差异表达蛋白质,与稳定斑块相比,不稳定斑块中铁蛋白轻亚单位、超氧化物歧化酶 2 (SOD2) 和纤维蛋白原片段 D 表达水平升高,超氧化物歧化酶 3 (SOD3)、谷胱甘肽 S-转移酶 (GST)、RHP-GDP 解离抑制剂 1 (RHP-GDI)、钙磷脂结合蛋白 A10、热休克蛋白 20、热休克蛋白 27 表达水平降低,由于这些差异表达蛋白都参与炎症及氧化应激,因此提示 As 不稳定斑块的形成与炎症和氧化应激有关。

2018 年, Herrington 等^[34]利用质谱技术对 100 例青年人的冠状动脉及腹主动脉组织 (200 例动脉组织) 进行了蛋白质组学研究,形成人类 As 蛋白质谱及其特征 (共 1 925 个蛋白),发现 As 组织中线粒体蛋白低于正常动脉组织,提示线粒体功能障碍与 As 的发病相关。为了获得早期 As 蛋白质谱,作者进一步应用广泛回归分析、混合物的凸分析、主成分分析、层次聚类以及生物信息功能性分析方法,发现 As 组织中 TNF- α 通路激活,胰岛素受体、PPAR- α 和 PPAR- γ 通路受到抑制,提示 As 与炎症相关且存在基础代谢紊乱。为了进一步寻找早期 As 的生物标志物,应用多元反应监测及弹性网络模型发现 13 个蛋白可以预测 As,其 ROC 曲线下面积可达 0.92,错分率 0.13。展示了组织蛋白质组学发现临床疾病生物标志物并预测临床疾病的能力。

2019 年 Mokou 等^[35]应用质谱的方法对 As 模型小鼠的胸主动脉组织进行了蛋白质组学研究,发现 284 个差异表达蛋白,通过人类 As 组织蛋白质组学筛选出 6 个蛋白,其中赖氨酸特异性脱甲基酶 5D (KDM5D) 过表达明显,其底物 (组蛋白 H3 的三甲基赖氨酸 4, H3K4me3) 水平下降,应用 KDM5D 抑制剂对人脐静脉血管内皮细胞的功能干预研究,降低了其增殖、迁移及成管能力。该研究提示 KDM5 组蛋白甲基化酶可能通过 H3K4 甲基化参与 As

形成。

3 动脉粥样硬化与代谢组学

As 作为一种全身性动脉疾病,其特征是动脉内膜增厚和斑块形成,其分子机制目前尚不清楚。近年来,代谢物对 As 的影响已经逐渐受到关注^[36-37],代谢组学可用于全面分析代谢产物组成及其代谢变化,应用广泛。

2010 年, Chen 等^[38]应用 GC/MS 的方法对 16 名 As 患者和 28 名健康对照的血样进行了代谢组学分析,通过主成分分析及聚类分析等模式识别方法分析代谢数据,显示 As 患者和正常对照间血浆代谢组分有显著差异,其中脂肪酸代谢变化最显著,尤其是棕榈酸盐代谢,有研究表明棕榈酸脂通过靶向凋亡及炎症通路促进 As 的发生,并且可以认为是 As 临床诊断的生物标志物^[39]。

2015 年, Li 等^[40]利用核磁共振氢谱 (1H NMR) 及气相色谱结合火焰离子检测器/质谱联用 (GC-FID/MS),对高脂饮食诱导的 LDLR^{-/-} As 小鼠多种代谢产物变化进行了分析,包括基因表达、临床化学及组织病理学,发现 As 疾病不同进展阶段伴随多种代谢物变化,包括胆固醇、胆汁酸、脂肪酸稳态的破坏,氨基酸、蛋白质合成障碍,肠道微生物功能的变化以及维生素 B3、胆碱和核苷酸代谢的变化。表明脂肪酸和维生素 B3 的代谢以及肠道微生物在 As 的发生发展中起着至关重要的作用。

有研究表示肠道微生物及其代谢产物与 As 密切相关^[41-42],为了揭示 As 肠道代谢水平的病理变化,2015 年 Tian 等^[43]应用反相液相色谱/四级飞行时间质谱分析 (LC-Q-TOF-MS) 平台的代谢分析方法,分析了 LDLR^{-/-} As 模型小鼠粪便提取物的代谢特征,发现了 16 种代谢产物有差异,通过 KEGG 通路富集分析,发现胆固醇代谢、能量循环、炎症反应功能障碍是 As 的主要病理变化。2016 年, Tian 等^[44]用同样的方法对 As 模型小鼠血清进行了研究,鉴定出 21 中代谢产物,并对其进行功能分析,发现炎症、增殖、能量代谢及氨基酸代谢障碍是 As 最显著的病理变化,进一步的 KEGG 通路分析提示丙酮酸代谢、柠檬酸循环、脂肪酸代谢和尿素代谢受到严重干扰。控制这些代谢过程将有助于 As 的治疗。

2016 年 Dang 等^[45]采用液相色谱-质谱联用技术研究了 ApoE^{-/-} As 模型小鼠早期的血浆代谢谱,发现 As 模型小鼠及非 As 模型小鼠间有明显差异,

最显著的是甘油磷脂和鞘脂,进一步比较 As 不同进展期代谢物变化,发现 137 种显著变化的代谢产物,并对其进行了通路富集分析,发现甘油磷脂和鞘脂代谢是最显著的通路。表明这些途径在早期 As 的发病机制和疾病进展过程中起着重要作用。

2018 年 Jung 等^[46]应用液相色谱/质谱法对含斑块的主动脉组织及无斑块动脉组织进行分析,发现两组代谢有显著不同,斑块中嘌呤和谷胱甘肽代谢途径出现氧化应激失调,与炎症相关的葡萄糖神经酰胺、色氨酸和犬尿氨酸的水平也发生了改变。表明氧化还原及炎症反应可能参与斑块形成。

2019 年 Tzoulaki 等^[47]使用质子核磁共振波谱对 3 867 名来自 As 多民族研究的参与者进行了血清代谢谱分析,并通过生物信息学分析探索了分子网络。发现 As 与脂质代谢、碳水化合物代谢、支链和芳香氨基酸代谢紊乱有关。

4 动脉粥样硬化与药物靶点预测

一些研究报告了中药银丹心脑通具有抗 As 作用^[48-49],但其有效成分及机制尚不清楚,为了探索银丹心脑通抗 As 的特性及其作用机制,2015 年 Cheng^[50]等收集并提取了 173 种银丹心脑通的主要成分,输入 TCMSPP 数据库,并利用 ADME Sico TCMSPP 数据库模型模拟药物相似性结果,最后选取了 63 个化合物,使用 Target-Bank、DrugBank、BindingDB、PDTD 及 Cytoscape 软件,基于网络药理学进行了计算机预测,构建复杂药物网络,发现多个药物靶点,包括血管内皮保护、抗炎、抗氧化应激等,协同抗 As 作用,以上结果在 As 模型小鼠中得到验证。

外周动脉疾病(PAD)是心脏外围区域的血管疾病,其主要发病机制是斑块的形成导致血管腔的狭窄。2015 年,Chu 等^[51]构建了 PAD 的蛋白相互作用网络,并将其与药物-靶点关系相结合识别 PAD 的药物靶点。其中蛋白相互作用网络中的蛋白有三大类,分别是血管生成、免疫/炎症反应、动脉生成相关蛋白。通过 DrugBank 和 PharmGKB 药物数据库汇编药物信息,基于网络的方法预测了对 PAD 有潜在应用价值的药物靶点,分别是抗血管生成和促炎症反应,例如促进血管生成的药物是卡维地洛和尿激酶,抗炎药物是血管紧张素转换酶抑制剂和马拉维罗克。该研究提供了促血管生成和抗炎药物及药物靶点的全面预测。

2017 年 Lu 等^[52]采用网络药理学的方法,探讨草药苦荞与疾病的关系及其作用机制。从苦荞的 20 中化合物中获得了 97 个药物靶点,并构建了相互作用网络,确定了 28 个关键靶点,其中 ATK2、IKBKB、RAF1、CHUK、TNF、JUN 和 PRKCA 主要参与流体剪切应力、PI3K-Akt 信号通路,表明苦荞通过上述途径改善 As 相关疾病。

益津汤是治疗高脂血症、As 等疾病的传统制剂,然而其机制上不清楚。2018 年 Lee 等^[53]为了研究益津汤对高脂血症和 As 的网络药理作用,从公共数据库中获得益津汤中化合物的信息,分析了其组分,利用 STITCH 数据库连接化合物和基因之间的相关性,并利用 GeneCards 数据库收集与高脂血症和 As 相关的基因。进行了靶向预测和网络分析,鉴定出 447 个化合物,其中 21 个化合物和 57 个基因构成了高脂血症和 As 的主要途径,10 个化合物(柚皮苷、野百合素、橙皮苷、高良姜素、甘草甜素、均龙胆酸、豆甾醇、6-姜辣素、槲皮素和葛兰素)与 4 个以上基因连锁,是生物活性化合物和关键化学物质。该网络的核心基因是 CASP3、CYP1A1、CYP1A2、MMP2 和 MMP9。该药理网络分析有助于了解益津汤治疗高脂血症、As 等疾病的潜在作用。

5 结语与展望

As 是一种常见的全身性动脉疾病,是心脑血管疾病的重要病理基础,其发病机制复杂,分子机制尚不清楚。目前随着公共数据库的发展,基因芯片、高通量测序、蛋白质组学及代谢组学的快速发展,生物信息学可以利用公共的数据库资源、先进的计算机软件及数据分析技术对复杂的医学生物信息进行分析 and 挖掘,揭示一些高度复杂的生物学过程,在医学复杂数据中发挥了越来越重要的作用,为进一步的基础科学研究寻找方向,为临床疾病的诊治提供帮助。

[参考文献]

- [1] Thomas H, Diamond J, Vieco A, et al. Global atlas of cardiovascular disease 2000 ~ 2016: the path to prevention and control[J]. Glob Heart, 2018, 13(3): 143-163.
- [2] Lusis AJ. Atherosclerosis[J]. Nature, 2000, 407(6801): 233-241.
- [3] Moore KJ, Sheedy FJ, Fisher EA. Macrophages in atherosclerosis: a dynamic balance[J]. Nat Rev Immunol, 2013, 13(10): 709-721.

- [4] Tabas I, Williams KJ, Boren J. Subendothelial lipoprotein retention as the initiating process in atherosclerosis: update and therapeutic implications [J]. *Circulation*, 2007, 116 (16): 1832-1844.
- [5] Shankman LS, Gomez D, Cherepanova OA, et al. KLF4-dependent phenotypic modulation of smooth muscle cells has a key role in atherosclerotic plaque pathogenesis [J]. *Nat Med*, 2015, 21(6): 628-637.
- [6] Barrett T, Wilhite SE, Ledoux P, et al. NCBI GEO: archive for functional genomics data sets update [J]. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41(Database issue): D991-995.
- [7] Jiao X, Sherman BT, Huang W, et al. DAVID-WS: a stateful web service to facilitate gene/protein list analysis [J]. *Bioinformatics*, 2012, 28(13): 1805-1806.
- [8] Szklarczyk D, Franceschini A, Wyder S, et al. STRING v10: protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life [J]. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43(Database issue): D447-452.
- [9] Demeter J, Beauheim C, Gollub J, et al. The stanford microarray database: implementation of new analysis tools and open source release of software [J]. *Nucleic Acids Res*, 2007, 35(Database issue): D766-770.
- [10] 彭瑾瑜, 朱 勋, 唐蔚青, 等. 胆固醇损伤内皮细胞差异表达基因的生物信息学分析 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2005, 13(3): 259-262.
- [11] 马长剑. 生物信息学在动脉粥样硬化特异性 miRNA 筛选中的应用研究 [J]. *中国保健营养*, 2013, 23(7): 1597-1598.
- [12] Ji R, Cheng Y, Yue J, et al. MicroRNA expression signature and antisense-mediated depletion reveal an essential role of MicroRNA in vascular neointimal lesion formation [J]. *Circ Res*, 2007, 100(11): 1579-1588.
- [13] Chen CF, Huang J, Li H, et al. MicroRNA-221 regulates endothelial nitric oxide production and inflammatory response by targeting adiponectin receptor 1 [J]. *Gene*, 2015, 565(2): 246-251.
- [14] Yilmaz SG, Isbir S, Kunt AT, et al. Circulating microRNAs as novel biomarkers for atherosclerosis [J]. *In Vivo*, 2018, 32(3): 561-565.
- [15] Yang K, He YS, Wang XQ, et al. MiR-146a inhibits oxidized low-density lipoprotein-induced lipid accumulation and inflammatory response via targeting toll-like receptor 4 [J]. *FEBS Lett*, 2011, 585(6): 854-860.
- [16] 王文栋, 常晓彤, 杜华阳. 动脉粥样硬化易感基因挖掘与生物信息学分析 [J]. *中国老年学杂志*, 2017, 37(24): 6071-6075.
- [17] Wang HX, Zhao YX. Prediction of genetic risk factors of atherosclerosis using various bioinformatic tools [J]. *Genet Mol Res*, 2016, 15(2): 15027347.
- [18] Tan X, Zhang X, Pan L, et al. Identification of key pathways and genes in advanced coronary atherosclerosis using bioinformatics analysis [J]. *Biomed Res Int*, 2017, 2017: 4323496.
- [19] Liu W, Zhao Y, Wu J. Gene expression profile analysis of the progression of carotid atherosclerotic plaques [J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17(4): 5789-5795.
- [20] Finn AV, Nakano M, Narula J, et al. Concept of vulnerable/unstable plaque [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2010, 30(7): 1282-1292.
- [21] 奈文青, 丁 宇, 张克伟, 等. 基于生物信息学技术分析老年人颈动脉不稳定斑块差异基因表达谱 [J]. *中国老年学杂志*, 2015, 35(9): 2367-2370.
- [22] Thomas AC, Sala-Newby GB, Ismail Y, et al. Genomics of foam cells and nonfoamy macrophages from rabbits identifies arginase-I as a differential regulator of nitric oxide production [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007, 27(3): 571-577.
- [23] Wang N, Liang H, Zen K. Molecular mechanisms that influence the macrophage m1-m2 polarization balance [J]. *Front Immunol*, 2014, 5: 614.
- [24] Mantovani A, Garlanda C, Locati M. Macrophage diversity and polarization in atherosclerosis: a question of balance [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2009, 29(10): 1419-1423.
- [25] Stoger JL, Gijbels MJ, van der Velden S, et al. Distribution of macrophage polarization markers in human atherosclerosis [J]. *Atherosclerosis*, 2012, 225(2): 461-468.
- [26] Anderson CF, Gerber JS, Mosser DM. Modulating macrophage function with IgG immune complexes [J]. *J Endotoxin Res*, 2002, 8(6): 477-481.
- [27] da Rocha RF, De Bastiani MA, Klamt F. Bioinformatics approach to evaluate differential gene expression of M1/M2 macrophage phenotypes and antioxidant genes in atherosclerosis [J]. *Cell Biochem Biophys*, 2014, 70(2): 831-839.
- [28] Huang C, Lewis C, Borg NA, et al. Proteomic identification of interferon-induced proteins with tetratricopeptide repeats as markers of M1 macrophage polarization [J]. *J Proteome Res*, 2018, 17(4): 1485-1499.
- [29] Zhang F, Zhang R, Zhang X, et al. Comprehensive analysis of circRNA expression pattern and circRNA-miRNA-mRNA network in the pathogenesis of atherosclerosis in rabbits [J]. *Aging (Albany NY)*, 2018, 10(9): 2266-2283.
- [30] Anderson L. Candidate-based proteomics in the search for biomarkers of cardiovascular disease [J]. *J Physiol*, 2005, 563(1): 23-60.
- [31] Almofti MR, Huang Z, Yang P, et al. Proteomic analysis

- of rat aorta during atherosclerosis induced by high cholesterol diet and injection of vitamin D3[J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2006, 33(4): 305-309.
- [32] Tabibiazar R, Wagner RA, Deng A, et al. Proteomic profiles of serum inflammatory markers accurately predict atherosclerosis in mice[J]. *Physiol Genomics*, 2006, 25(2): 194-202.
- [33] Lepedda AJ, Cigliano A, Cherchi GM, et al. A proteomic approach to differentiate histologically classified stable and unstable plaques from human carotid arteries[J]. *Atherosclerosis*, 2009, 203(1): 112-118.
- [34] Herrington DM, Mao C, Parker SJ, et al. Proteomic architecture of human coronary and aortic atherosclerosis [J]. *Circulation*, 2018, 137(25): 2741-2756.
- [35] Mokou M, Klein J, Makridakis M, et al. Proteomics based identification of KDM5 histone demethylases associated with cardiovascular disease [J]. *Bio Medicine*, 2019, 41: 91-104.
- [36] Lind PM, Lind L. Circulating levels of bisphenol A and phthalates are related to carotid atherosclerosis in the elderly[J]. *Atherosclerosis*, 2011, 218(1): 207-213.
- [37] Reis JP, von Muhlen D, Michos ED, et al. Serum vitamin D, parathyroid hormone levels, and carotid atherosclerosis [J]. *Atherosclerosis*, 2009, 207(2): 585-590.
- [38] Chen X, Liu L, Palacios G, et al. Plasma metabolomics reveals biomarkers of the atherosclerosis[J]. *J Sep Sci*, 2010, 33(17-18): 2776-2783.
- [39] Chai W, Liu Z. P38 mitogen-activated protein kinase mediates palmitate-induced apoptosis but not inhibitor of nuclear factor-kappaB degradation in human coronary artery endothelial cells [J]. *Endocrinology*, 2007, 148(4): 1622-1628.
- [40] Li D, Zhang L, Dong F, et al. Metabonomic changes associated with atherosclerosis progression for LDLR^{-/-} Mice [J]. *J Proteome Res*, 2015, 14(5): 2237-2254.
- [41] Koeth RA, Wang Z, Levison BS, et al. Intestinal microbiota metabolism of L-carnitine, a nutrient in red meat, promotes atherosclerosis [J]. *Nat Med*, 2013, 19(5): 576-585.
- [42] Wang Z, Klipfell E, Bennett BJ, et al. Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease [J]. *Nature*, 2011, 472(7341): 57-63.
- [43] Tian F, Gu L, Si A, et al. Metabolomic study on the faecal extracts of atherosclerosis mice and its application in a traditional Chinese medicine[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2015, 1007: 140-148.
- [44] Tian F, Gu L, Si A, et al. The metabolomic study on atherosclerosis mice and its application in a traditional Chinese medicine Sishen granule[J]. *Biomed Chromatogr*, 2016, 30(6): 969-975.
- [45] Dang VT, Huang A, Zhong LH, et al. Comprehensive plasma metabolomic analyses of atherosclerotic progression reveal alterations in glycerophospholipid and sphingolipid metabolism in apolipoprotein E-deficient mice [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 35037.
- [46] Jung S, Song SW, Lee S, et al. Metabolic phenotyping of human atherosclerotic plaques: metabolic alterations and their biological relevance in plaque-containing aorta [J]. *Atherosclerosis*, 2018, 269: 21-28.
- [47] Tzoulaki I, Castagne R, Boulange CL, et al. Serum metabolic signatures of coronary and carotid atherosclerosis and subsequent cardiovascular disease [J]. *Eur Heart J*, 2019, 40(34): 2883-2896.
- [48] 王丹丹, 王岚, 成龙, 等. 银丹心脑血管通及主要成分配伍对心肌缺血再灌注损伤的保护作用[J]. *中国中药杂志*, 2014, 39(9): 1690-1694.
- [49] Wang W, Wang L, Yang H, et al. Protective effects of yindanxinnaotong capsule in a rat model of myocardial ischemia/reperfusion injury[J]. *J Tradit Chin Med*, 2014, 34(6): 699-709.
- [50] Cheng L, Pan GF, Zhang XD, et al. Yindanxinnaotong, a Chinese compound medicine, synergistically attenuates atherosclerosis progress[J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 12333.
- [51] Chu LH, Annex BH, Popel AS. Computational drug repositioning for peripheral arterial disease: prediction of anti-inflammatory and pro-angiogenic therapeutics [J]. *Front Pharmacol*, 2015, 6: 179.
- [52] Lu CL, Zheng Q, Shen Q, et al. Uncovering the relationship and mechanisms of tartary buckwheat (*fagopyrum tataricum*) and type II diabetes, hypertension, and hyperlipidemia using a network pharmacology approach [J]. *Peer J*, 2017, 5: e4042.
- [53] Lee AY, Park W, Kang TW, et al. Network pharmacology-based prediction of active compounds and molecular targets in Yijin-Tang acting on hyperlipidaemia and atherosclerosis[J]. *J Ethnopharmacol*, 2018, 221: 151-159.

(此文编辑 朱雯霞)