

本文引用: 杨英, 张义炜, 陈宁园, 等. 外周血白细胞 PTK7 表达水平与冠心病的相关性及其诊断价值[J]. 中国动脉硬化杂志, 2023, 31(11): 958-968. DOI: 10.20039/j.cnki.1007-3949.2023.11.005.

· 临床研究 ·

[文章编号] 1007-3949(2023)31-11-0958-11

## 外周血白细胞 PTK7 表达水平与冠心病的相关性及其诊断价值

杨英, 张义炜, 陈宁园, 黄玲, 潘尚领

(广西医科大学基础医学院病理生理学教研室, 广西南宁市 530021)

[摘要] [目的] 探究蛋白酪氨酸激酶 7 (PTK7) 与冠心病 (CHD) 的相关性及其诊断价值。[方法] 通过 GEO 数据库获得目标基因。采用 StataSE15 求 PTK7 的总标准化平均差 (total SMD), 绘制总受试者特征 (SROC) 曲线。采用反转录定量 PCR (RT-qPCR) 验证 PTK7 在 CHD 和对照组人群样本中的表达情况, 并从 GEO 数据库搜索 CHD 相关单细胞 RNA 测序数据从而分析 PTK7 在不同细胞中的表达情况。通过 CDB 数据库预测 PTK7 的上游转录因子, 对差异共表达基因进行 GO 和 KEGG 富集分析。[结果] 通过分析从 GEO 数据库获取的数据集, 发现 PTK7 在 CHD 患者外周血白细胞 (PBL) 中高表达 (total SMD=0.81, 95% CI=0.17~1.45)。人群样本验证也证实了上述结果。绘制 SROC, 曲线下面积 (AUC)=0.79, 表明 PTK7 具有中等的区分 CHD 与非 CHD 的能力。单细胞 RNA 测序分析结果显示 PTK7 在正常外周血不同细胞中表达比例较低。此外通过 ChIP-seq 数据库预测 PTK7 潜在的上游转录因子, 发现 IRAK1、SNAI2 可能是 PTK7 的正相关上游转录因子, EP300、NIPBL 可能是 PTK7 的负相关上游转录因子。[结论] PBL 中 PTK7 的高表达与 CHD 发生呈正相关, 具有一定的诊断价值。

[关键词] 冠心病; 蛋白酪氨酸激酶 7; 单细胞 RNA 测序分析; 反转录定量 PCR; 生物信息学

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

### Impacts of protein tyrosine kinase 7 expression in peripheral leukocytes on the development of coronary heart disease and its diagnostic value

YANG Ying, ZHANG Yiwei, CHEN Ningyuan, HUANG Ling, PAN Shangling

(Department of Pathophysiology, School of Basic Medicine of Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi 530021, China)

[ABSTRACT] **Aim** To explore the correlation between protein tyrosine kinase 7 (PTK7) and coronary heart disease (CHD) and its diagnostic value. **Methods** Target genes were obtained through the Gene Expression Omnibus (GEO) database. StataSE15 was used to find the total standardized mean difference (SMD) of PTK7 and plot the summary receiver operating characteristic (SROC) curve. Next, reverse transcription quantitative polymerase chain reaction was used to verify the expression of PTK7 in CHD and non-CHD population samples and search for CHD-related single-cell RNA sequencing data from GEO to analyze the expression of PTK7 in different cells. The upstream transcription factor (TF) of PTK7 was predicted by the Cistrome Data Browser database. Moreover, enrichment analysis of the gene ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) were performed on the differentially co-expressed genes. **Results** By calculating the SMD of PTK7, it was found that PTK7 was highly expressed in the peripheral blood leukocytes (PBL) of patients with CHD (total SMD=0.81, 95% confidence interval=0.17~1.45). The population sample validation confirmed the above results. When SROC was plotted, the area under the curve (AUC) was 0.79, indicating that PTK7 has the ability to distinguish between CHD and non-CHD. The single-cell RNA sequencing results showed that the expression ratio of PTK7 was relatively low in different cells of normal peripheral blood. In addition, potential upstream TFs of PTK7 were predicted through the ChIP-seq database, where it was found that IRAK1, SNAI2 may be positive upstream TFs of PTK7, and EP300, NIPBL may be negative upstream TFs of PTK7. **Conclusion** Highly expressed

[收稿日期] 2023-04-12

[修回日期] 2023-08-28

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81960266); 广西自然科学基金面上项目(2022JJA140739); 广西医科大学长寿与老年相关疾病教育部重点实验室开放课题(KLLAD201902)

[作者简介] 杨英, 硕士研究生, 研究方向为代谢综合征分子遗传学, E-mail: 746742515@qq.com。通信作者潘尚领, 博士, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为代谢综合征分子遗传学, E-mail: slpan@gxmu.edu.cn。

PTK7 in PBL is positively correlated with the pathogenesis of CHD, demonstrating that PTK7 has definite diagnostic value on CHD.

[KEY WORDS] coronary heart disease; protein tyrosine kinase 7; single-cell RNA sequencing; reverse transcription quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR); bioinformatics

冠心病 (coronary heart disease, CHD) 是一种最常见的心脏病, 为冠状动脉狭窄、供血不足而引起的心肌功能障碍和器质性病变<sup>[1]</sup>。CHD 的发生受遗传及脂质、氨基酸、糖代谢等多因素的影响, 其核心发病环节是促炎因子和氧化应激因子释放导致血管内皮损伤, 进而促进泡沫细胞形成并聚集形成斑块, 最终导致冠状动脉粥样硬化<sup>[2]</sup>, 但其详尽的分子机制仍未能完全阐明。目前, 生物信息学的日益成熟为 CHD 研究提供了新的契机。我们前期对 GEO 数据库深入挖掘发现蛋白酪氨酸激酶 7 (protein tyrosine kinase 7, PTK7) 在 CHD 患者外周血白细胞 (peripheral blood leukocytes, PBL) 中高表达, 提示在 CHD 的发生发展中起重要作用, 具有一定的诊断价值。

PTK7 属于跨膜受体中受体酪氨酸激酶 (receptor tyrosine kinases, RTK) 的伪激酶家族, 由于其酪氨酸激酶样结构域而具有细胞内催化活性<sup>[3]</sup>, 与多种癌症的发生发展有重要关联, 在肺癌<sup>[4]</sup>、胃癌<sup>[5]</sup>、乳腺癌<sup>[6]</sup>等癌症组织中均高表达。既往研究表明 PTK7 与 Wnt 信号通路<sup>[7]</sup>密切相关, 而 Wnt 信号通路也参与动脉粥样硬化相关的炎症反应、脂质积累和单核细胞聚集<sup>[8]</sup>, 例如, 有研究报道低密度脂蛋白受体相关蛋白 6 (low density lipoprotein receptor-related protein 6, LRP6) 可通过 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路增强炎症反应并导致 CHD 的发生<sup>[9]</sup>; CHD 大鼠心肌组织中 Wnt-1 和  $\beta$ -catenin 蛋白表达明显高于正常组, 提示 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路在 CHD 中被激活<sup>[10]</sup>。PTK7 与 Wnt 信号通路的密切联系提示 PTK7 在 CHD 发生发展中有一定的作用, 但目前尚缺乏相关的临床证据, 同时, PTK7 在 CHD 发病中的分子机制尚不清楚。因此, 本研究的重点在于揭示 PTK7 与 CHD 的相关性及其诊断价值, 并初步探讨其分子机制。

## 1 资料和方法

### 1.1 数据采集

以“coronary heart disease”为关键词, 在基因表达综合数据库 (Gene Expression Omnibus, GEO) 中搜索 CHD 相关基因表达矩阵数据集。以人类 (homo-

sapiens)、RNA-seq、CHD 和非 CHD 样本数量不少于 3 例为纳入标准, 共获得 11 个来自于 PBL 的数据集 (表 1)。首先使用 Rversion4.2.1 中的 Limma 包, 标准化平均差 (standardized mean difference, SMD) 筛选特征基因。 $|\log_2 \text{Fold Change}| > 0.5$ , 重复  $\geq 2$ ,  $|\text{total SMD}| > 0.5$ ,  $P < 0.05$  被认为差异有显著性。最终, PTK7 被筛选为与 CHD 关系最为密切的基因。

表 1. 本研究使用数据集的详细信息

Table 1. Detailed information of the datasets involved in this study

数据集	平台	国家	年份	对照组/ CHD 组/例
GSE7638	GPL571	瑞士	2008	51/109
GSE10195	GPL1708	美国	2008	14/27
GSE12288	GPL96	瑞士	2008	112/110
GSEE23561	GPL10775	美国	2010	9/6
GSE42148	GPL13607	印度	2012	13/11
GSE71226	GPL570	中国	2015	3/3
GSE98583	GPL571	印度	2017	12/6
GSE113079	GPL20115	中国	2019	93/48
GSE141512	GPL17586	俄罗斯	2019	6/6
GSE166780	GPL20795	中国	2021	8/8
GSE202625	GPL23934	意大利	2022	25/27

### 1.2 RT-qPCR 检测 CHD 患者 PBL 中 PTK7 表达

通过反转录定量 PCR (reverse transcription quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR) 检测 PTK7 在 CHD 患者 PBL 中的表达情况。CHD 患者为 55 例, 对照组为 50 例。CHD 患者来自广西壮族自治区人民医院心血管内科。对照组为在该院体检中心参加健康体检, 各检测指标均在正常范围且与 CHD 组年龄匹配的健康中老年人。两组的基本临床资料见表 2。CHD 纳入标准: (1) 经冠状动脉造影术诊断冠状动脉中重度狭窄; (2) 具有心电图心肌缺血的表现, 如 ST 段抬高等; (3) 符合《2018 版冠心病诊断与治疗指南》的诊断标准; (4) 具备正常的认知与沟通能力, 自愿参与本项研究。排除标准: (1) 合并严重肝肾功能不全; (2) 合并恶性肿瘤、

血液疾病、自身免疫性疾病等;(3)合并有精神障碍性疾病。所有参与者均签署知情同意书,本研究由广西医科大学伦理委员会批准。各研究对象抽取静脉血 3 mL 左右,加入 7 mL 红细胞裂解液,4 °C 下 4 000 r/min 离心 5 min,留取沉淀,加入 1 mL 红细胞裂解液,吹打混匀后转移至 2 mL 管,4 °C 下 12 000 r/min 离心 2 min,弃掉上清液,留取下层白细胞沉淀<sup>[11]</sup>。采用上海生工生物技术公司柱式 microRNA 提取试剂盒从白细胞中提取 mRNA。使用南京诺唯赞生物科技有限公司 HiScript III RT SuperMix for qPCR(+gDNA wiper) 试剂盒将 mRNA 反转录为 cDNA,用无酶水稀释 3 倍。通过美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information,NCBI)设计 PTK7 的引物,上游序列为 5'-AGCAGTTCCTGAGGATTTCCA-3',下游序列为 5'-AAAGCGTTGTTGGACAGGT-3'。以 GAPDH 作为内参基因校正 PTK7 表达量,GAPDH 上游序列为 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3',下游序列为 5'-TTCCCGTTCAGCTCAGGGAT-3',PTK7 的表达量由  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  公式估算。RT-qPCR 扩增反应条件如下:95 °C 预变性 180 s;随后在 95 °C 10 s,60 °C 60 s 条件下进行 40 个循环;95 °C 10 s,60 °C 60 s,97 °C 1 s 后得到溶解曲线,最后 37 °C 30 s 进行降温。根据临床样本中 PTK7 的表达水平,绘制 PTK7 的受试者特征(receiver operating characteristic,ROC)曲线并计算曲线下面积(area under the curve,AUC),以判断 PTK7 鉴别 CHD 与非 CHD 的能力。同时获取对照组和 CHD 患者的 9 项临床参数,分别为舒张压(diastolic blood pressure,DBP)、收缩压(systolic blood pressure,SBP)、脉压(pulse pressure,PP)、体质指数(body mass index,BMI)、空腹血糖(fasting blood glucose,FBG)、总胆固醇(total cholesterol,TC)、甘油三酯(triglyceride,TG)、高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol,HDLc)和低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol,LDLc)。分析 PTK7 与临床参数之间的相关性,以了解相互之间的联系。

### 1.3 利用 GEO 数据库获取数据集并进行单细胞 RNA 测序分析

通过 GEO 数据库检索来自于外周血的单细胞 RNA 测序数据集,进一步明确 PTK7 在不同细胞中的表达情况。最终,获得包含 4 例正常外周血样本的数据集 GSE174609。数据处理和分析使用 Rversion4.2.1 中的 Seurat 包。nFeature\_RNA>200 并且

<2 500,percent.mt<5%的细胞被用于下步分析<sup>[12]</sup>。使用 Normalize Data 包进行样本归一化后,利用 Find Integration Anchors 和 Integrate Data 函数合并 4 例样本。接着,使用主成分分析(principal component analysis,PCA)后,使用 t 分布式随机邻居嵌入(t-distributed stochastic neighbor embedding,t-SNE)进行细胞聚类,并二维展示细胞。使用 SingleR 包将亚群注释为细胞。最后采用 Monocle 包进行拟时序分析,观察 PTK7 在细胞不同阶段的表达变化。

表 2. 两组心血管危险因素比较

Table 2. Comparison of cardiovascular risks between two groups

临床参数	对照组	CHD 组	t/Z	P
年龄/岁	61.58±8.33	63.80±12.15	-1.641	0.101
舒张压/mmHg	78.92±10.48	76.92±15.00	-0.503	0.615
收缩压/mmHg	131.78±16.03	133.42±21.90	-0.124	0.901
脉压差/mmHg	52.86±11.79	54.98±18.38	0.682	0.497
BMI/(kg/m <sup>2</sup> )	24.18±2.95	24.62±3.89	0.614	0.541
FBG/(mmol/L)	5.18±0.76	5.21±1.88	-1.841	0.066
TC/(mmol/L)	5.00±0.77	4.49±1.16	2.567	0.012
TG/(mmol/L)	1.52±0.68	1.55±0.82	-0.137	0.891
HDLc/(mmol/L)	1.36±0.28	1.11±0.29	-4.438	<0.0001
LDLc/(mmol/L)	3.28±0.75	2.76±0.83	3.314	0.001

### 1.4 利用 CDB 数据库以及 SMD 预测 PTK7 上游潜在转录因子

将 PTK7 导入相对全面的 ChIP-seq 数据库 Cistrome Data Browser (CDB) 中,预测 PTK7 潜在的上游转录因子。采用 Spearman 相关性分析和 SMD 进一步鉴定 PTK7 的上游转录因子,并遵循以下纳入标准:|r|>0.4;重复次数≥3;|SMD|>0;P<0.05。

### 1.5 富集分析

Rversion4.2.1 中 Spearman 相关性分析算法和 Meta 包用于评估 PTK7 与每个数据集中每个基因之间的相关性,并获得 PTK7 共表达基因。筛选标准为:|r|≥0.4;P<0.05;重复次数≥3。然后利用 Rversion4.2.1 计算所有共表达基因的 SMD,对差异共表达基因进行筛选。纳入标准如下:|SMD|>0;P<0.05。使用免费在线功能注释工具 Metascape 对差异共表达基因进行基因本体(gene ontology,GO)功能注释和京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes,KEGG)通路分

析<sup>[13]</sup>。为了进一步了解 PTK7 差异共表达基因主要通过哪些通路发挥作用,将富集分析所得到的所有通路进行聚类分组。具有相似基因的通路被分为一组,组内 *P* 值最小的通路被称为该组代表性通路并在图中展示,同时,代表性通路的 *P* 值也作为该组在所有组别中排名的标准,*P* 值越小,排名越高。最终,选择排名前 20 的组别。

### 1.6 统计分析

在各个数据集和临床样本中,如果 PTK7 表达量同时满足方差齐性和正态分布,则采用 Student's *t* 检验;否则,采用非参数检验。利用 Stata SE 15 计算 PTK7 的 SMD,模型选择为随机效应模型。Egger's 检验用于检验发表偏倚(publication bias)。敏感性分析用于确定单个研究是否会显著影响荟萃分析的结果。接下来使用 Graphpad Prism 8.4.3 版本绘制 ROC 曲线,基于 ROC 曲线的结果,使用 Stata SE 15 绘制总受试者特征(summary receiver operating characteristic, SROC) 曲线,并采用 Deek's 检

验方法检验其发表偏倚。*P* < 0.05 表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 PTK7 表达情况

通过分析 PTK7 在上述 11 个数据集中的表达情况,发现 PTK7 在 GSE23561、GSE71226、GSE113079 和 GSE141512 中高表达(*P* < 0.05)。total SMD = 0.81, 95% CI = 0.17 ~ 1.45, Egger's 检验 *P* = 0.21 (图 1A 和 1B),表明 PTK7 在 PBL 中高表达,无发表偏倚。敏感性分析显示,结果不受单一研究的影响(图 1C)。为了进一步探讨 PBL 中 PTK7 表达升高对于 CHD 的作用,使用 Graphpad Prism 8.4.3 和 Stata SE 15 绘制 ROC 和 SROC 曲线。结果显示, SROC 的 AUC = 0.79 (图 2A 和 2B),表明 PTK7 在 PBL 中高表达对于 CHD 具有中等诊断价值。Deek's 检验 *P* = 0.46 (图 2C),提示无发表偏倚。

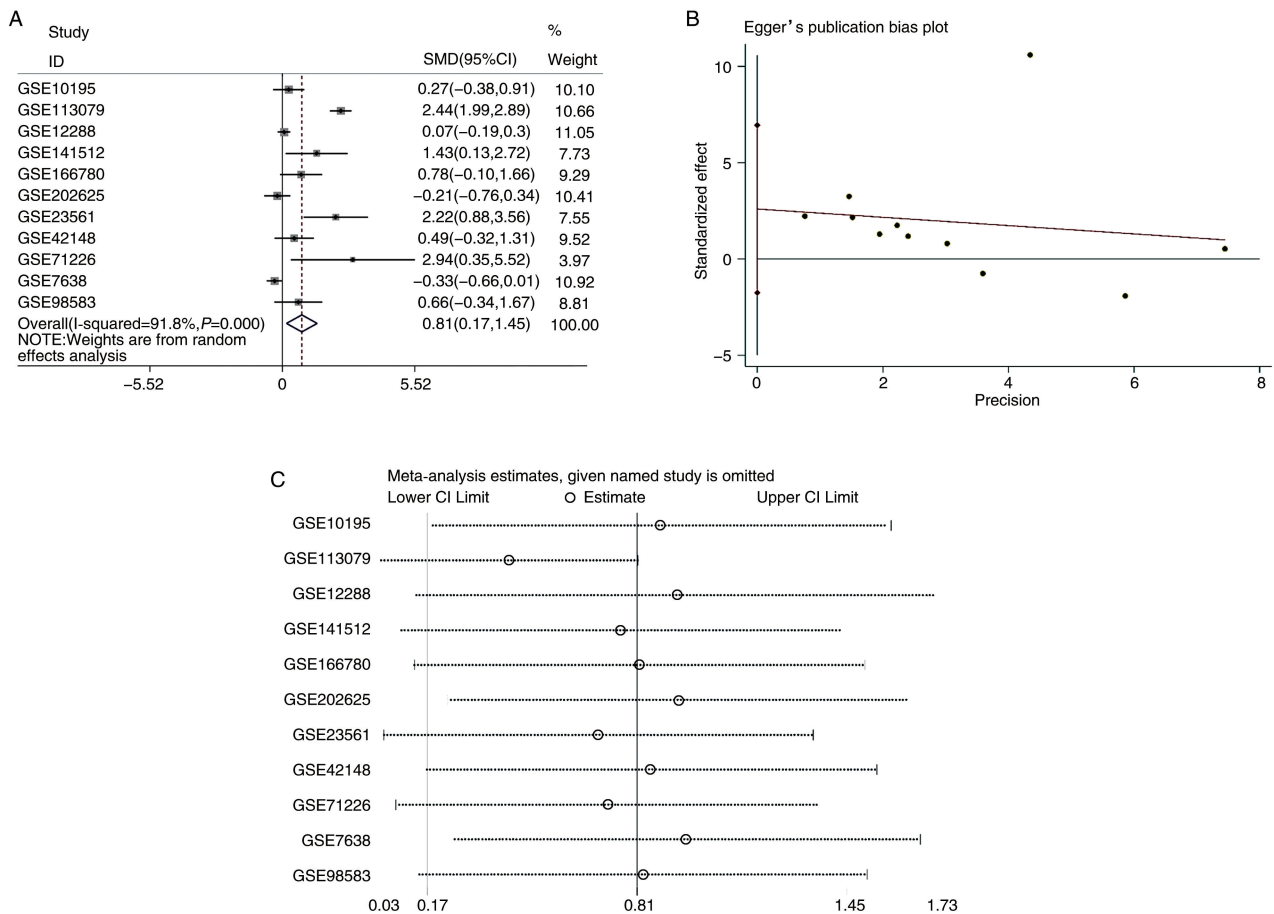


图 1. PTK7 在 CHD 患者 PBL 中高表达

A 为森林图, B 为 Egger's 检验, C 为敏感性分析。

Figure 1. PTK7 is highly expressed in PBL of CHD patients

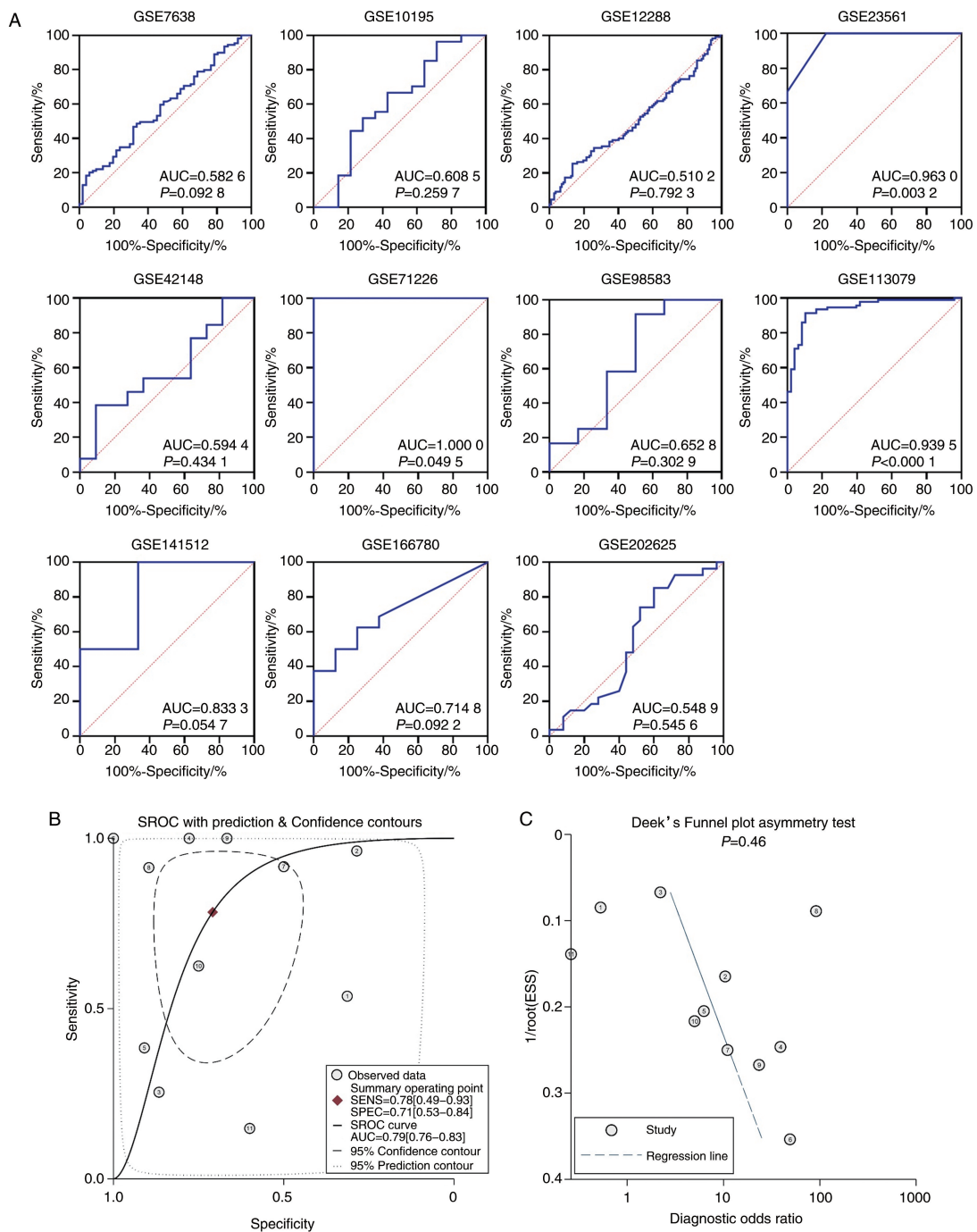


图 2. ROC 和 SROC 结果

A 为 PTK7 在 PBL 中的 ROC 曲线, B 为 PTK7 在 PBL 中的 SROC 曲线, C 为 Deek's 检验。

Figure 2. ROC and SROC results

## 2.2 RT-qPCR 验证 PTK7 在冠心病患者外周血白细胞中高表达

RT-qPCR 结果发现 PTK7 在 CHD 患者的 PBL 中显著高表达, 其表达量约为对照组的 1.75 倍 ( $P < 0.0001$ ) (图 3A)。绘制 PTK7 在两组样本中表达量的 ROC 曲线, 其  $AUC = 0.7229$  ( $P < 0.0001$ ), 表明 PTK7 在临床样本 PBL 中高表达对 CHD 具有中

等诊断价值 (图 3B)。PTK7 在 PBL 中的表达量与各临床参数表达水平相关性分析结果显示, 对照组 PTK7 与 BMI ( $r = 0.323, P = 0.027$ )、血浆 TG 水平 ( $r = 0.293, P = 0.039$ ) 呈正相关, 与 HDLC ( $r = -0.364, P = 0.009$ ) 呈负相关。在 CHD 组中, PTK7 与 BMI ( $r = 0.301, P = 0.040$ )、TG ( $r = 0.312, P = 0.024$ ) 呈正相关, 与 HDLC ( $r = -0.289, P = 0.036$ )

呈负相关。PTK7 与其他临床参数无显著相关性 ( $P>0.05$ )。

### 2.3 PTK7 在外周血不同细胞之间的表达

通过 TSNE 聚类,将所有细胞分为 14 个亚群(图 4A)。SingleR 包将 14 个亚群分为 5 类细胞,其中 0 亚群、1 亚群、2 亚群、4 亚群、5 亚群、7 亚群、9 亚群、10 亚群、12 亚群对应 T 细胞;3 亚群、11 亚群

对应单核细胞;13 亚群对应血小板;8 亚群对应 B 细胞;6 亚群对应 NK 细胞(图 4B)。PTK7 在正常外周血某类细胞中的表达量和在剩余 4 类细胞中的表达量相比并无明显差异(图 4C 和 4D),且在各类细胞中表达比例较低(图 4E)。拟时序分析将细胞发育轨迹分为 5 个阶段,PTK7 在不同阶段表达差异不显著(图 5)。

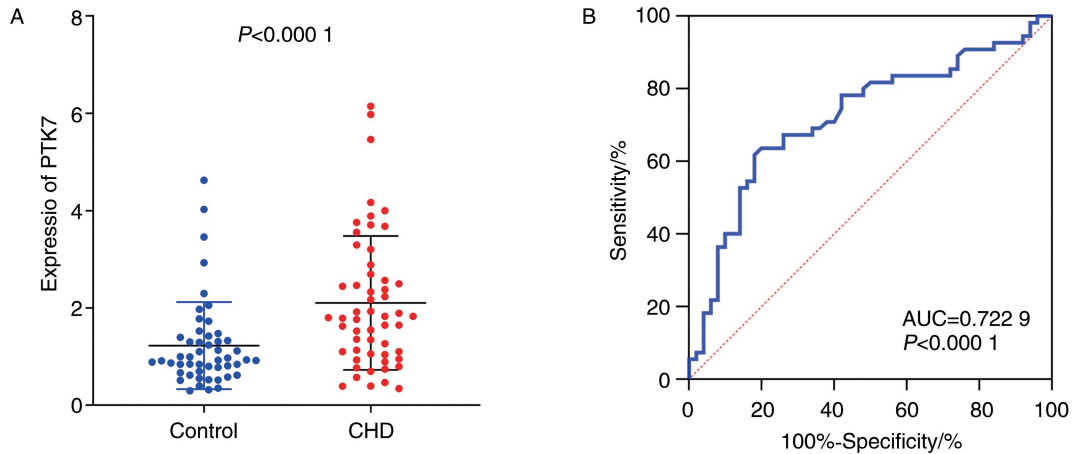


图 3. PTK7 在 CHD 组及对照组中的表达量及 ROC 曲线

A 为 PTK7 在 CHD 患者 PBL 中显著高表达, B 为 PTK7 在 PBL 中的 ROC 曲线。

Figure 3. The expression of PTK7 in CHD patients and controls and its ROC curve

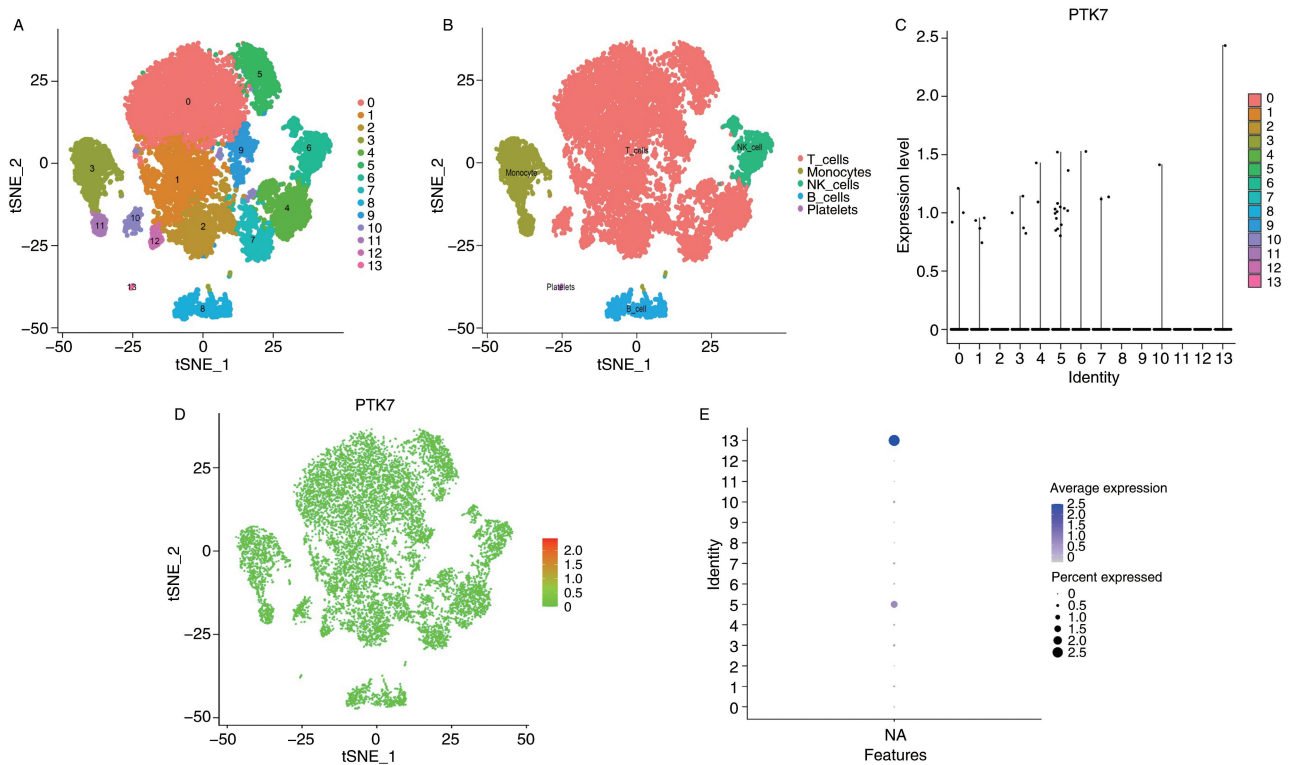


图 4. PTK7 在外周血不同细胞中的表达情况

A、B 表示 14 个细胞亚群及其所对应的细胞; C、D 表示 PTK7 在各个细胞亚群中的表达量,各个亚群之间相比无统计学差异, D 中红色点表示有 PTK7 表达的细胞; E 表示 PTK7 在各个亚群中的平均表达量和表达占比,例如 5 亚群属于 T 细胞,而 PTK7 只在 5 亚群 1.5% 左右的 T 细胞中有所表达。

Figure 4. The expression of PTK7 in different cell types of peripheral blood

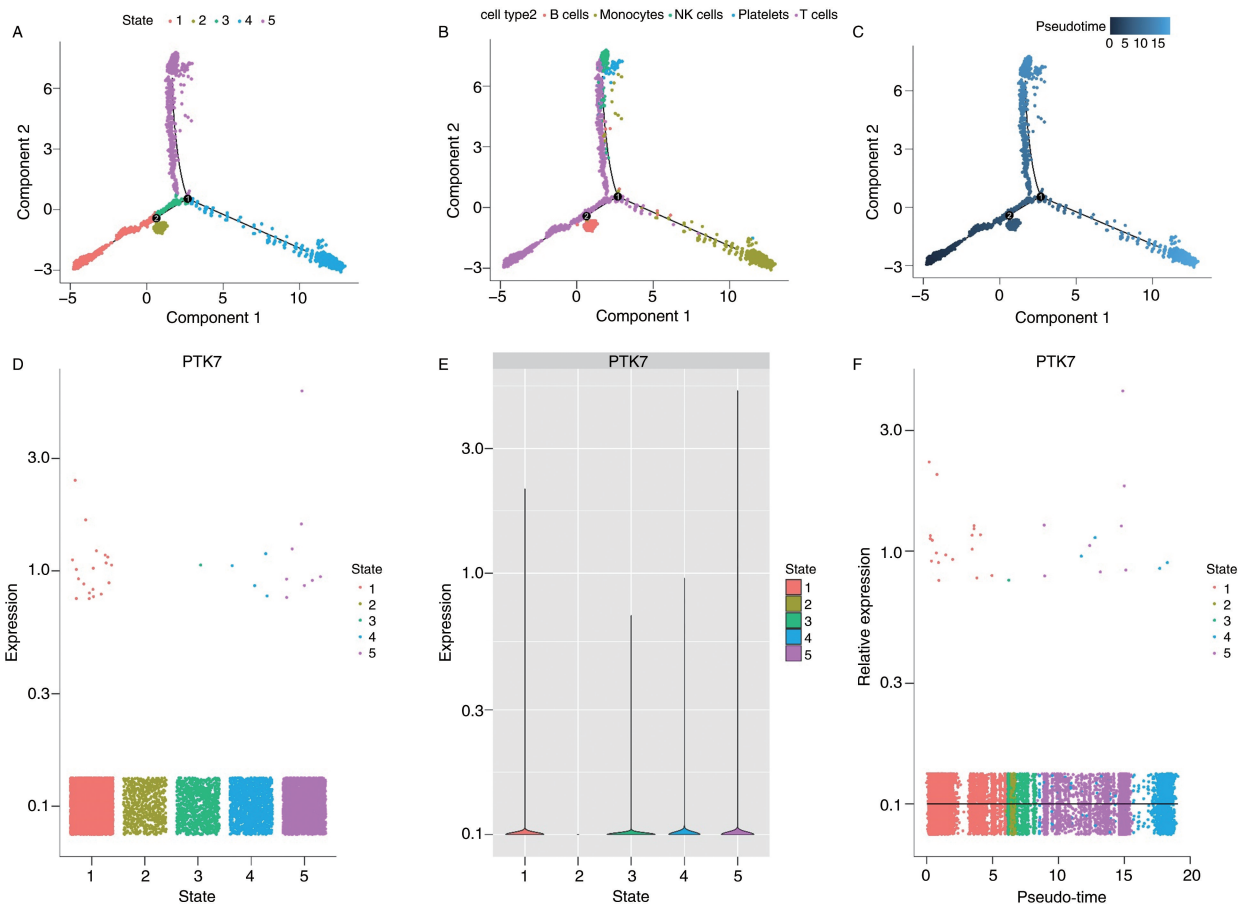


图 5. 拟时序分析

A 表示将不同细胞亚群按发育轨迹分成 5 个时期;B 表示细胞所属时期;C 表示发育早晚,颜色越浅,发育越晚;  
D ~ F 表示 PTK7 在某个时期表达量与剩下 4 个时期相比无明显差异。

Figure 5. Pseudo-time analysis

## 2.4 上游潜在转录因子筛选

通过 CDB 数据库共筛选出 95 个潜在的上游转录因子。采用 Spearman 相关性分析和 SMD 以进一步确定 PTK7 的潜在上游转录因子。最终,得到了两个差异正相关的上游转录因子 IRAK1 (total SMD=0.33,95% CI=0.038~0.624, $P=0.027$ ) (图 6A)、SNAI2 (total SMD=0.45,95% CI=0.012~0.885, $P=0.044$ ) (图 6B),和两个差异负相关的上游转录因子 EP300 (total SMD=-0.33,95% CI=-0.652~-0.008, $P=0.045$ ) (图 6C)、NIPBL (total SMD=-0.38,95% CI=-0.750~-0.004, $P=0.048$ ) (图 6D)。因此,IRAK1 和 SNAI2 可能是 PTK7 的正向上游转录因子,而 EP300 和 NIPBL 可能是 PTK7 的负向上游转录因子。

## 2.5 PTK7 差异共表达基因功能注释

通过相关性分析和计算 SMD,共得到 PTK7 差异正相关共表达基因 212 个,PTK7 差异负相关共表达基因 39 个。聚类富集分析显示,脂质结合(lipid

binding)、细胞对生长因子刺激的应答(cellular response to growth factor stimulus)、分泌调节(regulation of secretion)是 PTK7 差异正相关共表达基因所富集的排名前三的通路(图 7A)。RNA 剪接(RNA splicing)、昼夜节律(circadian rhythm)、细胞内含蛋白复合物(intracellular protein-containing complex)是 PTK7 差异负相关共表达基因所富集的排名前三的通路(图 7B)。

## 3 讨论

本文前期通过生信分析发现 PTK7 在 CHD 患者 PBL 中高表达,并通过单细胞测序分析发现其在正常人群外周血细胞中表达比例较低。为了验证 PTK7 在 CHD 患者 PBL 中的相对表达情况,本研究收集 CHD 样本并通过 RT-qPCR 证实 PTK7 在 CHD 患者 PBL 中高表达。最后,通过生信分析初步探讨了其作用机制。但 PTK7 在 CHD 患者 PBL 中表达

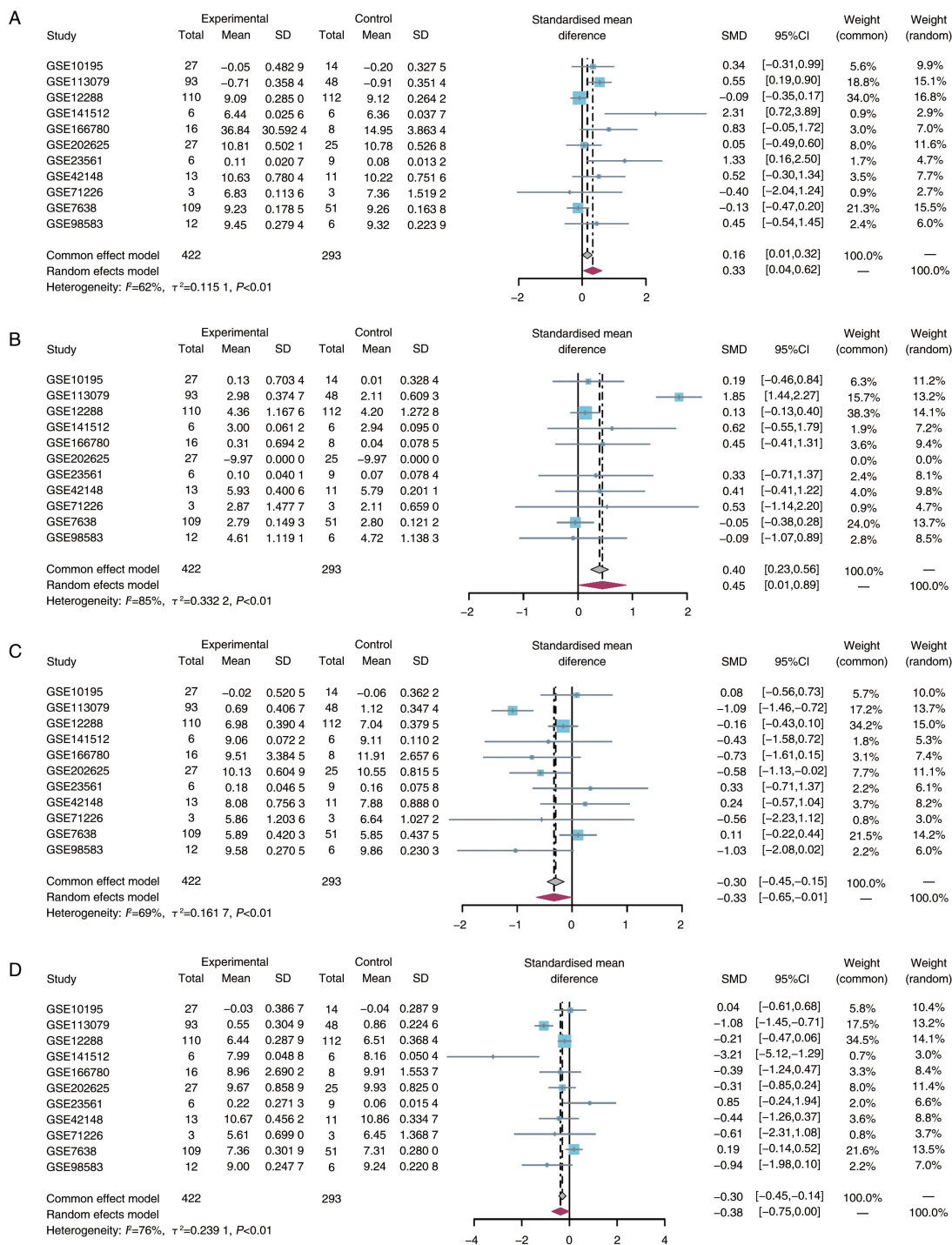


图 6. 转录因子森林图

A 为 IRAK1 森林图, B 为 SNAI2 森林图, C 为 EP300 森林图, D 为 NIPBL 森林图。“—”表示数据无法获取。

Figure 6. The forest plot of transcription factors

上升与 CHD 的关系仍需进一步讨论。

肥胖及 TG 升高是 CHD 的独立危险因素, 与 CHD 密切相关。BMI 和血浆 TG 水平增高, CHD 的风险逐渐增加<sup>[14]</sup>。而 HDLC 水平与 CHD 风险呈负相关<sup>[15]</sup>。本研究结果显示, PTK7 在冠心病 PBL 中的表达与 BMI、TG 水平呈正相关, 与 HDLC 水平呈

负相关, 进一步表明 PTK7 是 CHD 的危险因素。

单核细胞在动脉粥样硬化中至关重要。在炎症因子刺激下, 单核细胞转移至血管内膜并分化为巨噬细胞, 巨噬细胞吞噬脂质形成泡沫细胞是动脉粥样硬化的基础<sup>[16]</sup>。T 细胞在动脉粥样硬化形成的过程中也起到了促进作用, 它可被炎症因子吸引

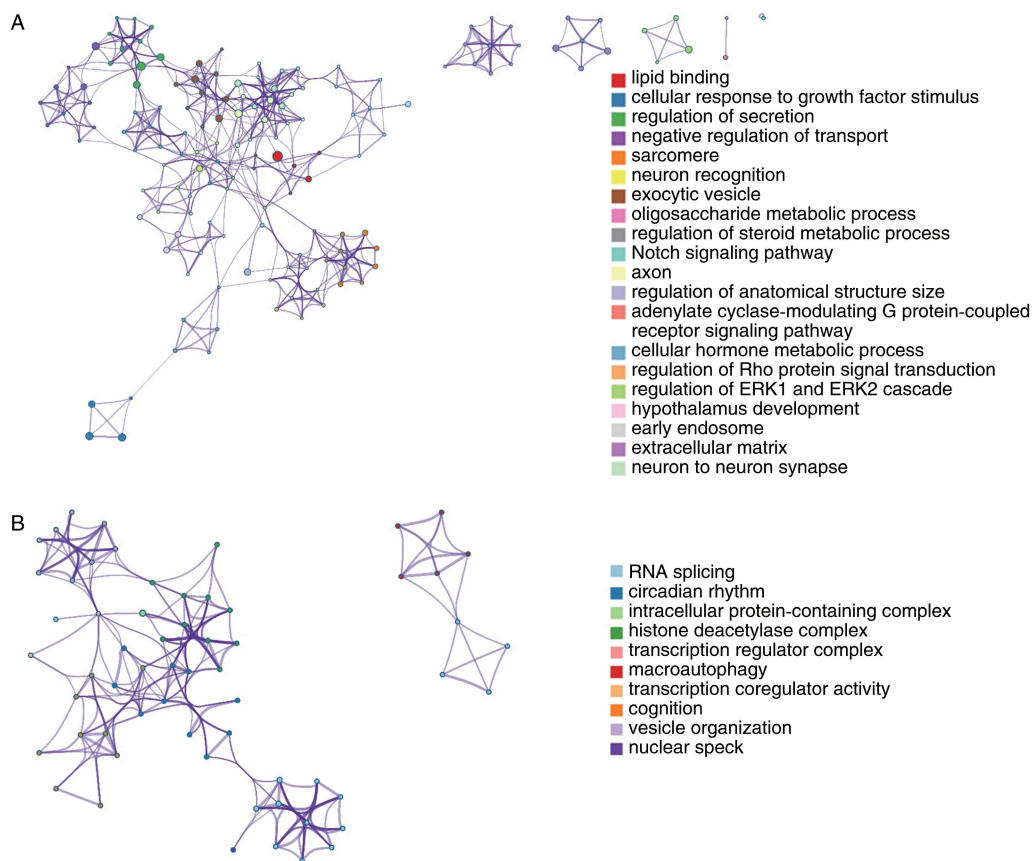


图 7. PTK7 差异共表达基因聚类富集分析

A 为 PTK7 差异正相关基因聚类分析排名前 20 的组,图中展示的是各个组  $P$  值最小的代表性通路,不同颜色表示不同通路。

其中相同颜色的圆点有多个,表示同组内其他通路。组内或组间相似性 $>0.3$  通路用线连接,线越粗表示相似性越强。

B 为 PTK7 差异负相关基因聚类分析排名前 10 的组(只有 10 组),其他如上所述。

Figure 7. Cluster enrichment analysis of PTK7 differential coexpression genes

至血管壁促进斑块的形成<sup>[17]</sup>。B 细胞在血管周围脂肪组织中亦有较多的聚集,其产生的免疫球蛋白和细胞因子也被认为参与了动脉粥样硬化<sup>[18]</sup>。而自然杀伤(natural killer, NK)细胞在 CHD 中的凋亡率增加,数量减少,与 CHD 的发生呈负相关<sup>[19]</sup>。经过前述分析已发现 PTK7 在 CHD 患者 PBL 中高表达,在对照组中相对于 CHD 组表达较低。单细胞 RNA 测序分析表明 PTK7 在正常人外周血不同细胞中表达比例较低,因此我们推测高表达的 PTK7 可能激活单核细胞、T 细胞及 B 细胞,从而促进 CHD 的发展,而低表达的 PTK7 可能使这些细胞处于一个相对稳定的状态,进而抑制 CHD 的发生。但 PTK7 与这些细胞的关系仍需通过实验来进一步证明。

先前报道称 IRAK1 和 SNAI2 在 CHD 患者 PBL 中显著高表达<sup>[20]</sup>。此外,有研究发现 SNAI2 可促进血管内皮细胞上皮-间充质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)和血管重塑<sup>[21]</sup>,血管内皮

EMT 的形成可促进动脉粥样硬化的形成及 CHD 的发生和发展<sup>[22]</sup>。PTK7 表达上升也被证实与 EMT 标志物表达上调呈正相关<sup>[23]</sup>。以上研究提示 IRAK1 和 SNAI2 可能作为 PTK7 的正向上游转录因子调控 PTK7 的表达,SNAI2 可能通过上调 PTK7 的表达在 EMT 中发挥重要作用,从而影响 CHD 的进展。同时,也有报道 EP300 在 CHD 中下调<sup>[24]</sup>,我们前面的分析结果与此一致,提示 EP300 可能作为 PTK7 的负向上游转录因子抑制 PTK7 的表达。NIPBL 与 CHD 之间的联系目前尚无报道,但经过数据分析后,发现 NIPBL 很可能也是 PTK7 的上游负向转录因子。

在所有富集通路中,Notch 信号通路和巨自噬(macroautophagy)引起了我们的兴趣。Notch 信号通路在血管系统的生长发育中起着重要的作用<sup>[25]</sup>。Notch 信号通路可能参与了细胞衰老过程,它的激活增加了人上皮细胞促炎因子的水平,促进单核细胞的转移,从而使炎症反应更加强烈<sup>[26]</sup>。多项证据

表明 Notch 信号通路的激活与动脉粥样硬化和 CHD 显著相关, Notch 可通过加剧炎症和细胞衰老加速 CHD 进程<sup>[27]</sup>。在动脉粥样硬化发展进程中, 胆固醇代谢失调会使胆固醇在血管平滑肌细胞和巨噬细胞中聚集形成泡沫细胞。有研究表明, 巨噬细胞自噬能阻止泡沫细胞的产生, 从而抑制动脉粥样硬化的发展<sup>[28]</sup>。

本研究富集分析结果显示, 差异正相关共表达基因在 Notch 信号通路中富集, 差异负相关基因富集在巨自噬中。PTK7 和差异正相关基因可能通过 Notch 信号通路促进 CHD 的发生, 而差异负相关基因在 CHD 中的表达降低从而使巨噬细胞自噬受到抑制也为 CHD 的发生起到了推波助澜的作用。这也为我们理解 PTK7 对 CHD 的作用机制提供了新的启示。

综上所述, PTK7 在 CHD 患者 PBL 中高表达, 具有一定的临床意义和鉴别 CHD 的能力。单细胞 RNA 测序分析显示 PTK7 在 CHD 冠状动脉组织细胞中低表达, 其表达趋势与外周血相反, 这为日后的研究提供了新的思路, 提示 CHD 的分子机制较为复杂。IRAK1、SNAI2、EP300、NIPBL 可能作为 PTK7 的上游调节因子调控 PTK7 的表达进而影响 CHD 的发生发展。富集分析显示, PTK7 及其共表达差异基因富集在 Notch 和巨自噬信号通路中, 而 Notch 和巨自噬又与 CHD 有着密切的联系, 这为深入了解 PTK7 在 CHD 中的分子机制提供了新的思路。药物-基因靶点预测有助于设计 CHD 的治疗药物。总而言之, PTK7 在 CHD 患者外周血中高表达, 并在 CHD 的发生发展中起重要作用, 具有一定的诊断价值。

#### 【参考文献】

[1] 李明, 乔晨晖, 张伟华, 等. miR-301 通过激活 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路改善冠心病大鼠心肌细胞凋亡[J]. 中国动脉硬化杂志, 2022, 30(11): 949-954.  
LI M, QIAO C H, ZHANG W H, et al. MiR-301 improves cardiomyocyte apoptosis in rats with coronary heart disease by activating Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway[J]. Chin J Arterioscler, 2022, 30(11): 949-954.

[2] 张辉, 赵东升, 王云豹. 增强型体外反搏通过调节 endocan-1 和 vaspin 水平改善血管内皮功能障碍[J]. 中国动脉硬化杂志, 2022, 30(2): 141-146.  
ZHANG H, ZHAO D S, WANG Y B. Enhanced external counter pulsation improves endothelial dysfunction by regulating endocan-1 and vaspin levels[J]. Chin J Arterioscler, 2022, 30(2): 141-146.

[3] KARVONEN H, PERTTILÄ R, NIININEN W, et al. Targeting Wnt signaling pseudokinases in hematological cancers [J]. Eur J Haematol, 2018, 101(4): 457-465.

[4] JIE Y M, LIU G J, FENG L N, et al. PTK7-targeting CAR T-cells for the treatment of lung cancer and other malignancies[J]. Front Immunol, 2021, 12: 665970.

[5] LI C L, YANG S H, LI R, et al. Dual-Aptamer-targeted immunomagnetic nanoparticles to accurately explore the correlations between circulating tumor cells and gastric cancer[J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2022, 14(6): 7646-7658.

[6] CUI N P, QIAO S, JIANG S, et al. Protein tyrosine kinase 7 regulates EGFR/Akt signaling pathway and correlates with malignant progression in Triple-negative breast cancer[J]. Front Oncol, 2021, 11: 699889.

[7] YUN J N, HANSEN S, MORRIS O, et al. Senescent cells perturb intestinal stem cell differentiation through PTK7 induced noncanonical Wnt and YAP signaling[J]. Nat Commun, 2023, 14(1): 156.

[8] 李敏, 朱奕, 方丽娟, 等. Wnt 信号通路在动脉粥样硬化及血管钙化中的研究进展[J]. 中国动脉硬化杂志, 2021, 29(11): 995-999.  
LI M, ZHU Y, FANG L J, et al. Research progress of Wnt signaling pathway in atherosclerosis and vascular calcification [J]. Chin J Arterioscler, 2021, 29(11): 995-999.

[9] TSAOUSI A, WILLIAMS H, LYON C A, et al. Wnt4/ $\beta$ -catenin signaling induces VSMC proliferation and is associated with intimal thickening [J]. Circ Res, 2011, 108(4): 427-436.

[10] LI X X, HOU L L, CHENG Z P, et al. Overexpression of GAS5 inhibits abnormal activation of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway in myocardial tissues of rats with coronary artery disease [J]. J Cell Physiol, 2019, 234(7): 11348-11359.

[11] HENG Z, RUAN L L, GAN R X. Three methods to purify leukocytes and RNA quality assessment[J]. Biopreserv Biobank, 2018, 16(6): 434-438.

[12] WANG X B, MIAO J Y, WANG S Z, et al. Single-cell RNA-seq reveals the genesis and heterogeneity of tumor microenvironment in pancreatic undifferentiated carcinoma with osteoclast-like giant-cells[J]. Mol Cancer, 2022, 21(1): 133.

[13] ZHOU Y Y, ZHOU B, PACHE L, et al. Metascape provides a biologist-oriented resource for the analysis of systems-level datasets[J]. Nat Commun, 2019, 10(1): 1523.

[14] DI GIORGI N, MICHELUCCI E, SMIT J M, et al. A specific plasma lipid signature associated with high triglycerides and low HDL cholesterol identifies residual CAD

- risk in patients with chronic coronary syndrome[J]. *Atherosclerosis*, 2021, 339: 1-11.
- [15] 曹佳, 刘发权, 喻红. HDL功能检测与冠状动脉斑块的相关性[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2018, 26(10): 1045-1051.
- CAO J, LIU F Q, YU H. Correlation between HDL function and coronary artery plaque[J]. *Chin J Arterioscler*, 2018, 26(10): 1045-1051.
- [16] ARNOLD K A, BLAIR J E, PAUL J D, et al. Monocyte and macrophage subtypes as paired cell biomarkers for coronary artery disease[J]. *Exp Physiol*, 2019, 104(9): 1343-1352.
- [17] LIBBY P, LICHTMAN A H, HANSSON G K. Immune effector mechanisms implicated in atherosclerosis: from mice to humans[J]. *Immunity*, 2013, 38(6): 1092-1104.
- [18] PATTARABANJIRD T, LI C, MCNAMARA C. B cells in atherosclerosis: mechanisms and potential clinical applications[J]. *JACC Basic Transl Sci*, 2021, 6(6): 546-563.
- [19] BACKTEMAN K, ERNERUDH J, JONASSON L N K. Cell deficit in coronary artery disease: no aberrations in phenotype but sustained reduction of NK cells is associated with low-grade inflammation[J]. *Clin Exp Immunol*, 2014, 175(1): 104-112.
- [20] TAKAHASHI Y J, SATOH M, MINAMI Y S T, et al. Expression of miR-146a/b is associated with the Toll-like receptor 4 signal in coronary artery disease: effect of renin-angiotensin system blockade and statins on miRNA-146a/b and Toll-like receptor 4 levels[J]. *Clin Sci (Lond)*, 2010, 119(9): 395-405.
- [21] JACKSON-WEAVER O, UNGVIJANPUNYA N, YUAN Y, et al. PRMT1-p53 pathway controls epicardial EMT and invasion[J]. *Cell Rep*, 2020, 31(10): 107739.
- [22] WU X X, DU X C, YANG Y H, et al. Inhibition of miR-122 reduced atherosclerotic lesion formation by regulating NPAS3-mediated endothelial to mesenchymal transition[J]. *Life Sci*, 2021, 265: 118816.
- [23] CHAN D N, AZGHADI S F, FENG J, et al. PTK7 marks the first human developmental EMT *in vitro* [J]. *PLoS One*, 2012, 7(11): e50432.
- [24] DU Y W, HU Y N, WEN N Y, et al. Abnormal expression of TGFBR2, EGF, LRP10, and IQGAP1 is involved in the pathogenesis of coronary artery disease [J]. *Rev Cardiovasc Med*, 2021, 22(3): 947-958.
- [25] ZHAO X C, ZHANG T M, YAN Y Q, et al. Notch signaling regulates vessel structure and function via Hspg2[J]. *Gene*, 2022, 826: 146439.
- [26] LIU Z J, TAN Y R, BEECHAM G W, et al. Notch activation induces endothelial cell senescence and pro-inflammatory response: implication of Notch signaling in atherosclerosis[J]. *Atherosclerosis*, 2012, 225(2): 296-303.
- [27] KONG P, CUI Z Y, HUANG X F, et al. Inflammation and atherosclerosis: signaling pathways and therapeutic intervention[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2022, 7(1): 131.
- [28] WANG T T, SUN C, HU L, et al. Sirt6 stabilizes atherosclerosis plaques by promoting macrophage autophagy and reducing contact with endothelial cells[J]. *Biochem Cell Biol*, 2020, 98(2): 120-129.

(此文编辑 许雪梅)