

本文引用: 叶利经, 周福洋, 白勒谢, 等. 动脉粥样硬化坏死性凋亡关键基因的筛选与验证[J]. 中国动脉硬化杂志, 2024, 32(3): 203-210. DOI: 10.20039/j.cnki.1007-3949.2024.03.003.

[文章编号] 1007-3949(2024)32-03-0203-08

· 实验研究 ·

动脉粥样硬化坏死性凋亡关键基因的筛选与验证

叶利经¹, 周福洋², 白勒谢³, 郭闯闯⁴, 吴帅凯¹, 潘玉芝⁵, 吴丹媚⁵, 赵国军¹

1. 广州医科大学附属清远医院(清远市人民医院), 广东省清远市 511518; 2. 华智生物技术有限公司, 湖南省长沙市 410000;
3. 大理大学药学院, 云南省大理市 671000; 4. 桂林医学院公共卫生学院, 5. 桂林医学院智能医学与
生物技术学院, 广西壮族自治区桂林市 541199

[摘要] **[目的]** 通过生物信息学方法筛选出动脉粥样硬化坏死性凋亡关键基因, 并借助体外实验加以验证, 从坏死性凋亡的角度来为预防和治疗动脉粥样硬化提供新策略。**[方法]** 从 GEO 数据库下载与动脉粥样硬化斑块相关的基因, 从 GeneCards 数据库下载与坏死性凋亡相关的基因, 将两者取交集从而获得动脉粥样硬化坏死性凋亡基因, 进一步对基因的作用机制和信号通路进行 GO 和 KEGG 富集分析, 并构建蛋白质-蛋白质相互作用 (PPI) 网络和筛选关键基因, 最后用终浓度为 100 mg/L 的氧化型低密度脂蛋白 (ox-LDL) 处理巨噬细胞, 通过 RT-PCR 和 Western blot 检测关键基因的表达情况。**[结果]** 共获得动脉粥样硬化坏死性凋亡基因 81 个, 通过 GO 和 KEGG 富集分析发现其主要在内多肽酶活性的正向调节、I κ B 激酶 (IKK)/核因子 κ B (NF- κ B) 信号传导和自噬信号通路等方面显著富集; 利用 Cytoscape 软件中 cytoHubba 插件的 5 种算法得到 HSPA8、STAT3、HMOX1、SQSTM1 和 FAS 5 个关键基因。与正常对照组相比, ox-LDL 处理的 THP-1 巨噬细胞中 HMOX1 基因呈高表达 ($P < 0.05$), 而 HSPA8、STAT3、SQSTM1 和 FAS 基因表达则无明显变化 ($P > 0.05$); ox-LDL 处理的 RAW264.7 巨噬细胞中 HMOX1、SQSTM1 基因呈高表达 ($P < 0.05$), 而 HSPA8、STAT3 和 FAS 基因表达无明显变化 ($P > 0.05$)。THP-1 巨噬细胞中 HMOX1 蛋白表达也相应升高。**[结论]** HMOX1 可能是动脉粥样硬化坏死性凋亡的关键基因, 并有望成为动脉粥样硬化防治的新靶点。

[关键词] 动脉粥样硬化; 坏死性凋亡; 关键基因; 生物信息学

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

Screening and validation of key genes involved in necroptosis in atherosclerosis

YE Lijing¹, ZHOU Fuyang², BAI Lexie³, GUO Chuangchuang⁴, WU Shuaikai¹, PAN Yuzhi⁵, WU Danmei⁵, ZHAO Guojun¹

1. Affiliated Qingyuan Hospital, Guangzhou Medical University, Qingyuan People's Hospital, Qingyuan, Guangdong 511518, China; 2. Huazhi Biotechnology Co. Ltd, Changsha, Hunan 410000, China; 3. College of Pharmacy, Dali University, Dali, Yunnan, China; 4. School of Public Health, 5. School of Intelligent Medicine and Biotechnology, Guilin Medical University, Guilin, Guangxi Zhuang Autonomous Region 541199, China

[ABSTRACT] **Aim** The key genes for necroptosis in atherosclerosis were screened by bioinformatics methods and verified with the help of *in vitro* experiments to provide new strategies for the prevention and treatment of atherosclerosis from the perspective of necroptosis. **Methods** Genes related to atherosclerotic plaques were downloaded from GEO database, and genes related to necroptosis were downloaded from GeneCards database and intersected to obtain atherosclerotic necroptosis genes, and the mechanism of action and signalling pathways of the genes were further analysed by GO and KEGG enrichment analysis, and the protein-protein interaction (PPI) network was constructed and screened for key genes. Finally, macrophages were treated with oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) at a final concentration of 100 mg/L, and the expression of key genes was detected by RT-PCR and Western blot. **Results** A total of 81 atherosclerotic necroptosis genes were obtained. GO and KEGG enrichment analyses revealed that they were mainly enriched in the positive regulation of endopeptidase activity, I κ B kinase (IKK)/nuclear factor- κ B (NF- κ B) signalling, and autophagy signalling

[收稿日期] 2023-10-27

[修回日期] 2023-12-27

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81870337)

[作者简介] 叶利经, 硕士研究生, 研究方向为心血管病的基础与临床研究, E-mail: 3132375989@qq.com. 通信作者赵国军, 博士, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为心血管病的基础与临床研究, E-mail: zhaoguojun@gzhu.edu.cn.

pathway. Five key genes including HSPA8, STAT3, HMOX1, SQSTM1 and FAS were obtained by using five computational methods of Cytoscape software cytoHubba plug-in. Compared with the normal control group, the HMOX1 gene was highly expressed in THP-1 macrophages treated with ox-LDL ($P < 0.05$), while the expression of the HSPA8, STAT3, SQSTM1 and FAS genes showed no significant changes ($P > 0.05$); the HMOX1 and SQSTM1 genes were highly expressed in RAW264.7 macrophages treated with ox-LDL ($P < 0.05$), while HSPA8, STAT3 and FAS genes showed no significant changes ($P > 0.05$). The expression of HMOX1 protein in THP-1 macrophages was also increased. **Conclusion** HMOX1 may be the key gene of atherosclerotic necroptosis, and it is expected to become a new target for the prevention and treatment of atherosclerosis.

[**KEY WORDS**] atherosclerosis; necroptosis; key genes; bioinformatics

动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)是心脑血管疾病的主要病理基础。As 斑块在中国老年人群中非常普遍,并且相当大比例(约40%)的个体狭窄达到50%或更高^[1]。As 斑块的形成受年龄、肥胖、生物钟紊乱和高血压等多种危险因素的协同影响^[2]。As 斑块是血管内皮细胞凋亡、脂质代谢紊乱、炎症细胞浸润、血管平滑肌细胞迁移和新生血管浸润等多种复杂条件下整合作用的结果,其中血管炎症是As 进展和斑块破裂的关键驱动因素^[3-4]。

坏死性凋亡是一种程序性坏死,由各种细胞因子和模式识别受体介导,受体相互作用蛋白激酶3(receptor interacting protein kinase 3, RIPK3)激活后,进而使混合谱系激酶结构域样蛋白(mixed-lineage kinase domain-like protein, MLKL)发生磷酸化及寡聚化,最终导致细胞坏死^[5-6]。研究发现,在颈动脉斑块患者中RIPK3和MLKL的表达增加,并且在晚期As 中检测到磷酸化MLKL^[7],这一发现有力地证明了坏死性凋亡在As 发生发展中可能存在重要的作用。目前,对As 坏死性凋亡的系统性研究鲜有报道,其发生机制也不清楚。由于高通量测序和多组学研究的快速发展,能够获得有关As 斑块的大量可靠信息^[8]。因此,利用有效手段探讨坏死性凋亡在As 发生发展中的作用机制,对As 患者的诊断和治疗具有重要的意义。

目前,生物信息学被广泛应用于各种疾病的研究,通过对患者的基因组、转录组、蛋白质组等数据进行分析和整合,揭示了疾病的发病机制和潜在靶点,对患者的诊断和治疗意义匪浅。因此,本研究采用生物信息学方法,通过对As 坏死性凋亡的关键基因进行预测,并在体外进行验证,以期深入研究As 的发病机制和寻找潜在靶点提供新策略。

1 材料和方法

1.1 实验细胞

人源性 THP-1 细胞和小鼠 RAW264.7 巨噬细

胞。THP-1 细胞用含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基在 37 °C、5% CO₂ 的细胞培养箱中培养,用终浓度为 100 μg/L 的佛波酯诱导 48 h 后分化为 THP-1 巨噬细胞;RAW264.7 巨噬细胞用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基在 37 °C、5% CO₂ 的细胞培养箱中培养,用终浓度为 100 mg/L 的氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL)处理细胞 12 h, 然后进行后续实验。

1.2 实验试剂

RPMI-1640 培养基(C11875500BT, Gibco); DMEM 培养基(C11995500CP, Gibco); 胎牛血清(10270-106, Gibco); 佛波酯(HY-18739, MedChemExpress); ox-LDL(YB-002, Yiyuan Biotechnologies); 总 RNA 抽提试剂(15596026CN, Invitrogen); 磷酸盐缓冲液(C10010500BT, Gibco); 反转录试剂盒(HY-K0511A, MedChemExpress); 荧光定量 PCR 试剂盒(HY-K0501A, MedChemExpress); 裂解液(9806, Cell Signaling); BCA 蛋白浓度测定试剂盒(GK10009, Glpbio); 上样缓冲液(GF1811, Genefist); GAPDH(AF7021, Affinity); HMOX1(A11102, ABclonal); PMLKL(AF7420, Affinity)。

1.3 实验设备

生物安全柜(1374, Thermo); 细胞培养箱(Thermo); -4 °C 冰箱(HYC-390, Haier); -20 °C 低温保存冰箱(DW-40L508J, Haier); 移液枪(Eppendorf); 10 mm 培养皿(TCD010100, JETBIOFIL); 75 T 瓶(TCF012250, JETBIOFIL); 六孔板(TCP011006, JETBIOFIL); 35 mm 培养皿(430165, CORNING); 一次性细胞计数板(JSP-GM010, BodBoge); 细胞计数仪(JSY-FL-045N, BodBoge); 台式低速离心机(GENIUS 5K-C); 高速台式冷冻离心机(Centrifuge 5810R); 旋涡混合器(MET VX200-T); 紫外分光光度仪(Thermo nanodrop one); 普通 PCR 扩增仪(Bio-Rad T100); 荧光 PCR 仪(Bio-Rad CFC-CONNEX); 电泳仪(Bio-Rad); 凝胶成像仪(ChemiDoc)。

1.4 As 斑块基因的筛选

在 GEO 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) 以“atherosclerotic plaque”作为关键词检索,筛选出与 As 斑块相关的基因,选中 GSE41571 数据集,该数据集包含 5 个破裂斑块样本和 6 个稳定斑块样本的基因表达数据。

1.5 As 坏死性凋亡基因的筛选

在 GeneCards 数据库 (<https://www.genecards.org/>) 以“necroptosis”作为关键词检索,筛选出与坏死性凋亡相关的基因。利用 R 语言软件的 VennDiagram 包将 As 斑块基因与坏死性凋亡基因作交集,从而获得 As 坏死性凋亡基因。

1.6 GO 和 KEGG 富集分析

利用 R 语言的 clusterProfiler 包对 As 坏死性凋亡基因进行 GO 和 KEGG 分析。

1.7 关键基因的筛选

在 STRING 数据库 (<https://string-db.org/cgi/input.pl>) 以生物种类“Homo Sapiens”,置信度 ≥ 0.4

为输出条件,构建 As 坏死性凋亡差异表达基因 (differentially expressed gene, DEG) 的蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络,最后用 cytoHubba 插件中的 5 种算法,即度中心性 (Degree)、接近中心性 (Closeness)、中介中心性 (Betweenness)、压力中心性 (Stress) 及瓶颈中心性 (BottleNeck),筛选出关键基因。

1.8 RT-PCR 检测关键基因的表达

利用总 RNA 抽提试剂提取 RNA,并通过反转录试剂盒将其反转录为 cDNA,最后以 GAPDH 作为内参,进行荧光定量 PCR。反应体系: $2 \times$ SYBR qPCR Master Mix $10 \mu\text{L}$, RNase Free ddH₂O $7.2 \mu\text{L}$, 正、反向引物各 $0.4 \mu\text{L}$, cDNA $2 \mu\text{L}$; 反应程序: $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 预变性 30 s , 循环 1 次,退火和延伸 $55 \text{ }^\circ\text{C}$ 30 s , 循环 40 次。引物由天一辉远基因科技有限公司合成,引物序列见表 1。关键基因的相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算。

表 1. 引物序列
Table 1. Primer sequences

基因		引物序列	扩增产物长度/bp	退火温度/ $^\circ\text{C}$
人 GAPDH	F	5'-CCTCAAGATCATCAGCAATGCC-3'	101	59.71
	R	5'-TGGTCATGAGTCCTCCACGAT-3'	101	61.15
人 HSPA8	F	5'-ACCTACTCTTGTGTGGGTGT-3'	87	58.88
	R	5'-GACATAGCTTGGAGTGGTTCG-3'	87	58.73
人 STAT3	F	5'-ACCAGCAGTATAGCCGCTTC-3'	124	59.89
	R	5'-GCCACAATCCGGGCAATCT-3'	124	60.75
人 HMOX1	F	5'-AAGACTGCGTTCCTGCTCAAC-3'	247	61.14
	R	5'-AAAGCCCTACAGCAACTGTGC-3'	247	60.88
人 SQSTM1	F	5'-GACTACGACTTGTGTAGCGTC-3'	139	58.50
	R	5'-AGTGTCCGTGTTTCACCTTCC-3'	139	60.47
人 FAS	F	5'-TCTGGTCTTACGTCTGTTCG-3'	197	58.25
	R	5'-CTGTGCAGTCCCTAGCTTTCC-3'	197	60.68
小鼠 GAPDH	F	5'-TGACCTCAACTACATGGTCTACA-3'	85	58.59
	R	5'-CTTCCCATTCTCGGCCTTG-3'	85	58.21
小鼠 HSPA8	F	5'-CCAAGTCCAAGTGAATACAAA-3'	111	58.80
	R	5'-TCTTTCGAGGTACGCTTCTG-3'	111	59.80
小鼠 STAT3	F	5'-AATATAGCCGATTCCTGCAAGAG-3'	95	58.43
	R	5'-TGGCTTCTCAAGATACCTGCTC-3'	95	59.83
小鼠 HMOX1	F	5'-CACAGCACTATGTAAAGCGTCT-3'	80	58.75
	R	5'-GTAGCGGGTATATGCGTGGG-3'	80	60.39
小鼠 SQSTM1	F	5'-GAGGCACCCGAAACATGG-3'	79	61.05
	R	5'-ACTTATAGCGAGTCCACCA-3'	79	58.54
小鼠 FAS	F	5'-GCGGGTTCGTGAAACTGATAA-3'	61	58.93
	R	5'-GCAAAATGGCCCTCTTGATA-3'	61	58.61

1.9 Western blot 检测 HMOX1 和 pMLKL 的蛋白表达

使用裂解液冰上裂解细胞 15 min 以收取总蛋白,通过 BCA 法测定蛋白浓度,并加入上样缓冲液,于 100 °C 金属水浴锅中反应 10 min 使蛋白变性。取 20 μg 蛋白样品上样,初始电压 80 V 电泳 30 min,然后增至 120 V 继续电泳 2 h。之后,以恒流 250 mA 电流转膜 105 min,再使用 5% 脱脂牛奶封闭非特异性结合位点。随后,将膜与目标蛋白(HMOX1 和 pMLKL)、内参(GAPDH)的一抗于 4 °C 摇床孵育过夜。次日,使用相应二抗室温孵育 1 h。孵育完成后,洗膜并显影。最后,通过 Image J 图像分析软件计算条带灰度值。

1.10 统计学分析

所有实验进行 3 次独立重复,两组数据之间的

差异比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。所有数据分析应用 GraphPad Prism 8.0 软件进行。

2 结果

2.1 As 斑块 DEG 的获得

利用 R 语言中的 limma 包对 As 斑块数据集 GSE41571 进行 DEG 分析统计,以 $P < 0.05$ 和 $|\log_2FC| \geq 1$ 为阈值,筛选出 As 斑块 DEG,获得差异表达上调基因 882 个,差异表达下调基因 913 个,并绘制相对对数表达箱线图(图 1A)、火山图(图 1B)、主成分分析图(图 1C)和热图(图 1D)进行可视化。

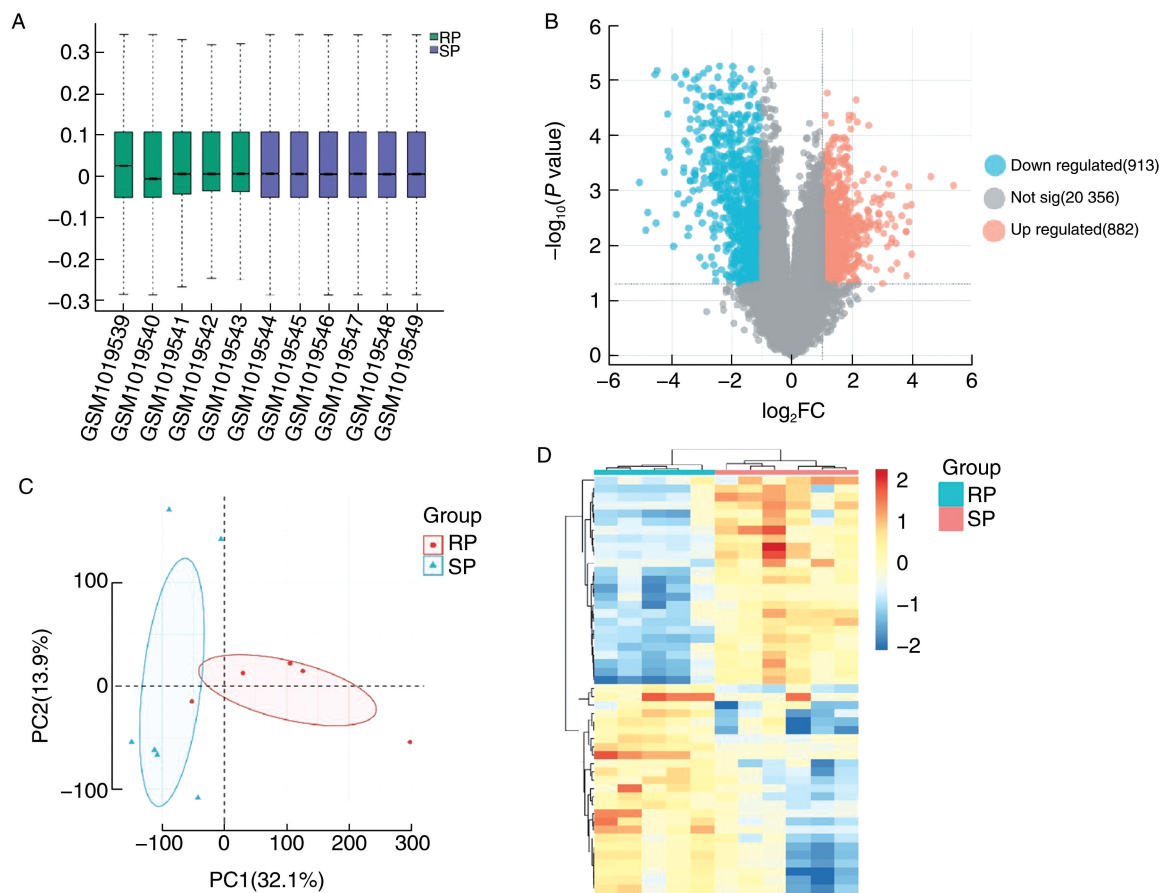


图 1. GSE41571 数据集 DEG 可视化

A 为相对对数表达箱线图;B 为火山图,蓝色为差异基因下调,红色为差异基因上调;C 为主成分分析图;D 为热图,蓝色为低表达基因,红色为高表达基因。RP: ruptured plaque, SP: stable plaque。

Figure 1. Visualisation of DEG in the GSE41571 dataset

2.2 As 坏死性凋亡基因的获得

利用 R 语言中的 VennDiagram 包将筛选出的 2 084 个 As 斑块基因与 1 670 个坏死性凋亡基因作

交集,可视化生成维恩图(图 2),共获得 81 个 As 坏死性凋亡基因。

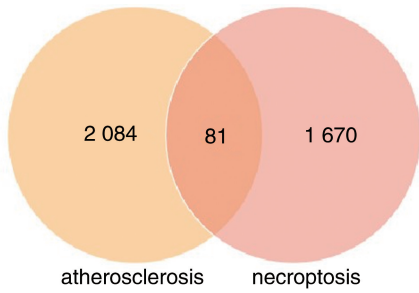


图 2. As 斑块基因与坏死性凋亡基因交集图
Figure 2. As plaque gene and necroptosis gene intersection map

2.3 GO 和 KEGG 富集分析

利用 R 语言中的 clusterProfiler 包对获得的 81 个 As 坏死性凋亡基因进行 GO 分析,生物过程图(图 3A)、细胞组成图(图 3B)和分子功能图(图 3C)显示 As 坏死性凋亡基因主要在内多肽酶活性的正向调节、IκB 激酶(IκB kinase, IKK)/核因子 κB(nuclear factor-κB, NF-κB) 信号传导等方面显著富集。KEGG 富集分析(图 3D)发现 As 坏死性凋亡基因主要在自噬信号通路等方面显著富集。

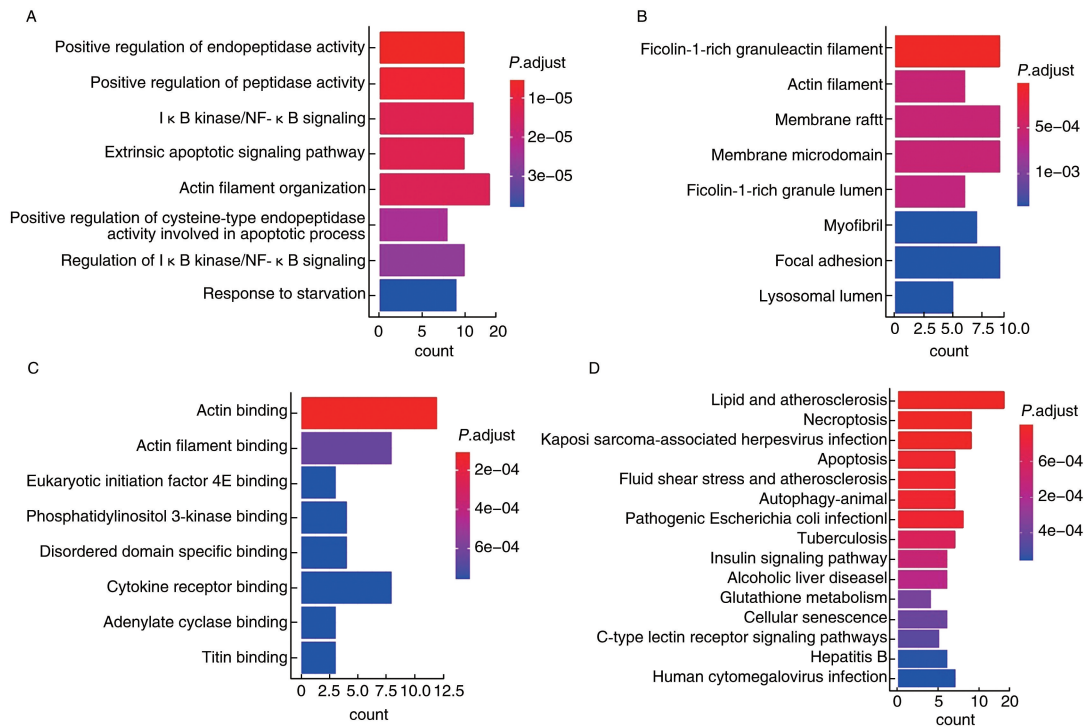


图 3. GO 和 KEGG 富集分析
A 为生物过程图, B 为细胞组成图, C 为分子功能图, D 为 KEGG 富集分析图。

Figure 3. GO and KEGG enrichment analysis

2.4 PPI 网络构建和关键基因的鉴定

利用 STRING 数据库构建 As 坏死性凋亡基因的 PPI 网络(图 4A),并运用 Cytoscape 软件中 cytoHubba 插件的 5 种算法(图 4B),选取各自排名前 10 的基因,进行交集后获得 As 坏死性凋亡关键基因。可视化结果显示, HSPA8、STAT3、HMOX1、SQSTM1 和 FAS 可能是 As 坏死性凋亡的关键基因(表 2)。

2.5 关键基因的相对表达量

分别使用 THP-1 巨噬细胞(图 5A)和 RAW264.7 巨噬细胞(图 5B)检测 5 个关键基因的相对表达量。与正常对照组相比, ox-LDL 处理的 THP-1 巨噬细胞

表 2. 关键基因的 5 种不同算法得分情况

Table 2. The scores of 5 different algorithms for key genes

关键基因	单位:分				
	度中心性	接近中心性	中介中心性	压力中心性	瓶颈中心性
HSPA8	13	33	725	2 398	17
STAT3	16	35	1 180	3 348	34
HMOX1	7	29	653	1 676	6
SQSTM1	11	31	538	1 606	14
FAS	9	31	416	1 960	7

中 HMOX1 基因呈高表达($P < 0.05$), 而 HSPA8、STAT3、SQSTM1 和 FAS 基因表达无明显变化($P >$

0.05); ox-LDL 处理的 RAW264.7 巨噬细胞中 HMOX1、SQSTM1 基因呈高表达($P < 0.05$), 而 HSPA8、STAT3 和 FAS 基因表达无明显变化($P > 0.05$)。

Western blot 实验证实 ox-LDL 处理的 THP-1 巨噬细胞中 HMOX1 蛋白和坏死性凋亡激活的关键执行蛋白 pMLKL 的表达升高($P < 0.05$; 图 6)。

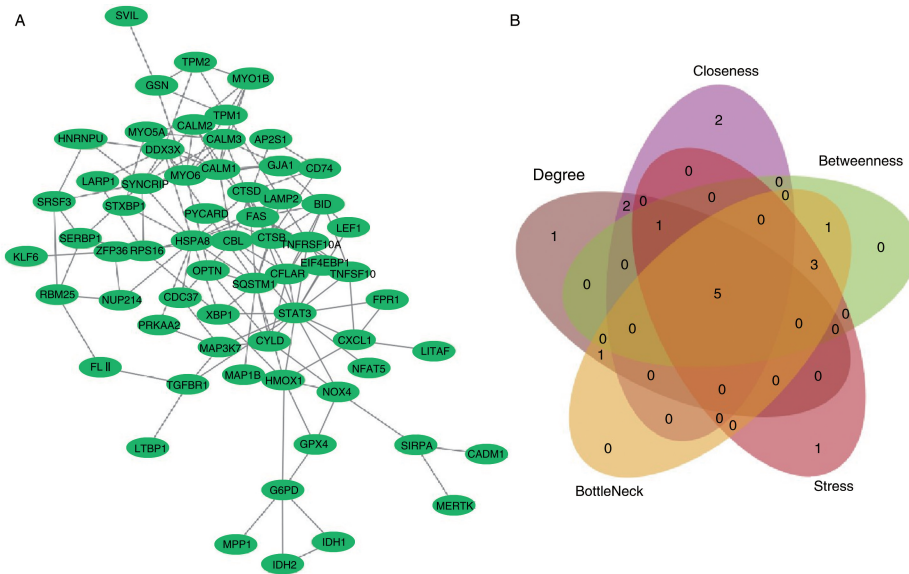


图 4. PPI 网络和关键基因筛选

A 为 PPI 网络图, B 为 5 种算法的交集图。

Figure 4. PPI network and key gene screening

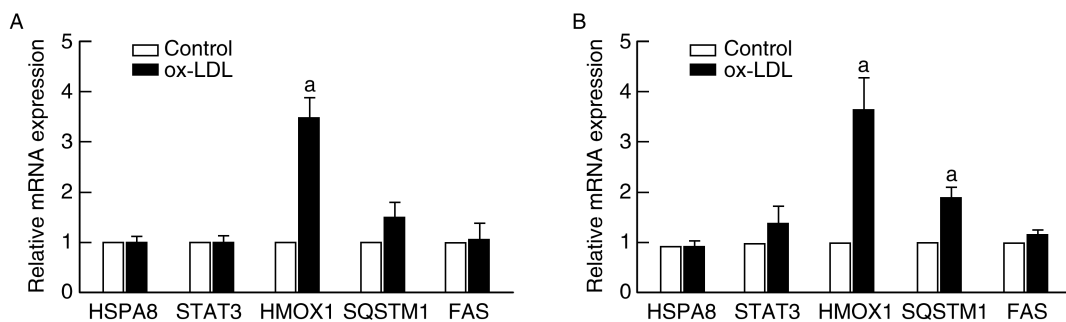


图 5. 5 种基因相对表达量的变化 ($n=3$)

A 为 THP-1 巨噬细胞, B 为 RAW264.7 巨噬细胞。a 为 $P < 0.05$, 与正常对照组比较。

Figure 5. Changes of relative expression levels of 5 genes ($n=3$)

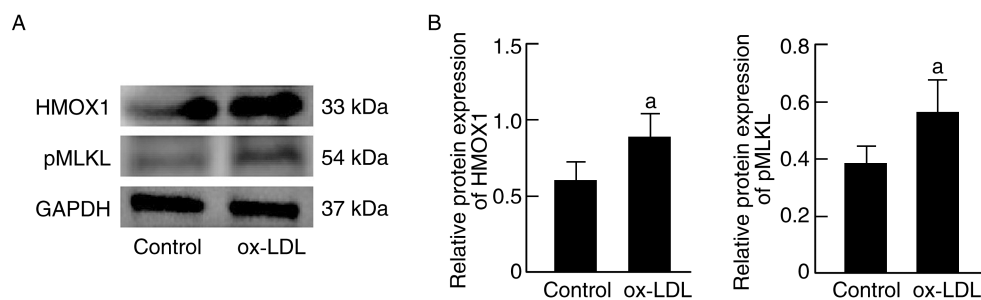


图 6. THP-1 巨噬细胞中 HMOX1 和 pMLKL 蛋白表达水平 ($n=3$)

A 为 Western blot 检测 HMOX1 和 pMLKL 的蛋白表达, B 为蛋白相对表达量柱状统计图。a 为 $P < 0.05$, 与正常对照组比较。

Figure 6. Expression levels of HMOX1 and pMLKL proteins in THP-1 macrophages ($n=3$)

3 讨论

As 是一种炎症因子介导的慢性病变,目前具体的发病机制仍有待研究^[9]。虽然已有研究表明坏死性凋亡在炎症反应中发挥着重要的作用^[10],但具体的作用机制尚不清楚。因此,通过生物信息学方法探究 As 坏死性凋亡的关键基因,并借助体外实验加以验证,将为从坏死性凋亡这一新的视角探索 As 的发病机制提供新思路。

考虑到坏死性凋亡可能是人类斑块不稳定性的基础^[7],本研究在选择 GEO 数据集的时候,特意选择了破裂斑块样本和稳定斑块样本的对比数据,也就是 GSE41571 数据集。GO 和 KEGG 富集分析发现 As 坏死性凋亡基因主要在内多肽酶活性的正向调节、IKK/NF- κ B 信号传导和自噬信号通路等方面显著富集。蛋白酶体在 As 等多种病变中发挥着关键作用^[11]。中性内肽酶与已知的其他蛋白酶不同,它是一种多催化蛋白酶复合物,含有多个不同的活性位点,可以在碱性、酸性或疏水性残基后切割肽^[12-13]。破坏多肽酶催化活性的突变可阻止泛素底物降解并最终导致细胞死亡^[14],提示坏死性凋亡可能通过调节酶活性,进而调控 As 的稳定性。坏死性凋亡广泛存在于 As 等多种炎症病变并发挥调控作用。NF- κ B 是炎症反应的关键介质,可调节各种促炎基因的表达^[15]。研究发现坏死性凋亡可通过激活 NF- κ B 通路来介导炎症因子的合成和释放,而 IKK/NF- κ B 的激活可促进 As 的发展^[16-17],由此推测坏死性凋亡可能通过激活 NF- κ B 通路,促进炎症性细胞因子的释放,导致 As 斑块的破裂。此外也有研究表明,坏死性凋亡可通过受体相互作用,促进脂质活性氧的积累,引起炎症反应,进而通过自噬信号通路调节脂质代谢和炎症反应,在 As 斑块的稳定性中发挥重要作用^[18-19]。

进一步利用 STRING 数据库构建 PPI 网络, cytoHubba 插件筛选关键基因,获得 HSPA8、STAT3、HMOX1、SQSTM1 和 FAS 5 个 As 坏死性凋亡关键基因。As 主要是巨噬细胞驱动的炎症病变,巨噬细胞的募集和增殖在斑块进展中发挥重要作用^[7],故而采用人源性 THP-1 细胞和小鼠 RAW264.7 巨噬细胞进行实验验证。与正常对照组相比, HMOX1 基因在 ox-LDL 处理的 THP-1 巨噬细胞中呈高表达, HSPA8、STAT3、SQSTM1 和 FAS 基因表达无显著差异; HMOX1、SQSTM1 基因在 ox-LDL 处理的 RAW264.7 巨噬细胞中呈高表达,而 HSPA8、STAT3 和 FAS 基因表达无显著差异。HMOX1 是人体中重要的酶,主要调节游离血红

素浓度,且与 As 的发生发展密切相关^[20]。在人类巨噬细胞和小鼠巨噬细胞中发现 HMOX1 的过表达增加了血红素的分解,分解的血红素代谢产物可通过 AMPK 和激活转录因子 1 系统地诱导巨噬细胞中的 As 保护基因,从而抑制 As 形成^[21]。SQSTM1 是一个多功能的支架蛋白,参与各种信号通路的调节,在 As 进展中具有重要作用^[22]。在对载脂蛋白 E 基因敲除小鼠的研究中发现,增加自噬相关 14 基因的表达可逆转小鼠斑块中巨噬细胞的自噬功能障碍,减弱 SQSTM1 的积累,抑制炎症,并上调调节性 T 细胞群,从而缓解 As 病变^[23]。查阅相关文献,虽未发现 HMOX1、SQSTM1 有从坏死性凋亡这一视角调控 As 的研究,但却与 As 及坏死性凋亡存在密切关联^[24-25]。SQSTM1 在人源性和鼠源性细胞中的表达差异,可能与种属不同有关,但具体机制还需要进一步探究。

综上所述,通过生物信息学方法及细胞实验的综合分析发现, HMOX1 可能是 As 坏死性凋亡的关键基因,这为今后 As 防治提供了一种新策略。本研究也有局限之处,虽然进行了细胞实验,但只在巨噬细胞上进行验证,难免出现分析偏差,需进一步在动物模型上进行验证。

[参考文献]

- [1] PAN Y S, JING J, CAI X L, et al. Prevalence and vascular distribution of multiterritorial atherosclerosis among community-dwelling adults in southeast China [J]. *JAMA Netw Open*, 2022, 5(6): e2218307.
- [2] 张瑜,涂均楚,李玉洁,等. 动脉粥样硬化危险因素衰老、肥胖、生物钟紊乱与核糖体新生的研究进展[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2023, 31(11): 921-928.
ZHANG Y, TU J C, LI Y J, et al. Research progress of atherosclerosis risk factors like aging, obesity, circadian clock disorders and ribosome biogenesis [J]. *Chin J Arterioscler*, 2023, 31(11): 921-928.
- [3] LI A A, YANG Y Y, WANG Z B, et al. Targeting non-coding RNAs in unstable atherosclerotic plaques: mechanism, regulation, possibilities, and limitations [J]. *Int J Biol Sci*, 2021, 17(13): 3413-3427.
- [4] TAN N, DEY D, MARWICK T H, et al. Pericoronary adipose tissue as a marker of cardiovascular risk: JACC review topic of the week [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2023, 81(9): 913-923.
- [5] SEO J, NAM Y W, KIM S, et al. Necroptosis molecular mechanisms: recent findings regarding novel necroptosis regulators [J]. *Exp Mol Med*, 2021, 53(6): 1007-1017.
- [6] KARUNAKARAN D, NGUYEN M A, GEOFFRION M, et al.

- RIPK1 expression associates with inflammation in early atherosclerosis in humans and can be therapeutically silenced to reduce NF- κ B activation and atherogenesis in mice[J]. *Circulation*, 2021, 143(2): 163-177.
- [7] KARUNAKARAN D, GEOFFRION M, WEI L H, et al. Targeting macrophage necroptosis for therapeutic and diagnostic interventions in atherosclerosis[J]. *Sci Adv*, 2016, 2(7): e1600224.
- [8] HERRINGTON D M, MAO C H, PARKER S J, et al. Proteomic architecture of human coronary and aortic atherosclerosis[J]. *Circulation*, 2018, 137(25): 2741-2756.
- [9] 杨启娟, 苏晓灵. 炎症因子与急性心肌梗死的研究进展[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2023, 31(7): 639-644.
- YANG Q J, SU X L. Research progress on inflammatory factor and acute myocardial infarction[J]. *Chin J Arterioscler*, 2023, 31(7): 639-644.
- [10] TU H L, XIONG W H, ZHANG J, et al. Tyrosine phosphorylation regulates RIPK1 activity to limit cell death and inflammation[J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 6603.
- [11] THIBAudeau T A, SMITH D M. A practical review of proteasome pharmacology[J]. *Pharmacol Rev*, 2019, 71(2): 170-197.
- [12] WILK S, ORLOWSKI M. Cation-sensitive neutral endopeptidase: isolation and specificity of the bovine pituitary enzyme[J]. *J Neurochem*, 1980, 35(5): 1172-1182.
- [13] WILK S, ORLOWSKI M. Evidence that pituitary cation-sensitive neutral endopeptidase is a multicatalytic protease complex[J]. *J Neurochem*, 1983, 40(3): 842-849.
- [14] VERMA R, ARAVIND L, OANIA R, et al. Role of Rpn11 metalloprotease in deubiquitination and degradation by the 26 S proteasome[J]. *Science*, 2002, 298(5593): 611-615.
- [15] YU H, LIN L B, ZHANG Z Q, et al. Targeting NF- κ B pathway for the therapy of diseases: mechanism and clinical study[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2020, 5(1): 209.
- [16] ENZAN N, MATSUSHIMA S, IKEDA S, et al. ZBP1 protects against mtDNA-induced myocardial inflammation in failing hearts[J]. *Circ Res*, 2023, 132(9): 1110-1126.
- [17] HUANG Z Q, SHEN S R, HAN X, et al. Macrophage DCLK1 promotes atherosclerosis via binding to IKK β and inducing inflammatory responses[J]. *EMBO Mol Med*, 2023, 15(5): e17198.
- [18] TONG Y, WU Y G, MA J, et al. Comparative mechanistic study of RPE cell death induced by different oxidative stresses[J]. *Redox Biol*, 2023, 65: 102840.
- [19] QIAO L, MA J, ZHANG Z H, et al. Deficient chaperone-mediated autophagy promotes inflammation and atherosclerosis[J]. *Circ Res*, 2021, 129(12): 1141-1157.
- [20] WALTER E R H, GE Y, MASON J C, et al. A coumarin-porphyrin FRET break-apart probe for heme oxygenase-1[J]. *J Am Chem Soc*, 2021, 143(17): 6460-6469.
- [21] SENEVIRATNE A, CAVE L, HYDE G, et al. Metformin directly suppresses atherosclerosis in normoglycaemic mice via haematopoietic adenosine monophosphate-activated protein kinase [J]. *Cardiovasc Res*, 2021, 117(5): 1295-1308.
- [22] JEONG S J, ZHANG X Y, RODRIGUEZ-VELEZ A, et al. p62/SQSTM1 and selective autophagy in cardiometabolic diseases[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2019, 31(6): 458-471.
- [23] ZHANG H, GE S, NI B Q, et al. Augmenting ATG14 alleviates atherosclerosis and inhibits inflammation via promotion of autophagosome-lysosome fusion in macrophages[J]. *Autophagy*, 2021, 17(12): 4218-4230.
- [24] AYER A, ZARJOU A, AGARWAL A, et al. Heme oxygenases in cardiovascular health and disease[J]. *Physiol Rev*, 2016, 96(4): 1449-1508.
- [25] ROBICHAUD S, FAIRMAN G, VIJITHAKUMAR V, et al. Identification of novel lipid droplet factors that regulate lipophagy and cholesterol efflux in macrophage foam cells[J]. *Autophagy*, 2021, 17(11): 3671-3689.

(此文编辑 文玉珊)