

本文引用: 孟思雨, 倪天祚, 耿金, 等. 非酒精性脂肪性肝病及动脉粥样硬化的基因串扰综合分析[J]. 中国动脉硬化杂志, 2024, 32(7): 573-582. DOI: 10.20039/j.cnki.1007-3949.2024.07.004.

[文章编号] 1007-3949(2024)32-07-0573-10

· 实验研究 ·

## 非酒精性脂肪性肝病及动脉粥样硬化的基因串扰综合分析

孟思雨, 倪天祚, 耿金, 葛培兵, 王丙剑

南京医科大学附属淮安第一医院心内科, 江苏省淮安市 223300

**[摘要]** **[目的]** 使用生物信息学的方法寻找非酒精性脂肪性肝病 (NAFLD) 和动脉粥样硬化 (As) 的共同转录特征, 通过两种疾病的基因串扰分析, 挖掘 NAFLD 相关 As 新的潜在机制和关键靶点, 并进一步在动物组织和人血清样本中验证关键靶点的表达水平。**[方法]** GEO 数据库下载 NAFLD (数据集 GSE89632) 和 As (数据集 GSE43292) 的基因表达谱, 进行差异基因分析和加权基因共表达网络分析, 筛选两种疾病的共享基因。通过 String 数据库、蛋白质互作分析和 R 软件等工具对共享基因进行富集分析。利用 Cytoscape 软件计算、外部数据集 (GSE100927) 验证及机器学习方法 (LASSO 回归) 筛选出核心基因。最后, 通过构建高脂饮食非酒精脂肪肝和 As 小鼠模型以及收集 NAFLD 合并冠心病患者的外周血清, 验证重要的核心基因。**[结果]** 识别出两种疾病的 75 个共享基因, 发现共享基因的主要富集通路, 包括细胞因子-细胞因子受体相互作用、IL-17 信号通路、脂质和 As、NF- $\kappa$ B 信号通路等。综合多种生物信息学方法, 最终筛选出 2 个重要的核心基因 (MMP-9 和 CCL3)。动物实验验证结果表明, 高脂饮食组小鼠肝脏和主动脉窦组织的 MMP-9 和 CCL3 含量都明显升高, 高脂饮食组小鼠肝脏组织的 MMP-9 和 CCL3 含量分别为对照组的 2.43 倍 ( $P < 0.001$ ) 和 1.35 倍 ( $P < 0.01$ ), 高脂饮食组小鼠主动脉窦组织的 MMP-9 和 CCL3 含量分别为对照组的 2.10 倍 ( $P < 0.001$ ) 和 1.58 倍 ( $P < 0.01$ )。人血清样本验证结果表明, NAFLD 合并冠心病患者血清中的 MMP-9 和 CCL3 含量分别为单纯冠心病患者的 1.21 倍 ( $P < 0.01$ ) 和 1.29 倍 ( $P < 0.01$ )。**[结论]** 本研究基于生物信息学分析发现 MMP-9 和 CCL3 可能是 NAFLD 相关 As 中发挥关键作用的核心基因, 为研究 NAFLD 相关 As 提供一定的靶点参考。

**[关键词]** 非酒精性脂肪性肝病; 动脉粥样硬化; 生物信息学分析; 机器学习; 核心基因

**[中图分类号]** R5

**[文献标识码]** A

### Integrated analysis of gene crosstalk in non-alcoholic fatty liver disease and atherosclerosis

MENG Siyu, NI Tianyi, GENG Jin, GE Peibing, WANG Bingjian

Department of Cardiology, the Affiliated Huai'an No. 1 People's Hospital of Nanjing Medical University, Huai'an, Jiangsu 223300, China

**[ABSTRACT]** **Aim** To investigate the shared transcriptional characteristics of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and atherosclerosis (As) using bioinformatics techniques. The goal is to identify potential mechanisms and key targets of As that are linked to NAFLD through gene crosstalk analysis of both diseases. Additionally, the study will validate the expression levels of these key targets in animal tissues and human serum samples. **Methods** The gene expression profiles of NAFLD (dataset GSE89632) and As (dataset GSE43292) were obtained from GEO database. Differential gene analysis and weighted gene co-expression network analysis were conducted to identify common genes between the two diseases. These shared genes were further analyzed using the String database for protein interaction analysis and R software. Core genes were identified through calculations in Cytoscape software, validation with external datasets (GSE100927), and machine learning techniques (LASSO regression). Finally, key core genes were determined by creating nonalcoholic fatty liver and As mouse models on a high-fat diet and collecting peripheral serum samples from patients with NAFLD and coronary heart disease (CHD). **Results** Seventy-five shared genes were identified between the two

[收稿日期] 2023-11-01

[修回日期] 2024-03-18

[基金项目] 淮安市心脑血管病研究重点实验室基金 (HAP202202); 江苏省研究生实践创新计划项目 (SJCX22\_0666)

[作者简介] 孟思雨, 硕士研究生, 研究方向为动脉粥样硬化机制研究, E-mail: 3225732008@qq.com. 通信作者王丙剑, 博士, 副主任医师, 硕士研究生导师, 研究方向为动脉粥样硬化的治疗和机制研究, E-mail: hayywbj@njmu.edu.cn.

diseases, with major enrichment pathways including cytokine-cytokine receptor interaction, IL-17 signaling pathway, lipid and atherosclerosis, and NF- $\kappa$ B signaling pathway. Through integration of multiple bioinformatics methods, two core genes (MMP-9 and CCL3) were identified. Subsequent animal experiments demonstrated a significant increase in MMP-9 and CCL3 levels in the liver and aortic sinus of mice fed with high-fat diet, MMP-9 and CCL3 levels in the liver tissue of high-fat diet-fed mice were 2.43 times ( $P < 0.001$ ) and 1.35 times ( $P < 0.01$ ) higher than the control group, in the aortic sinus tissue, MMP-9 and CCL3 levels were 2.10 times ( $P < 0.001$ ) and 1.58 times ( $P < 0.01$ ) higher. Human serum sample verification further supported these findings, showing MMP-9 and CCL3 levels in patients with both NAFLD and CHD to be 1.21 times ( $P < 0.01$ ) and 1.29 times ( $P < 0.01$ ) higher than in patients with CHD alone. **Conclusion** This study identified MMP-9 and CCL3 may play key roles in NAFLD-related As, providing potential targets for the study of NAFLD-related As.

[**KEY WORDS**] non-alcoholic fatty liver disease; atherosclerosis; bioinformatics analysis; machine learning; core gene

非酒精性脂肪性肝病(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)是常见的肝脏疾病,近来被更名为代谢相关脂肪性肝病(metabolic dysfunction-associated fatty liver disease, MAFLD)<sup>[1]</sup>。在全球范围内,NAFLD的患病率约占世界人口的25%,预计2030年将占到33.5%<sup>[2-3]</sup>。NAFLD是一种在排除过量饮酒和其他明确的肝脏损伤因素之外,以肝细胞脂肪过度沉积为特征的临床病理综合征。目前NAFLD病因尚未明确,通常认为与高血脂、肥胖、糖尿病、高血压等代谢综合征相关<sup>[4]</sup>。研究表明,NAFLD与动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)密切相关,近一半的NAFLD患者都合并有冠心病(coronary heart disease, CHD),超过三分之一的NAFLD患者合并有颈动脉As<sup>[5]</sup>。As心血管疾病是NAFLD患者死亡的主要原因<sup>[6]</sup>。研究表明这两种疾病都涉及脂质代谢紊乱、炎症反应和氧化应激等共同病理生理过程<sup>[3,7-8]</sup>。目前还没有使用生物信息学的方法来探讨NAFLD相关As潜在机制的相关报道。本研究利用多种生物信息学分析和机器学习方法来识别NAFLD和As的串扰基因和核心基因,并通过动物实验和临床血清样本分别验证核心基因的表达,旨在进一步探索NAFLD相关As的潜在机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 数据来源

以“Atherosclerosis”或“As”或“Non-alcoholic fatty liver disease”或“NAFLD”为关键词,限定人种为“智人”,从GEO数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)中下载编号为GSE43292、GSE100927和GSE89632的数据集。其中,GSE43292和GSE100927数据集分别作为As的测试和验证数据集,GSE43292数据集包括32例As患者的颈动脉As斑块组织样本和配对的比较完整的颈动脉组织样本;GSE100927数据

集包括69例As和35例对照患者外周动脉组织样本。GSE89632数据集包括39例NAFLD患者和24例对照患者肝脏组织的基因表达谱。

### 1.2 筛选差异表达基因

使用limma R软件包,分别对两个数据集进行归一化和分析。采用调整后 $P$ 值 $< 0.05$ 和 $\log_2$ FC的绝对值 $\geq 0.58$ 作为差异基因的筛选标准。根据基因的 $\log_2$ FC值是大于0.58还是小于-0.58,将基因分为上调还是下调。分别使用ggplot2和pheatmap R软件包绘制火山图和热图,以便可视化差异表达基因(differentially expressed gene, DEG)。

### 1.3 加权基因共表达网络分析

分别对两个数据集进行加权基因共表达网络分析(weighted gene co-expression network analysis, WGCNA),首先使用“pickSoftThreshold”函数来选择合适的软阈值,以构建基于无标度拓扑准则的邻接矩阵;然后将邻接矩阵转换为拓扑重叠矩阵(topological overlap matrix, TOM);接下来使用平均连锁层次聚类方法对具有相似表达谱的基因进行聚类,其中最小模块尺寸设置为30,切割高度设置为0.25。灰色模块表示无法合并的基因;最后进行Pearson相关分析,计算各模块和性状之间的相关性,筛选相关性系数 $cor$ 大于0.5的模块中的所有基因。

### 1.4 NAFLD和As共享基因的功能分析

使用在线工具Jvenn(<https://jvenn.toulouse.inrae.fr/app/example.html>)将GSE43292和GSE89632数据集得到的差异基因和关键模块基因取交集,获取NAFLD和As的共享基因。应用R中的“clusterProfiler”包完成GO和KEGG富集分析,阐明共享基因参与NAFLD相关As发生和发展的潜在通路和可能机制。GO和KEGG富集分析的筛选阈值均为 $P < 0.05$ 。

### 1.5 筛选核心基因

首先,基于String数据库(<http://string-db.org>)构建共享基因的蛋白质-蛋白质相互作用(protein-

protein interaction, PPI) 网络。利用 Cytoscape3. 10. 1 软件 cytoHubba 插件中的归一化互相关 (normalized cross correlation, NCC) 算法筛选出总网络中相关性最强的前 10 个基因; 利用分子复合物侦测 (molecular complex detection, MCODE) 算法识别出总网络中相关性最强的子网络, 取两种算法的交叉基因作为初步的关键基因。为了提高筛选核心基因的准确性, 在 GEO 数据库中获取 As 数据集 GSE100927 (69 例 As 动脉样本和 35 例对照样本) 的表达矩阵, 作为验证数据集, 验证初步关键基因的差异情况。最后, 利用最小绝对收缩和选择 LASSO 回归算法进一步筛选具有更高诊断价值的中枢基因。glmnet 包提供了一系列函数来拟合 LASSO 回归模型, 并根据正则化参数来控制特征的稀疏性程度。

### 1.6 免疫组织化学染色鉴定核心基因

10 只 6 周龄 SPF 级 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠由江苏苏州西山生物技术有限公司提供, 动物生产许可证号为 SCXK(苏) 2018-0008。高脂饲料 (22. 3% 酪蛋白、0. 3% L-胱氨酸、23. 6% 玉米淀粉、7. 9% 麦芽糖糊精、12. 6% 蔗糖、5. 6% 纤维素、2. 8% 大豆油、17. 3% 可可油、1. 25% 胆固醇、6. 35% 其他矿物质和维生素成分) 由江苏协同医药生物有限公司提供, 货号为 D12108C。普通饲料喂养作为对照组 ( $n=5$ ), 高脂饲料喂养作为 NAFLD 和 As 模型组 ( $n=5$ ), 实验周期为 12 周。成模后, CO<sub>2</sub> 安乐死处理小鼠, 立即剖开小鼠的胸腔和腹腔, 预冷的生理盐水灌流清除残留在主动脉和心脏中的血液, 取小鼠肝脏组织、主动脉窦组织, 4% 甲醛溶液固定, 常规石蜡包埋, 从肝脏组织、主动脉窦处分别进行连续石蜡切片 (5  $\mu\text{m}$ ), 每间隔 5 张收集一张, 每只小鼠肝脏组织和主动脉窦组织各取 5 张。切片脱蜡行 HE 染色检测小鼠肝脏和主动脉窦组织病理学变化, 免疫组织化学染色检测基质金属蛋白酶 9 (matrix metalloproteinase-9, MMP-9) 和趋化因子细胞因子配体 3 (chemokine cytokine ligand 3, CCL3) 的蛋白表达情况。

### 1.7 NAFLD 合并冠心病患者外周血清鉴定核心基因

选取 2023 年 9 月—2024 年 2 月因胸痛或胸闷症状首次在南京医科大学附属淮安第一医院心内科行冠状动脉造影检查的 153 名住院患者, 其中男性 85 例, 女性 68 例。所有入院患者均排除既往经皮冠状动脉介入治疗术后、合并全身严重感染性疾病、合并严重贫血、肿瘤性疾病、自身免疫性疾病或结缔组织疾病、合并严重肝肾功能障碍者。收集患者包括年龄、性别、饮酒史等基线信息。冠状动脉

造影术前, 完善所有患者的腹部超声检查。采集所有患者的空腹静脉血, 行常规生物化学指标检测。留取部分静脉血, 室温静置 1 h, 4  $^{\circ}\text{C}$ 、3 000 r/min 离心 15 min, 收集上清, -80  $^{\circ}\text{C}$  保存。采用 ELISA 测定血清 MMP-9、CCL3 水平 (武汉三鹰生物技术有限公司, 货号分别为 KE00164、KE00092)。NAFLD 的诊断标准符合《非酒精性脂肪性肝病防治指南 (2018 年更新版)》的诊断标准<sup>[9]</sup>。依据冠状动脉造影术后结果建立 CHD 诊断, 满足至少有一支主要冠状动脉管腔直径狭窄  $\geq 50\%$  诊断为 CHD。将所有患者根据腹部超声和冠状动脉造影结果分为四组: 正常对照组 ( $n=53$ )、NAFLD 组 ( $n=42$ )、CHD 组 ( $n=28$ )、NAFLD+CHD 组 ( $n=30$ )。患者均书面知情同意, 本研究通过南京医科大学附属淮安第一医院伦理委员会批准 (批准号: KY-2023-147-01)。

### 1.8 统计学分析

利用 GraphPad Prism 9 软件对定量数据进行正态性检验, 符合正态分布特征的计量资料采用  $t$  检验或方差分析进行组间差异比较, 否则采用非参数检验进行组间差异比较, 多组间两两比较采用 LSD- $t$  检验。  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 筛选差异基因

使用 limma R 包, 基于 As 数据集 GSE43292, 根据上述差异基因筛选标准, 筛选出 894 个 DEG。其中, As 组中有 520 个上调基因和 374 个下调基因。基于 NAFLD 数据集 GSE89632, 筛选出 1 862 个 DEG。其中, NAFLD 组中有 835 个上调基因和 1 027 个下调基因。火山图 (图 1A 和图 1B) 和热图 (图 1C 和图 1D) 显示识别出的所有 DEG。

### 2.2 筛选模块基因

使用 WGCNA R 软件包分别探索两个数据集的临床特征和基因之间的相关性。在进行数据分析之前, 聚类分析检测到 GSE43292 数据集中有一个离群样本 GSM1060144, GSE89632 数据集中有 2 个离群样本 GSM2385767 和 GSM2385782, 离群样本不纳入接下来的 WGCNA 分析。软阈值  $\beta$  分别设置为 16 和 14。GSE43292 数据集共获得 11 个模块基因。其中, 苍绿色模块 ( $\text{cor}=0.52, P=1\text{e}-05$ )、深品红色模块 ( $\text{cor}=0.53, P=8\text{e}-06$ )、深桔色模块 ( $\text{cor}=0.58, P=8\text{e}-07$ )、深橄榄绿色模块 ( $\text{cor}=0.57, P=1\text{e}-06$ ) 与 As 正相关性更强; 蓝色模块 ( $\text{cor}=-0.53, P=9\text{e}-06$ ) 与 As 负相关性更强。GSE89632 数据集

最终共获得 10 个基因模块。其中,绿色模块与 NAFLD 的正相关性最强 ( $cor=0.78, P=1e-13$ ); 棕色模块与 NAFLD 的负相关性最强 ( $cor=0.88, P=2e-20$ ); 图 2)。

最终共获得 10 个基因模块。其中,绿色模块与 NAFLD 的正相关性最强 ( $cor=0.78, P=1e-13$ ); 棕色模块与 NAFLD 的负相关性最强 ( $cor=0.88, P=2e-20$ ); 图 2)。

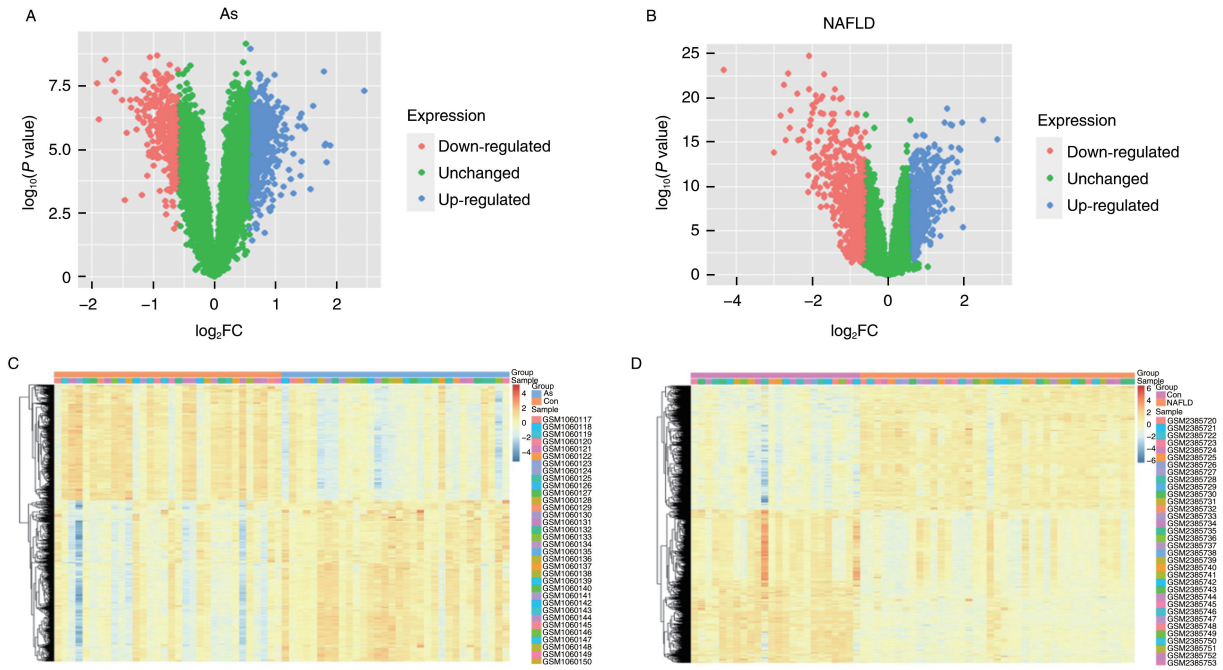


图 1. 数据集 GSE43292 和 GSE89632 的 DEG 的火山图和热图

A, B 分别是数据集 GSE43292 和 GSE89632 差异基因的火山图, C, D 分别是数据集 GSE43292 和 GSE89632 差异基因的热图。

Figure 1. Volcano plots and heat maps of DEG in GSE43292 and GSE89632 datasets

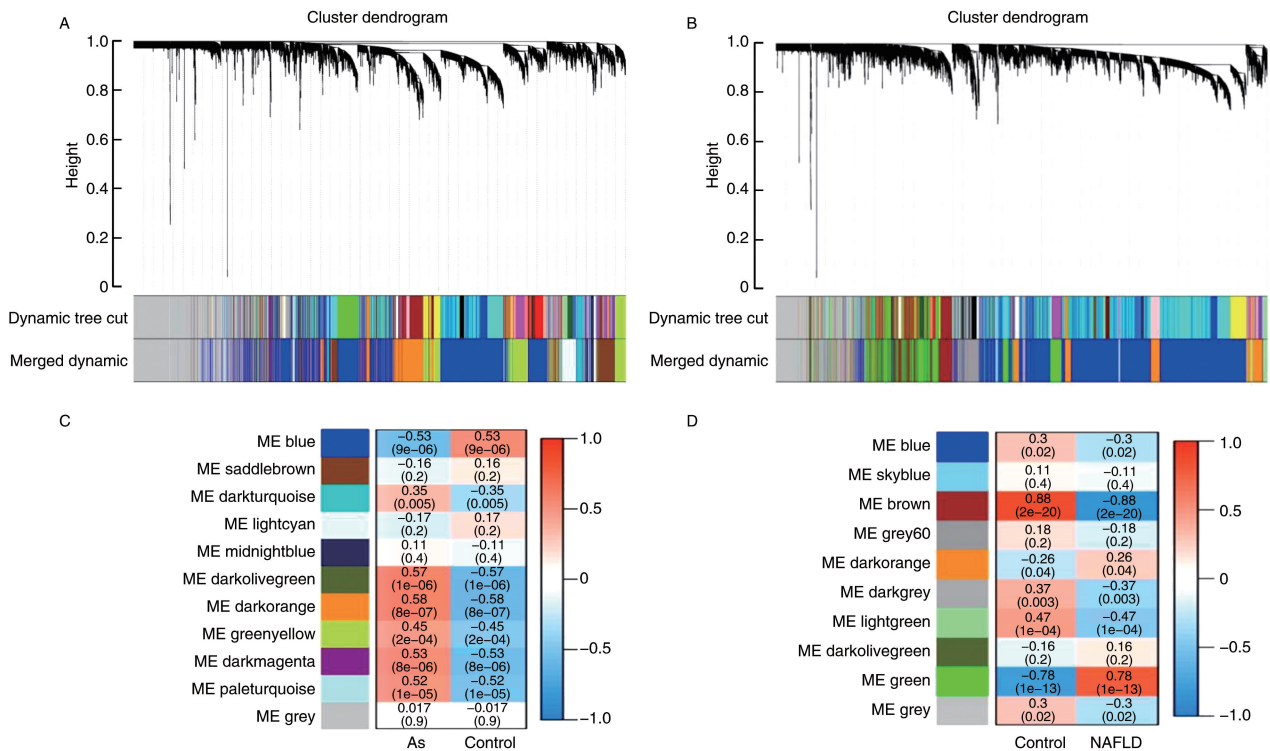


图 2. 数据集 GSE43292 和 GSE89632 的 WGCNA 分析结果

A, B 分别是数据集 GSE43292 和 GSE89632 聚类树下原始模块和合并后模块, C, D 分别是数据集 GSE43292 和 GSE89632 模块基因特征和临床特征的相关性热图。

Figure 2. WGCNA analysis results of GSE43292 and GSE89632 datasets

### 2.3 NAFLD 与 As 的共享基因的功能分析

将 NAFLD 和 As 数据集中得到的差异基因和关键模块基因取交集,共获得参与 NAFLD 和 As 调控过程的 75 个共享基因。随后,对这些基因进行 GO 和 KEGG 功能富集分析,GO 富集分析结果显示 NAFLD 和 As 的共享基因机制涉及白细胞迁移、白细胞趋化性、骨髓白细胞迁移、中性粒细胞迁移、对细菌来源分子的反应、细胞因子活性、趋化因子受

体结合、细胞因子受体结合、受体配体活性和糖基化终末产物受体(receptor for advanced glycation end product, RAGE)结合反应等功能;KEGG 富集分析结果显示这些基因大多富集在细胞因子-细胞因子受体相互作用、IL-17 信号通路、脂质和 As、NF- $\kappa$ B 信号通路、NOD 样受体信号通路、糖尿病并发症中的 AGE-RAGE 受体信号通路等(图 3)。

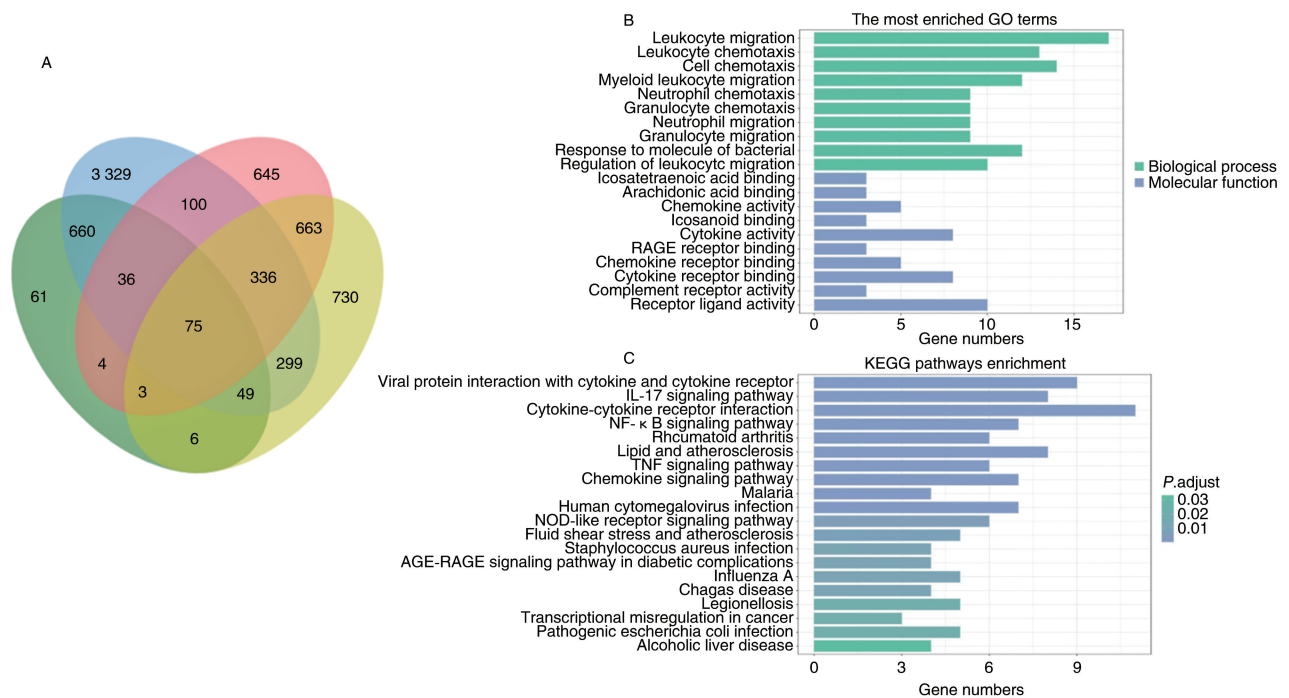


图 3. NAFLD 和 As 共享基因的维恩图和共享基因的功能富集

A 为 NAFLD 和 As 共享基因的维恩图,绿色和蓝色分别是数据集 GSE43292 的差异基因和功能模块基因,粉色和黄色分别是数据集 GSE89632 的差异基因和功能模块基因;B 为共享基因的 GO 富集分析图,绿色代表共享基因的生物过程富集,蓝色代表共享基因的分子功能富集;C 为共享基因的 KEGG 富集分析图,调整后的  $P < 0.05$  被认为是显著的,条形图越接近蓝色显著性越强。

Figure 3. Venn diagram and functional enrichment analysis of the shared genes of NAFLD and As

### 2.4 识别枢纽基因

String 数据库用于构建 75 个共享基因的 PPI 网络,将文件导入 Cytoscape 软件,根据方法学部分所述原则,使用 MCODE 和 cytoHubba 插件处理后,共得到 10 个交叉基因,包括 MMP-9、IL1RN、IL1B、ICAM-1、CXCL8、CXCL2、CCR1、CCL8、CCL3、CCL2。As 数据集 GSE100927 的表达矩阵作为验证数据集。组间差异比较显示,只有 CXCL8、IL1RN、IL1B、MMP-9、CCL3、CCR1 在 As 组和对照组之间有显著差异( $P < 0.05$ )。使用机器学习算法 LASSO 回归进一步缩小核心基因的范围,结果发现,当模型系数值( $\lambda$  为调控回归模型的复杂程度的变量)的对数值逐渐变为 0 时基因被排除,只有 3 个基因可以保

证模型均方误差最小,即 MMP-9、CCL3 和 CCR1 (图 4)。考虑到 NAFLD 可能是通过分泌蛋白来影响 As 的发生发展,通过在线人类蛋白质图谱数据库 (<https://www.Proteinatlas.org/>) 下载编码分泌蛋白的 3 969 个基因,发现 MMP-9 和 CCL3 可作为分泌蛋白发挥作用,最终认为 MMP-9 和 CCL3 可能是 NAFLD 相关 As 最重要的分泌蛋白。

### 2.5 MMP-9、CCL3 在高脂饮食喂养小鼠肝脏及主动脉窦组织中的表达

#### 2.5.1 小鼠肝脏和主动脉窦组织 HE 染色特征

小鼠肝脏组织 HE 染色显示,对照组小鼠肝脏组织肝细胞排列整齐有序,肝窦未见扩张,细胞未见明显变性,组织未见明显炎症细胞浸润;高脂饮食

组小鼠肝脏组织结构异常,肝细胞排列紊乱,肝窦扩张充血及炎症细胞浸润,肝细胞脂肪变性,胞质内可见大小不一圆形空泡,小叶内可见炎症细胞浸润。小鼠主动脉窦组织 HE 染色显示,对照组小鼠主

动脉窦结构正常,管壁较薄,内皮细胞排列有序,未见明显变性脱落,组织未见明显炎症细胞浸润;高脂饮食组小鼠主动脉窦内皮细胞受损,内膜增厚,管腔狭窄,大量脂质斑块形成,部分区域可见纤维帽(图 5)。

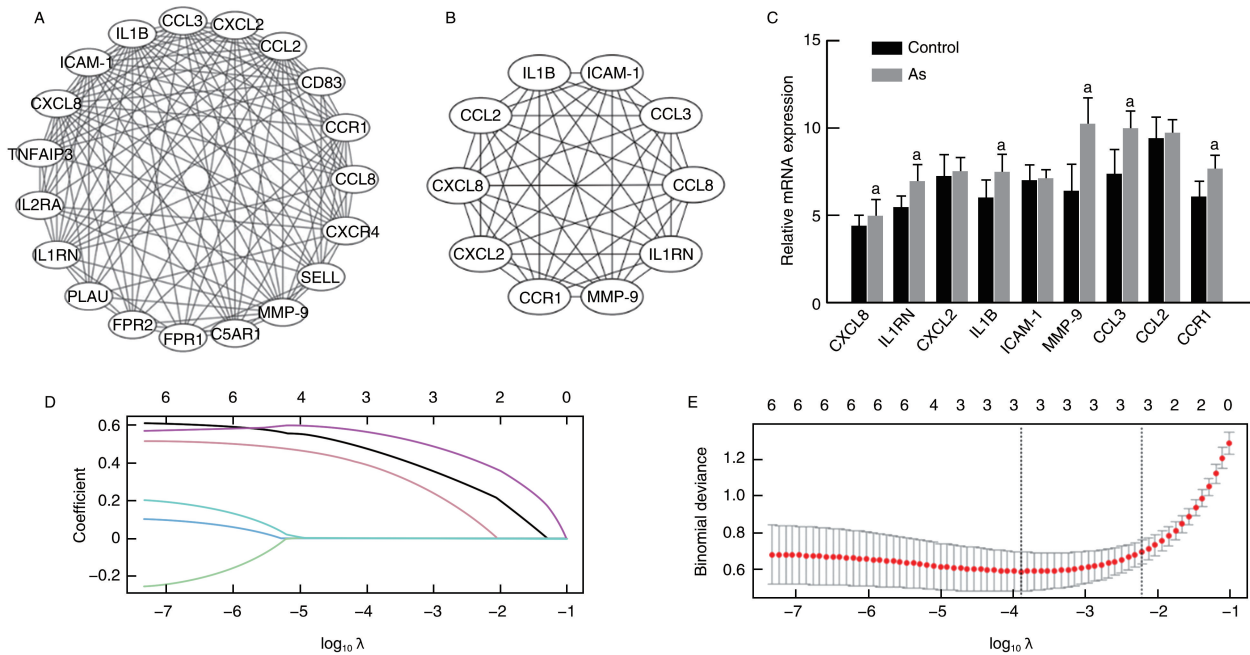


图 4. 综合多种生物信息分析方法筛选核心基因

A、B 分别是 MCODE 和 cytoHubba 插件筛选出的重要基因;C 是在数据集 GSE190627 中验证交叉基因的表达, a 为  $P < 0.001$ , 与对照组比较; D、E 是 LASSO 回归结果图, 模型系数值变为 0 时该基因被排除, 模型均方差最小时对应的基因数为筛选出的基因数目。

Figure 4. Screening the hub genes by integrated bioinformatics analysis

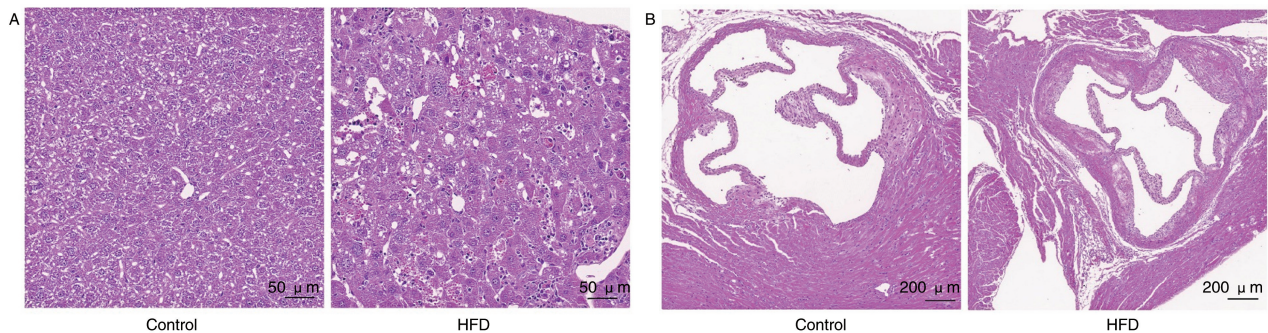


图 5. 小鼠肝脏组织和主动脉窦组织的 HE 染色 ( $n=5$ )

A 为小鼠肝脏组织的 HE 染色结果, B 为小鼠主动脉窦组织的 HE 染色结果。

Figure 5. HE staining of mouse liver tissue and aortic sinus tissue ( $n=5$ )

### 2.5.2 小鼠肝脏组织中 MMP-9 和 CCL3 的表达

免疫组织化学染色显示,高脂饮食组小鼠肝脏组织中 MMP-9 和 CCL3 的表达量明显增加。定量分析结果显示,高脂饮食组小鼠肝脏组织 MMP-9 的表达量是对照组的 2.43 倍 ( $P < 0.001$ ), CCL3 的表达量是对照组的 1.35 倍 ( $P < 0.01$ ; 图 6)。

### 2.5.3 小鼠主动脉窦组织中 MMP-9 和 CCL3 的表达

免疫组织化学染色显示,高脂饮食组小鼠主动脉窦组织中 MMP-9 和 CCL3 的表达量明显增加。定量分析结果显示,高脂饮食组小鼠肝脏组织 MMP-9 的表达量是对照组的 2.10 倍 ( $P < 0.001$ ), CCL3 的表达量是对照组的 1.58 倍 ( $P < 0.01$ ; 图 7)。

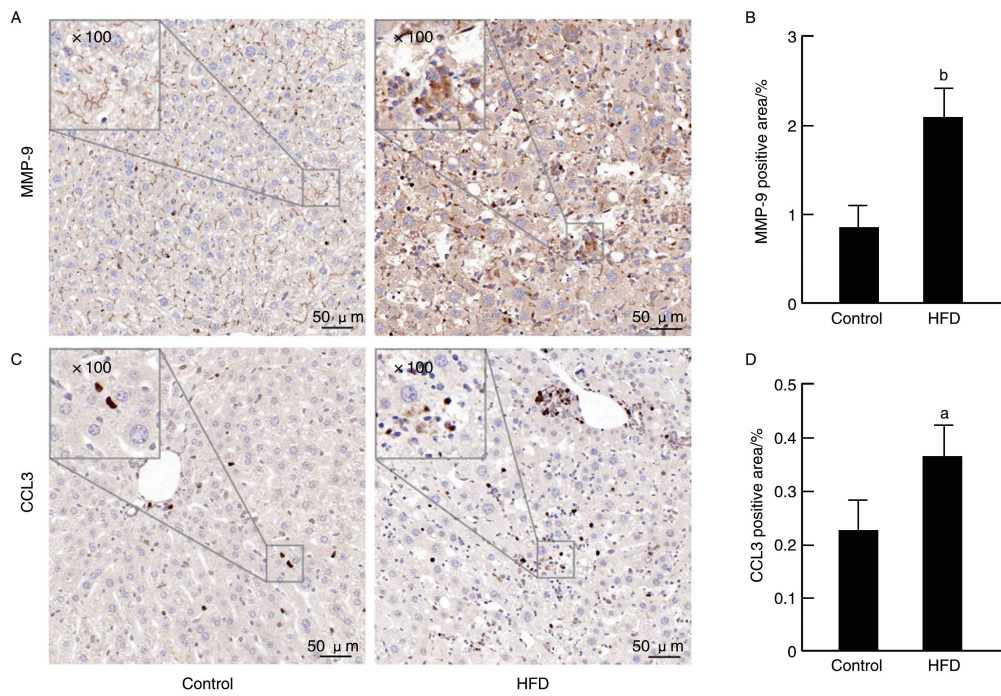


图 6. 小鼠肝脏组织中 MMP-9 和 CCL3 的免疫组织化学染色及定量分析 ( $n=5$ )  
A、B 分别为小鼠肝脏组织中 MMP-9 的免疫组织化学染色及定量分析结果, C、D 分别为小鼠肝脏组织中 CCL3 的免疫组织化学染色及定量结果。a 为  $P<0.01$ , b 为  $P<0.001$ , 与对照组比较。

Figure 6. Immunohistochemical staining and quantitative analysis of MMP-9 and CCL3 in mouse liver tissues ( $n=5$ )

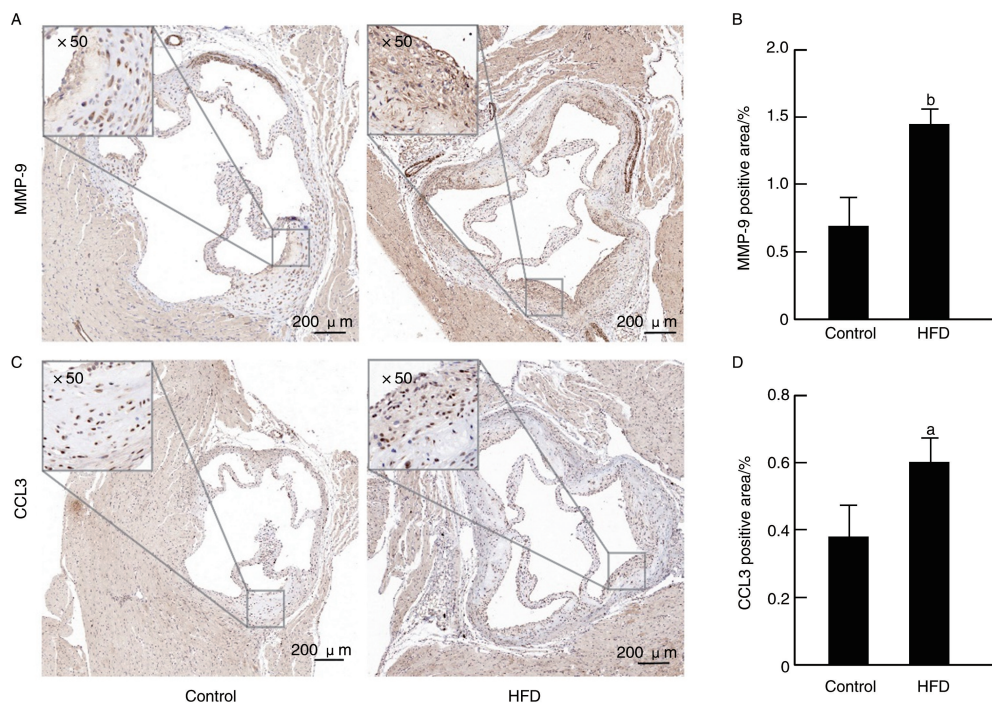


图 7. 小鼠主动脉窦组织中 MMP-9 和 CCL3 的免疫组织化学及定量分析 ( $n=5$ )  
A、B 分别为小鼠主动脉窦组织中 MMP-9 的免疫组织化学染色及定量分析结果, C、D 分别为小鼠主动脉窦组织中 CCL3 的免疫组织化学染色及定量分析结果。a 为  $P<0.01$ , b 为  $P<0.001$ , 与对照组比较。

Figure 7. Immunohistochemical staining and quantitative analysis of MMP-9 and CCL3 in mouse aortic sinus tissue ( $n=5$ )

## 2.6 NAFLD 合并 CHD 患者血清 MMP-9 和 CCL3 水平

CCL3 和 MMP-9 主要是分泌型蛋白。考虑到 NAFLD 和 As 两种疾病的串扰可能是通过分泌蛋白来实现,故分析了 NAFLD 合并 CHD 患者血清 MMP-9 和 CCL3 的水平差异。ELISA 结果显示,NAFLD 患者的血清 MMP-9 和 CCL3 水平分别为对照者的 1.53 倍 ( $P < 0.001$ ) 和 1.31 倍 ( $P < 0.05$ ),CHD 患者的血清 MMP-9 和 CCL3 水平分别为对照者的 1.55 倍 ( $P < 0.001$ ) 和 1.42 倍 ( $P < 0.001$ ),NAFLD 合并 CHD 患者的血清 MMP-9 和 CCL3 水平分别为单纯 NAFLD 患者的 1.22 倍 ( $P < 0.01$ ) 和 1.40 倍 ( $P < 0.001$ ),NAFLD 合并 CHD 患者的血清 MMP-9 和 CCL3 水平分别为单纯 CHD 患者的 1.21 倍 ( $P < 0.01$ ) 和 1.29 倍 ( $P < 0.01$ );图 8)。

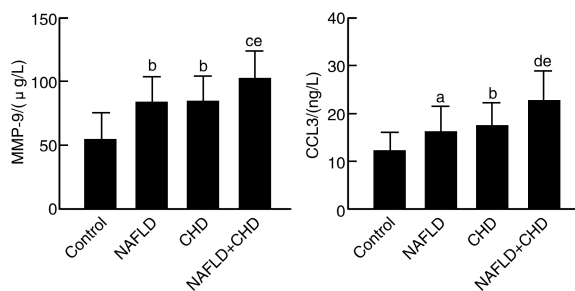


图 8. 各组患者血清 MMP-9 和 CCL3 水平

a 为  $P < 0.05$ , b 为  $P < 0.001$ , 与对照组比较; c 为  $P < 0.01$ , d 为  $P < 0.001$ , 与 NAFLD 组比较; e 为  $P < 0.01$ , 与 CHD 组比较。

Figure 8. Serum MMP-9 and CCL3 levels of patients in each group

## 3 讨论

大量的流行病学和临床证据表明,NAFLD 不仅与肝脏疾病有关,而且与各种心血管疾病有关,尤其是 As 心血管疾病<sup>[10-11]</sup>。研究证实,NAFLD 可以促进和加重 As 的发展,但确切的机制尚不清楚。本研究利用生物信息学方法,从基因和转录水平方面确定 NAFLD 和 As 的关键串扰基因,探索 NAFLD 相关 As 的可能机制。

本研究分别从 GEO 数据库中获取了与 NAFLD 和 As 相关的转录组测序数据集 GSE89632 和 GSE43292,进行了差异基因分析和关键模块基因筛选,最终发现 NAFLD 和 As 存在一部分共享基因。对这些共享基因进行功能富集分析,结果发现这些共享基因在多个生物学过程和通路中发挥重要作用,包括白细胞迁移、趋化因子受体结合、细胞因子-

细胞因子受体相互作用、IL-17、NF- $\kappa$ B 信号通路等炎症反应和免疫过程。其次,富集分析显示,RAGE 结合反应可能也在 NAFLD 相关 As 中发挥重要作用。由于胰岛素抵抗和脂肪酸代谢异常,NAFLD 患者往往伴随着更高的血糖水平,导致糖基化终末产物(advanced glycation end product, AGE)的生成增加。研究发现 AGE 参与内皮功能障碍、血管平滑肌细胞增殖和胆固醇积累等,促进 As 的发生发展<sup>[12-14]</sup>。另外,AGE 可以通过与各种细胞表面的 RAGE 结合来激活炎症反应和细胞损伤,进一步加剧 NAFLD 患者的肝脏炎症和纤维化过程<sup>[15-16]</sup>。结合本研究分析结果,猜测 AGE 信号反应可能是 NAFLD 和 As 两种疾病联系的枢纽,抑制 RAGE 信号通路可能是 NAFLD 和 NAFLD 相关 As 潜在的治疗策略。

本研究通过构建 NAFLD 和 As 共享基因的 PPI 网络、Cytoscape 插件筛选、As 公共数据集 GSE100927 验证和 LASSO 回归等多种生物信息学方法,确定了 MMP-9、CCL3、CCR1 可能是 NAFLD 相关 As 重要的核心基因。另外,考虑到 NAFLD 可能是通过分泌蛋白的释放来促进 As 的发生发展,通过在线数据库获取所有分泌蛋白对应的编码基因,确定了 MMP-9 和 CCL3 两种分泌蛋白可能在 NAFLD 相关 As 机制中发挥关键作用。MMP-9 是一种胶原酶,主要参与胶原蛋白的降解和细胞外基质重塑,破坏血管内皮完整性。已有大量的研究证实 MMP-9 参与 As 斑块的形成、破坏和血管壁的重塑<sup>[17-18]</sup>。血清 MMP-9 水平是 As 斑块发生不稳定进展的独立危险因素<sup>[19]</sup>。最近的研究发现,MMP-9 也参与肝细胞炎症反应、纤维化和肝脏组织的重塑过程。如高脂饮食喂养的小鼠肝星状细胞激活、肝细胞分泌的 MMP-9 水平增加、促进肝纤维化进展<sup>[20]</sup>。也有研究表明非酒精性脂肪性肝炎患者血清中 MMP-9 水平明显升高,MMP-9 也许可以作为诊断非酒精性脂肪性肝炎的有效生物标志物<sup>[21]</sup>。有趣的是,本研究观察到 NAFLD 合并冠心病患者的血清 MMP-9 水平明显升高,提示 MMP-9 对 As 的影响可能不止集中在炎症反应和斑块的破坏方面,可能与 NAFLD 的疾病发展也有关。CCL3 是由巨噬细胞、T 细胞和其他炎症细胞分泌的趋化因子,参与巨噬细胞炎症反应、白细胞趋化和斑块形成过程<sup>[22-23]</sup>。作为一种炎症蛋白,早前已有研究发现 CCL3 可能诱导中性粒细胞在 As 斑块中聚集,从而加速病变形成<sup>[24]</sup>。最近,还有研究指出 CCL3 水平与冠状动脉病变的严重程度呈正

相关<sup>[25-26]</sup>。但是 CCL3 导致 As 的机制研究目前还未明确。有研究发现高脂饮食喂养的小鼠血浆 CCL3 水平更高, CCL3 敲除小鼠减轻了高脂饮食诱导的脂肪性肝炎和纤维化, 而 CCL3 促进脂肪性肝炎进展可能与巨噬细胞浸润肝脏及 M1 型巨噬细胞极化有关<sup>[27]</sup>。目前还没有研究涉及 CCL3 与 NAFLD 相关 As 的可能机制, 本研究提示 CCL3 可能是 NAFLD 相关 As 的发生发展中一个关键的靶点。

本研究通过数据挖掘的方式筛选出了 2 个可能参与 NAFLD 相关 As 机制的重要基因, 分别是 MMP-9 和 CCL3。为了确定生物信息分析学的准确性, 采用高脂饮食喂养 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠 12 周, 通过免疫组织化学染色, 发现 MMP-9 和 CCL3 在高脂饮食小鼠肝脏组织和主动脉窦组织中高表达。As 斑块的形成和发展是 CHD 最重要的病理生理过程。因此, 本研究还进行了单中心的病例对照研究, 检测了 NAFLD 合并 CHD 患者和对照者血清 MMP-9 和 CCL3 水平, 结果表明 NAFLD 合并 CHD 患者血清 MMP-9 和 CCL3 水平明显高于单纯 NAFLD 患者和单纯 CHD 患者。

总的来说, 综合多种生物信息学方法及实验验证, 本研究发现, 除了各自在 NAFLD 和 As 中发挥作用, MMP-9 和 CCL3 可能是两种疾病的关键枢纽, 可能是 NAFLD 相关 As 的潜在靶点, 为 NAFLD 和 NAFLD 相关 As 进一步的研究和治疗提供了新的线索和参考价值。然而, 本研究存在一定的局限性。首先, 在实验验证阶段, 本研究缺乏 NAFLD 和 As 疾病状态的人组织样本的 MMP-9 和 CCL3 的表达水平评估, 希望在未来的研究中进一步验证。其次, 本研究临床验证部分属于单中心研究, 且病例数有限, 未来需进行多中心大规模验证。最后, MMP-9 和 CCL3 是否通过 NAFLD 相关机制来影响 As 及 As 心血管疾病的发生发展, 以及两种分泌蛋白对 NAFLD 患者发生冠心病风险的诊断、预后及因果关系都还需要进一步研究。未来将通过更深入的研究探索 MMP-9 和 CCL3 在这两种疾病发病机制及其串扰关系中发挥的作用。

#### [参考文献]

[1] 曾静, 范建高. 《代谢相关(非酒精性)脂肪性肝病防治指南(2024年版)》解读[J]. 中国动脉硬化杂志, 2024, 32(7): 553-557.  
ZENG J, FAN J G. Interpretation and practical application of guidelines for the prevention and treatment of metabolic dysfunction-associated (non-alcoholic) fatty liver disease (Version 2024)[J]. Chin J Arterioscler, 2024, 32(7): 553-557.

[2] POWELL E E, WONG V W, RINELLA M. Non-alcoholic fatty liver disease[J]. Lancet, 2021, 397(10290): 2212-2224.  
[3] LI H, YU X H, OU X, et al. Hepatic cholesterol transport and its role in non-alcoholic fatty liver disease and atherosclerosis[J]. Prog Lipid Res, 2021, 83: 101109.  
[4] KIM H, LEE D S, AN T H, et al. Metabolic spectrum of liver failure in type 2 diabetes and obesity: from NAFLD to NASH to HCC[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(9): 4495.  
[5] HUANG D Q, DOWNES M, EVANS R M, et al. Shared mechanisms between cardiovascular disease and NAFLD[J]. Semin Liver Dis, 2022, 42(4): 455-464.  
[6] DUELL P B, WELTY F K, MILLER M, et al. Nonalcoholic fatty liver disease and cardiovascular risk: a scientific statement from the American Heart Association[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2022, 42(6): e168-e185.  
[7] LEE Y, KIM B R, KANG G H, et al. The effects of PPAR agonists on atherosclerosis and nonalcoholic fatty liver disease in ApoE<sup>-/-</sup> FXR<sup>-/-</sup> mice[J]. Endocrinol Metab (Seoul), 2021, 36(6): 1243-1253.  
[8] 陈刘欣, 于凤秀, 朱文君, 等. 蛹虫草多糖对 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠非酒精性脂肪性肝病的保护效应及机制[J]. 中国动脉硬化杂志, 2022, 30(3): 219-224.  
CHEN L X, YU F X, ZHU W J, et al. Protective effect and mechanism of cordycepsmilitaris polysaccharide on nonalcoholic fatty liver disease in ApoE<sup>-/-</sup> mice[J]. Chin J Arterioscler, 2022, 30(3): 219-224.  
[9] 中国医师协会脂肪性肝病专家委员会, 中华医学会肝病学分会脂肪肝和酒精性肝病学组. 酒精性肝病防治指南(2018年更新版)[J]. 临床肝胆病杂志, 2018, 34(5): 939-946.  
Expert Committee on Fatty Liver Disease of the Chinese Medical Association, The Fatty Liver and Alcoholic Liver Disease Group of the Hepatology Branch of the Chinese Medical Association. Guidelines of prevention and treatment for alcoholic liver disease: a 2018 update[J]. J Clin Hepatol, 2018, 34(5): 939-946.  
[10] NIEDERSEER D, WERNLY B, AIGNER E, et al. NAFLD and cardiovascular diseases; epidemiological, mechanistic and therapeutic considerations[J]. J Clin Med, 2021, 10(3): 467.  
[11] MANTOVANI A, CSERMELY A, PETRACCA G, et al. Non-alcoholic fatty liver disease and risk of fatal and non-fatal cardiovascular events; an updated systematic review and Meta-analysis[J]. Lancet Gastroenterol Hepatol, 2021, 6(11): 903-913.  
[12] JAHAN H, CHOUDHARY M I. Glucosylated alters macrophages polarization state in diabetic atherosclerosis *in vitro* via blocking AGE-RAGE/TLR4-reactive oxygen species-activated NF-κB nexus[J]. Eur J Pharmacol, 2021, 894: 173874.  
[13] SINGH S, SIVA B V, RAVICHANDIRAN V. Advanced glycation end products: key player of the pathogenesis of atherosclerosis[J]. Glycoconj J, 2022, 39(4): 547-563.  
[14] 袁咏军, 黄巧冰. 1-磷酸鞘氨醇受体 1 参与晚期糖基化终产物引起的血管平滑肌细胞增殖和迁移[J]. 中国动脉硬化杂志, 2021, 29(10): 845-850.  
YUAN Y J, HUANG Q B. Sphingosine 1-phosphate receptor 1 participates in the proliferation and migration of vascular smooth

- muscle cells induced by advanced glycation end products[J]. *Chin J Arterioscler*, 2021, 29(10): 845-850.
- [15] LAUDENSLAGER M, LAZO M, WANG D, et al. Association between the soluble receptor for advanced glycation end products (sRAGE) and NAFLD in participants in the Atherosclerosis Risk in Communities Study[J]. *Dig Liver Dis*, 2021, 53(7): 873-878.
- [16] PRIKEN K, TAPIA G, CADAGAN C, et al. Higher hepatic advanced glycation end products and liver damage markers are associated with nonalcoholic steatohepatitis[J]. *Nutr Res*, 2022, 104: 71-81.
- [17] NJAU F, HALLER H. Calcium dobesilate modulates PKC $\delta$ -NADPH oxidase-MAPK-NF- $\kappa$ B signaling pathway to reduce CD14, TLR4, and MMP9 expression during monocyte-to-macrophage differentiation: potential therapeutic implications for atherosclerosis [J]. *Antioxidants (Basel)*, 2021, 10(11): 1798.
- [18] LIU Q L, PAN J L, BAO L R, et al. Major vault protein prevents atherosclerotic plaque destabilization by suppressing macrophage ASK1-JNK signaling[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2022, 42(5): 580-596.
- [19] CASELLI C, DI GIORGI N, RAGUSA R, et al. Association of MMP9 with adverse features of plaque progression and residual inflammatory risk in patients with chronic coronary syndrome (CCS) [J]. *Vascul Pharmacol*, 2022, 146: 107098.
- [20] KIM K E, LEE J, SHIN H J, et al. Lipocalin-2 activates hepatic stellate cells and promotes nonalcoholic steatohepatitis in high-fat diet-fed Ob/Ob mice[J]. *Hepatology*, 2023, 77(3): 888-901.
- [21] WAGNER J, KUMAR Y, LAUTENBACH A, et al. Fatty acid-binding protein-4 (FABP4) and matrix metalloproteinase-9 (MMP9) as predictive values for nonalcoholic steatohepatitis (NASH) [J]. *Lipids Health Dis*, 2023, 22(1): 1.
- [22] LU Y L, ZHOU M, PENG J, et al. DEL-1 suppression attenuates atherosclerosis by modulating macrophagic GSK-3 $\beta$ /CEBP- $\beta$  signaling pathway[J]. *Int J Cardiol*, 2023, 376: 115-124.
- [23] KUMAWAT A K, ZEGEYE M M, PARAMEL G V, et al. Inhibition of IL17A using an affibody molecule attenuates inflammation in ApoE-deficient mice[J]. *Front Cardiovasc Med*, 2022, 9: 831039.
- [24] DE JAGER S C A, BOT I, KRAAIJEVELD A O, et al. Leukocyte-specific CCL3 deficiency inhibits atherosclerotic lesion development by affecting neutrophil accumulation[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2013, 33(3): e75-e83.
- [25] KAZEMIAN S, AHMADI R, FERNS G A, et al. Correlation of miR-24-3p and miR-595 expression with CCL3, CCL4, IL1-beta, TNFalphaIP3, and NF-kappaB1alpha genes in PBMCs of patients with coronary artery disease[J]. *EXCLI J*, 2022, 21: 1184-1195.
- [26] PROFUMO E, BUTTARI B, TOSTI M E, et al. Increased circulating levels of MIP-1 $\alpha$  and CD14 are associated with the presence of severe stenosis and hypoechoic plaques in patients with carotid atherosclerosis [J]. *Int J Immunopathol Pharmacol*, 2023, 37: 3946320231160411.
- [27] XU L, CHEN Y P, NAGASHIMADA M Y I, et al. CC chemokine ligand 3 deficiency ameliorates diet-induced steatohepatitis by regulating liver macrophage recruitment and M1/M2 status in mice[J]. *Metabolism*, 2021, 125: 154914.
- (此文编辑 文玉珊)

(上接第 572 页)

- [13] LI W Q, DEHNADE F, ZAFARULLAH M. Oncostatin M-induced matrix metalloproteinase and tissue inhibitor of metalloproteinase-3 genes expression in chondrocytes requires Janus kinase/STAT signaling pathway[J]. *J Immunol*, 2001, 166(5): 3491-3498.
- [14] BASU R, FAN D, KANDALAM V, et al. Loss of Timp3 gene leads to abdominal aortic aneurysm formation in response to angiotensin II [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(53): 44083-44096.
- [15] 李军芳, 来利红. 柚皮素对高糖诱导的 H9c2 心肌细胞凋亡及 Nrf2/ARE 信号通路的影响[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2022, 30(12): 1040-1044.
- LI J F, LAI L H. Effects of naringenin on apoptosis and Nrf2/ARE signaling pathway of H9c2 cardiomyocytes induced by high glucose [J]. *Chin J Arterioscler*, 2022, 30(12): 1040-1044.
- [16] LIU H, ZHAO H, CHE J, et al. Naringenin protects against hypertension by regulating lipid disorder and oxidative stress in a rat model[J]. *Kidney Blood Press Res*, 2022, 47(6): 423-432.
- [17] ZHANG L, YANG Z H, LI X Y, et al. Anti-atherosclerotic effects of naringenin and quercetin from *Folium Artemisiae argyi* by attenuating Interleukin-1 beta (IL-1 $\beta$ )/matrix metalloproteinase 9 (MMP9): network pharmacology-based analysis and validation [J]. *BMC Complement Med Ther*, 2023, 23(1): 378.
- [18] ADETUNJI J A, FASAE K D, AWE A I, et al. The protective roles of citrus flavonoids, naringenin, and naringin on endothelial cell dysfunction in diseases[J]. *Heliyon*, 2023, 9(6): e17166.
- [19] JIA Y T, ZHANG L, LIU Z Y, et al. Targeting macrophage TFEB-14-3-3 epsilon interface by naringenin inhibits abdominal aortic aneurysm[J]. *Cell Discov*, 2022, 8(1): 21.
- [20] BORLAND G, MURPHY G, AGER A. Tissue inhibitor of metalloproteinases-3 inhibits shedding of L-selectin from leukocytes [J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(5): 2810-2815.
- [21] AMOUR A, SLOCOMBE P M, WEBSTER A, et al. TNF-alpha converting enzyme (TACE) is inhibited by TIMP-3 [J]. *FEBS Lett*, 1998, 435(1): 39-44.
- (此文编辑 文玉珊)