

本文引用: 玛伊拜·木沙江, 钱勇江, 王中群. 动脉粥样硬化患者血液转录组中关键基因的筛选[J]. 中国动脉硬化杂志, 2024, 32(8): 669-676. DOI: 10.20039/j.cnki.1007-3949.2024.08.004.

[文章编号] 1007-3949(2024)32-08-0669-08

· 临床研究 ·

动脉粥样硬化患者血液转录组中关键基因的筛选

玛伊拜·木沙江, 钱勇江, 王中群

江苏大学附属医院心内科, 江苏省镇江市 212001

[摘要] [目的] 基于血液转录组学探讨动脉粥样硬化患者血液转录组中的关键基因。[方法] 从 GEO 数据库中选取三个数据集 GSE12288、GSE27034 和 GSE90074, 进行合并和归一化处理, 分析动脉粥样硬化患者和对照者外周血样本之间的差异基因, 对差异表达基因进行富集分析, 然后对所有基因进行加权基因共表达网络分析, 利用差异表达基因构建蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络, 利用 CytoHubba 基于共表达网络和 PPI 网络筛选关键基因。通过 RT-qPCR 检测关键基因的表达。[结果] 在动脉粥样硬化患者和对照者之间鉴定出 74 个下调基因和 145 个上调基因, 通过 GO 和 KEGG 富集分析发现其主要在中性粒细胞活化、粒细胞活化、细胞因子-细胞因子受体相互作用和趋化因子信号通路等方面显著富集。此外, 还鉴定出共表达网络中的前 10 个基因和 PPI 网络中的前 20 个基因, 其中 PRF1、NKG7、GZMB 和 CCL5 在 PPI 网络和共表达网络中具有较高的核心地位。RT-qPCR 结果显示, 与非冠状动脉粥样硬化者相比, 冠状动脉粥样硬化患者外周静脉血外周血单个核细胞(PBMC)中 PRF1 和 GZMB 的 mRNA 表达水平显著降低($P < 0.05$), 而 NKG7 和 CCL5 的 mRNA 表达水平显著升高($P < 0.05$)。[结论] PRF1、GZMB、NKG7 和 CCL5 可能是动脉粥样硬化患者血液转录组中的关键基因, 有望成为诊断和治疗动脉粥样硬化的潜在生物学标志。

[关键词] 动脉粥样硬化; 关键基因; 血液转录组; 加权基因共表达网络分析

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

Screening of key genes from blood transcriptome of patients with atherosclerosis

MAYIBAI Mushajiang, QIAN Yongjiang, WANG Zhongqun

Department of Cardiology, Affiliated Hospital of Jiangsu University, Zhenjiang, Jiangsu 212001, China

[ABSTRACT] **Aim** To explore the key genes in the blood transcriptome of atherosclerosis patients based on blood transcriptomics. **Methods** Three datasets GSE12288, GSE27034 and GSE90074 were extracted from the GEO database and performed the merging and normalization processing. The differential genes in peripheral blood samples of atherosclerosis patients and controls were analyzed, and enrichment analysis of differentially expressed genes were performed. Then weighted gene co-expression network analysis was performed for all genes. Using differentially expressed genes to construct protein-protein interaction (PPI) network, and using CytoHubba to screen key genes based on co-expression network and PPI network. And the expression levels of key genes were detected by RT-qPCR. **Results** 74 down-regulated genes and 145 up-regulated genes were identified between atherosclerosis patients and controls. GO and KEGG enrichment analyses revealed that they were significantly enriched in neutrophil activation, granulocyte activation, cytokine-cytokine receptor interaction and chemokine signaling pathway. In addition, the top 10 genes in the co-expression network and the top 20 genes in the PPI network were also identified, in which PRF1, NKG7, GZMB and CCL5 played a high core role in the PPI network and co-expression network. The RT-qPCR results showed that compared with the non coronary atherosclerosis controls, the mRNA expression levels of PRF1 and GZMB in peripheral venous blood peripheral blood mononuclear cell (PBMC) of coronary atherosclerosis patients were significantly reduced ($P < 0.05$), while the mRNA expression levels of NKG7 and CCL5 were significantly increased ($P < 0.05$). **Conclusion** PRF1, GZMB, NKG7 and

[收稿日期] 2023-12-05

[修回日期] 2024-04-29

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81970379)

[作者简介] 玛伊拜·木沙江, 硕士研究生, 主要研究方向为糖尿病大血管并发症的基础与临床, E-mail: 2827613727@qq.com。通信作者王中群, 博士, 副主任医师, 教授, 博士研究生导师, 主要研究方向为糖尿病大血管并发症的基础与临床, E-mail: wangtsmc@126.com。

CCL5 may be key genes in the blood transcriptome of atherosclerosis patients, and are expected to be potential biomarkers for diagnosis and treatment of atherosclerosis.

[KEY WORDS] atherosclerosis; key genes; blood transcriptome; weighted gene co-expression network analysis

动脉粥样硬化是导致心肌梗死、脑卒中以及外周动脉疾病等心血管疾病的重要原因,病理机制复杂^[1]。临床上主要通过影像学检查进行动脉粥样硬化诊断,以非侵入性超声、CT、MRI、PET 为最常用^[2],但侵入性血管造影仍为其“金标准”。除了血清心肌酶谱、肌钙蛋白可以比较敏感且特异地诊断动脉粥样硬化晚期疾病急性心肌梗死,目前大部分动脉粥样硬化性疾病尤其是早期发病时缺乏敏感而特异的血液学诊断标志物。因此,寻找一种可高效诊断和评估动脉粥样硬化性疾病的血液生物化学指标具有重要意义。鉴于此,本研究借助 GEO 数据库中的三个数据集,经过批次矫正进行差异表达基因(differentially expressed gene, DEG)分析,鉴定动脉粥样硬化患者和对照者外周血样本之间的差异表达基因。通过对差异表达基因进行富集分析,探讨其作用机制和相关通路,利用加权基因共表达网络分析(weighted gene co-expression network analysis, WGCNA)探索与其表型相关的基因,通过对蛋白质-蛋白质相互作用(protein-protein interaction, PPI)网络的挖掘和共表达网络筛选 hub 基因,并利用临床样本进行验证,以期成为诊断和治疗本病的潜在生物学标志。

1 资料和方法

1.1 数据检索

在 GEO 数据库中搜索关键字“动脉粥样硬化和血液”,选择物种为“人类”,检索出 197 个数据集,通过人工去除与动脉粥样硬化患者血液无关且分组不明确的 mRNA 芯片数据集,最终选出 3 个数据集:编号为 GSE12288 的冠心病患者外周静脉血白细胞转录组测序数据集(110 个冠心病患者和 112 个非冠心病对照者)^[3]、编号为 GSE27034 的外周动脉粥样硬化患者外周静脉血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)转录组测序数据集(19 个外周动脉粥样硬化患者和 18 个外周动脉正常对照者)^[4]和编号为 GSE90074 的冠心病患者外周静脉血 PBMC 转录组测序数据集(93 个冠心病患者和 50 个非冠心病对照者)^[5]。

1.2 数据预处理

根据患者信息,将样本分为病例组和对照组,然后使用 SVA 包去除批次效应,使用 ComBat 函数

直接调整已知的批次效应,并使用主成分分析(principal component analysis, PCA)对标准化数据矩阵进行数据降维和可视化,比较归一化的效果。

1.3 差异表达基因及富集分析

根据 GEO 中的患者信息,将样本分为病例组和对照组,其表达分布无统计学差异。利用 R 软件 Limma 包分析差异基因。为了探究差异表达基因的功能,利用 R 软件 clusterProfiler 包进行 GO 富集分析和 KEGG 通路富集分析,以矫正 $P < 0.05$ 为显著富集。

1.4 WGCNA

对病例组和对照组的样本进行 WGCNA,使用 R 软件中 WGCNA 包构建动脉粥样硬化和正常样本中所有基因的加权基因共表达网络。选择合适的“软阈值”,设置网络构建参数的选择范围,并计算无标度分布拓扑矩阵。基于表达式矩阵和估计的最佳 β 值,直接构建共表达式矩阵。计算基因间的邻接度,根据邻接度计算基因之间的相似度,然后推导出基因之间的不相似系数,从而得到基因之间的系统聚类树。根据杂交动态剪切树的标准,将每个基因模块中的最小基因数设为 30 个。表达矩阵为 HCLUST 后,加入表达矩阵中样本的分组信息对应的颜色,并通过 PlotDendroandColors 函数进行可视化。选取最相关的模块进行分析,并得到其共表达的网络。

1.5 PPI 网络和网络数据挖掘

利用差异表达基因计算基因的差异倍数和 P 值,再利用 String 数据库和通过 WGCNA 得到的基因共表达网络,构建显著差异表达基因的 PPI 网络。随后,利用 Cytoscape 软件可视化 PPI 网络,利用 CytoHubba 插件中的 MCC 算法,从 PPI 和共表达网络中鉴定 hub 基因。

1.6 关键基因临床验证

募集 2024 年 4 月 1 日—4 月 20 日在江苏大学附属医院心内科住院的冠状动脉粥样硬化患者和非冠状动脉粥样硬化对照者各 10 例,年龄 40 ~ 70 岁,性别不限。经肝素抗凝管采集 4 mL 空腹外周静脉血。纳入标准:(1)首次因胸闷、胸痛就诊的心内科住院患者;(2)所有患者均行冠状动脉造影,且造影提示存在冠状动脉斑块或冠状动脉光滑无病变。排除标准:(1)不稳定型心绞痛、急性心肌梗死患者;(2)肝、肾功能不全患者;(3)存在抗凝、抗血小板禁忌症者;(4)造影剂过敏者;(5)精神认知行为

障碍者;(6)资料不全者。本研究已获得本院伦理委员会批准,患者及家属均知情,并签署知情同意书。Ficoll-Paque PLUS 密度梯度离心新鲜外周静脉血,分离 PBMC,提取总 RNA,再使用反转录试剂盒 HiScript® II Q RT SuperMix for qPCR (+ gDNA wiper) (Vazyme Biotech Co., Ltd.) 及荧光定量 PCR 试剂盒 AceQ qPCR SYBR Green Master Mix (Vazyme Biotech Co., Ltd.) 进行 RT-qPCR 检测,实验操作均

按说明书进行。所选基因引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,引物序列见表 1。

1.7 统计学分析

使用 R4.3.0 版本进行生物信息学分析,使用 GraphPad Prism 9.5 软件进行 RT-qPCR 数据分析。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。

表 1. 引物序列

Table 1. Primer sequences

基因	正向序列(5'-3')	反向序列(5'-3')
PRF1	TGAGGAGAAGAAGAAGCACAAG	CAGCAGGTCGTTAATGGAGGTG
NKG7	GCCTGATGTTCTGCCTGATTGC	CGTGGATGTAGCCTGATATGATGTC
GZMB	TGCGGTGGCTTCCTGATAACG	TCGGCTCCTGTTCTTTGATATTGTG
CCL5	CGCTGTCATCCTCATTGCTACTG	GCCACTGGTGTAGAAATACTCCTTG
GAPDH	AGTCCACTGGCGTCTTCACC	TGATCTTGAGGCTGTTGCATACATTC

2 结果

2.1 数据预处理

通过 PCA 可以观察到三个数据集整合后是否存在批次效应。三个批次的样本的散点在组内呈

现相互聚集的情况,即存在一定的批次效应(图 1A);消除批次效应之后,三个批次的样本和病例组与对照组重叠在一起(图 1B、1C 和 1D),证明批次效应已消除,可用于后续分析。

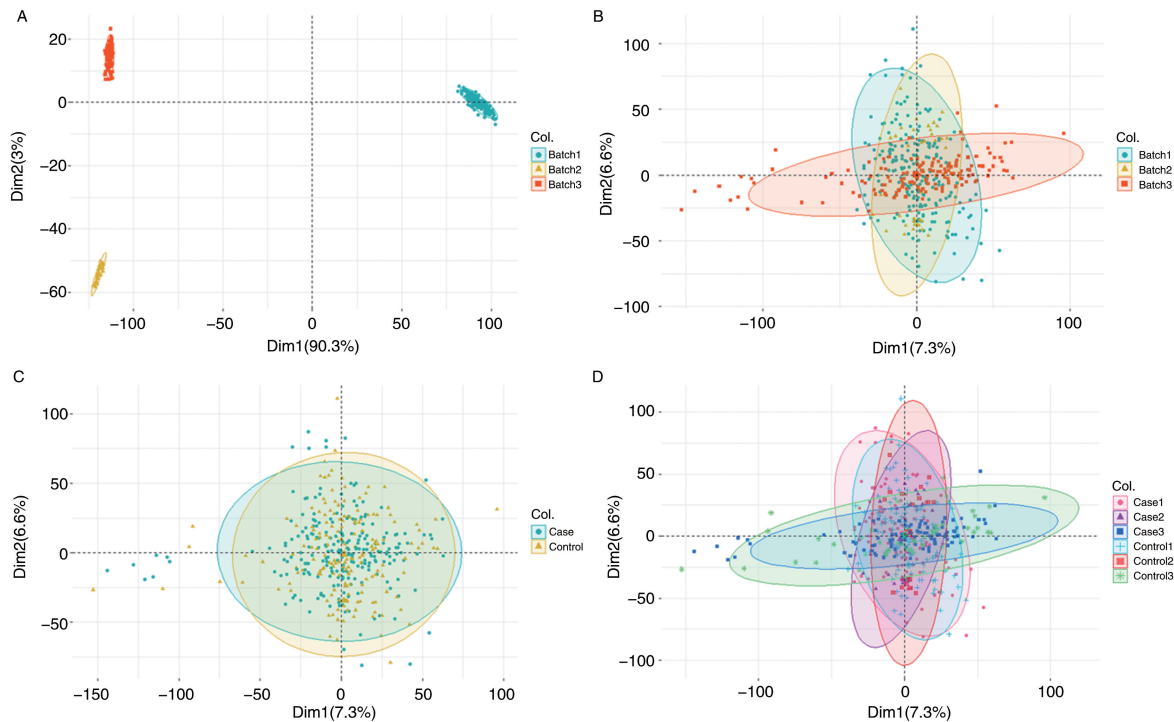


图 1. 动脉粥样硬化患者与对照者外周静脉血细胞的 PCA 图

A 为批次效应消除之前的 PCA 图,三个批次的样本组内聚集在一起,存在批次效应;B 为批次效应消除之后的 PCA 图,三个批次的样本重叠在一起,批次效应已消除,蓝色点、红色点、黄色点分别代表三个批次样本;C 为批次效应消除之后的 PCA 图,病例组和对照组样本重叠在一起,批次效应已消除,蓝色点代表病例组,黄色点代表对照组;D 为批次效应消除之后的 PCA 图,三个病例组与三个对照组样本重叠在一起,批次效应已消除。

Figure 1. PCA diagram of peripheral venous blood cells from atherosclerosis patients and controls

2.2 差异表达基因及富集分析

根据矫正 $P < 0.05$ 鉴定出 74 个下调基因和 145 个上调基因, 绘制 MA 图和火山图 (图 2)。其中下调显著的前 10 个基因为 GZMB、IL18RAP、GZMH、GNLY、KLRF1、CD3G、LILRA4、RETN、CCR7 和 GZMA, 而上调显著的前 10 个基因为 KCNJ13、MS4A4A、CST5、ZMAT5、TBC1D1D22B、SEMA3C、NT5DC2、XYLT1、EPHA2 和 GPR15, 对显著差异表达的基因进行富集分析。GO 富集分析描述包括分子功能 (molecular function, MF)、细胞组分 (cellular component, CC) 和生物过程 (biological process, BP) 三个方面。中性粒细胞活化、粒细胞活化、白细胞脱颗粒

和髓系介导的免疫力在 BP 中最显著 (图 3A), 膜侧在 CC 中最显著 (图 3B), 而免疫受体活性、细胞因子结合和细胞因子受体活性在 MF 中最显著 (图 3C)。KEGG 通路富集分析显示差异表达的基因主要包括细胞因子-细胞因子受体相互作用、趋化因子信号通路、病毒蛋白与细胞因子和细胞因子受体的相互作用、破骨细胞分化、自然杀伤细胞介导的细胞毒性等 (图 3D)。上调基因主要位于亨廷顿病和轴突引导通路 (图 3E), 而下调基因主要位于细胞因子-细胞因子受体相互作用、趋化因子信号通路、病毒蛋白与细胞因子和细胞因子受体相互作用以及破骨细胞分化途径通路 (图 3F)。

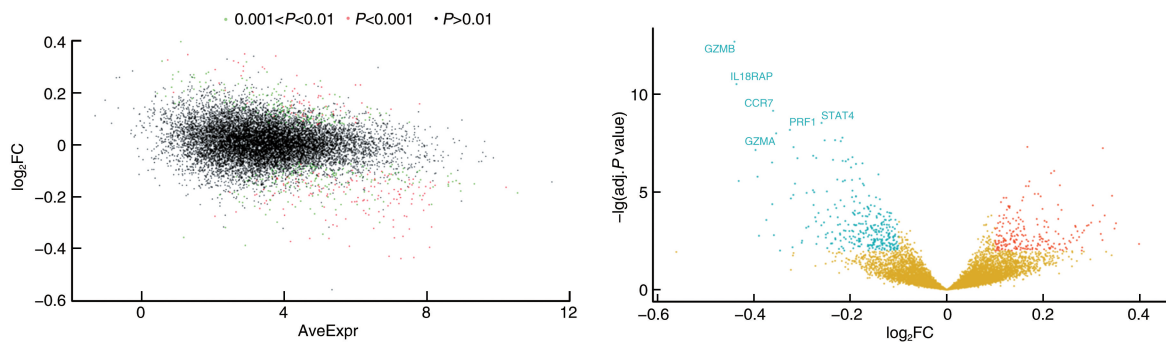


图 2. 动脉粥样硬化患者与对照者外周静脉血细胞之间的差异基因分析

A 为差异基因的 MA 图, 横坐标为表达量, 纵坐标为 FC 值, 颜色代表 P 值; B 为差异基因的火山图, 横坐标为 FC 值, 代表差异倍数的变化, 纵坐标为矫正 P 值, 蓝色点代表动脉粥样硬化患者中下调的基因, 黄色点代表对照者样本与动脉粥样硬化患者样本之间无显著差异的基因, 红色点代表动脉粥样硬化患者中上调的基因。

Figure 2. Differential gene analysis of peripheral venous blood cells between atherosclerosis patients and controls

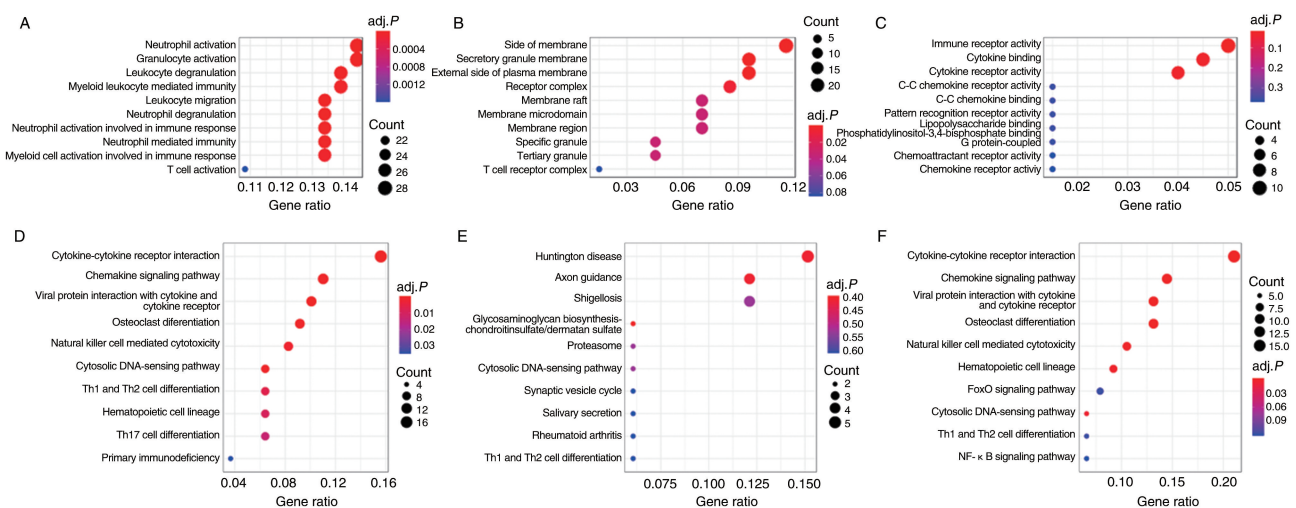


图 3. 动脉粥样硬化患者与对照者外周静脉血细胞差异表达基因的富集分析

A 为 GO 富集分析-BP, B 为 GO 富集分析-CC, C 为 GO 富集分析-MF, D 为 KEGG 富集分析揭示动脉粥样硬化患者差异表达基因的通路, E 为上调基因所在通路, 为 F 下调基因所在通路。图中每一个气泡代表一个基因或通路, 气泡的大小与基因数目成正比, 气泡的不同颜色代表 P 值, 颜色越红代表差异越大。

Figure 3. Enrichment analysis of differentially expressed genes in peripheral venous blood cells of atherosclerosis patients and controls

2.3 共表达网络的数据挖掘

对所有样本进行 WGCNA, 利用基因间的相异系数为基本元素构建聚类树图, 对基因进行模块划分, 构建了 26 个共表达模块, 包含大多数基因模块是 Turquoise 模块, 其次是 Grey 模块(图 4A)。将鉴定的模块与样本特征相关联, 构建了模块与样本特征相关性图(图 4B)。模块特征相关性分析显示, 4 个模块 (Royalblue、Magenta、Darkred、Darkgreen) 与病例

组和对照组显著相关, 其中 Royalblue 模块具有最佳的相关性 ($r = 0.24, P = 2E-06$; 图 4B)。Royalblue 模块中通过 MCC 算法鉴定前 10 个 hub 基因, 按分值从大到小依次为 NKG7、PRF1、GZMH、RUNX3、MATK、CD8A、CCL5、CCL4、KLR1 和 PPP2R2B, 并导出其共表达网络图(图 4C 和 4D)。通过 WGCNA 可知, PRF1 和 NKG7 与动脉粥样硬化的关联度较大。

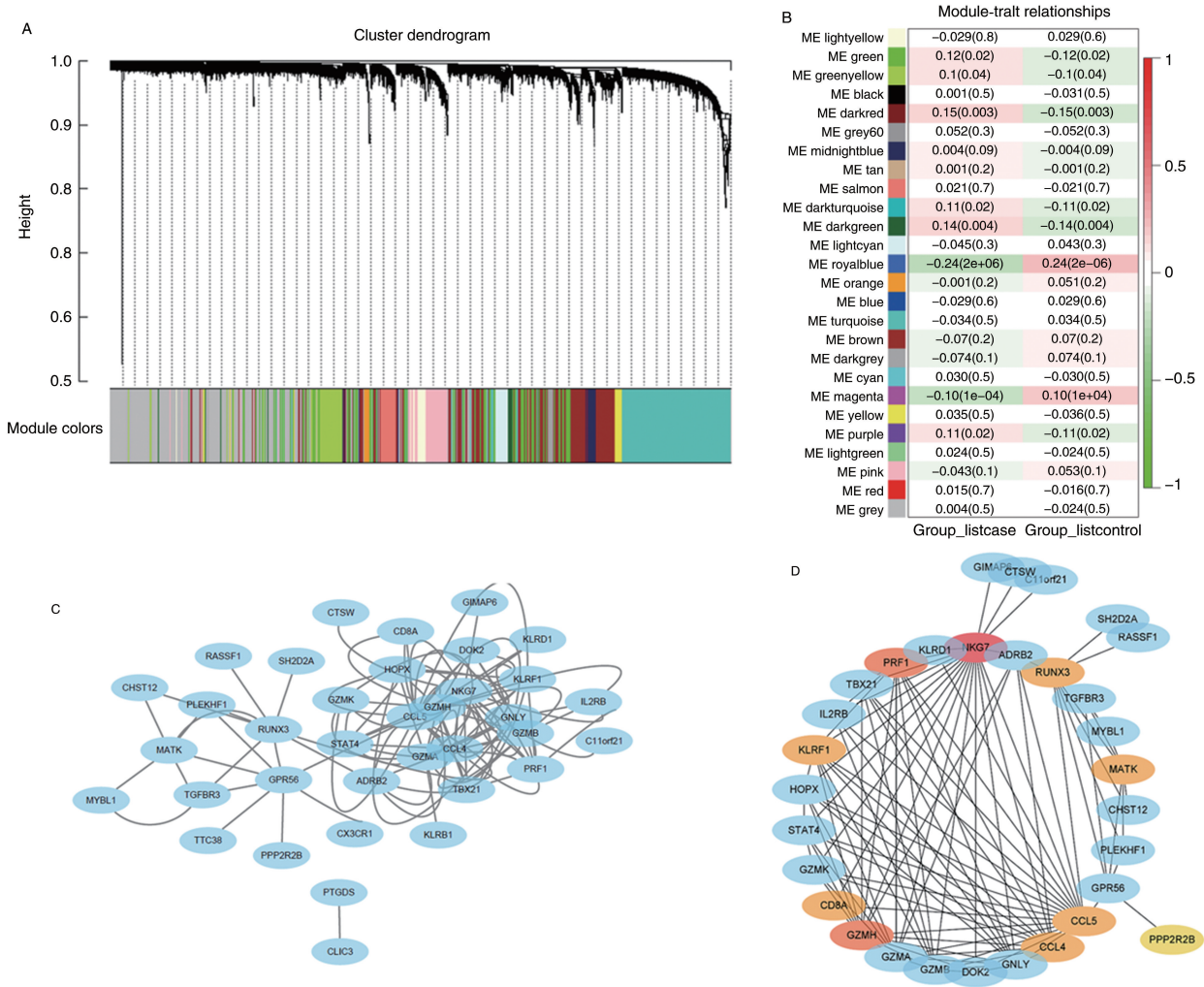


图 4. 动脉粥样硬化患者与对照者外周静脉血细胞的 WGCNA

A 为聚类树状图, 树状图下方的颜色代表不同的模块; B 为模块-特质相关性热图, 每行代表不同的模块特征基因, 第一列为病例组, 第二列为对照组, 单元格颜色表示相关性, 越红表示越正相关, 单元格内的第一行为相应的相关性 r 值, 第二行为 P 值; C 为模块网络图; D 为共表达网络图, 颜色代表核心程度, 颜色越红代表越核心。

Figure 4. WGCNA of peripheral venous blood cells from atherosclerosis patients and controls

2.4 PPI 网络的数据挖掘

利用 String 绘制来自差异表达基因的矫正 $P < 0.05$ 基因的 PPI 网络(图 5), 并用 MCC 算法计算 hub 基因, 鉴定出前 20 个 hub 基因, 按分值从大到小依次为 PRF1、GZMB、TBX21、IL2RB、CD2、CD27、CCR7、

IL7R、CCL5、GZMA、CD8A、GZMK、FASLG、ITGAX、IL2RG、CD244、GNLY、NKG7、CCL4 和 NCR3。通过 PPI 网络可视化结果可知, PRF1 和 GZMB 可能是动脉粥样硬化患者血液中的关键基因。

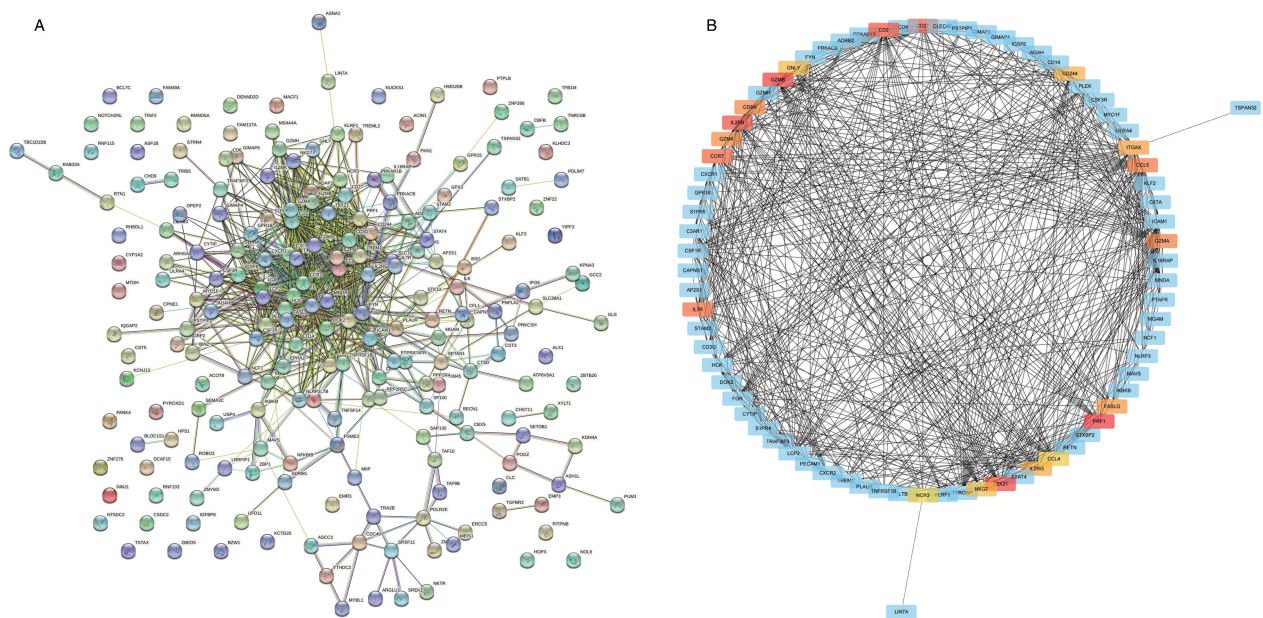


图 5. 动脉粥样硬化患者与对照者外周静脉血细胞差异表达基因的 PPI 网络

A 为彩色圆球代表不同的蛋白质,圆球间的连线代表蛋白质相互作用关系,连线越粗越密集表示蛋白相互作用关系越强;
B 为颜色代表核心程度,颜色越红代表越核心。

Figure 5. PPI network of differentially expressed genes in peripheral venous blood cells of atherosclerosis patients and controls

2.5 冠状动脉粥样硬化患者外周静脉血 PBMC 中关键基因的表达

PRF1、NKG7、GZMB 和 CCL5 在 WGCNA 和 PPI 分析中具有较高的核心地位。因此,使用冠状动脉粥样硬化患者外周静脉血 PBMC 来检测这 4 种关键基因的 mRNA 相对表达量(图 6)。与非冠状动脉粥样硬化对照者相比,冠状动脉粥样硬化患者外周静脉血 PBMC 中 PRF1 和 GZMB 的 mRNA 表达水平显著降低($P<0.05$),而 NKG7 和 CCL5 的 mRNA 表达水平显著升高($P<0.05$)。

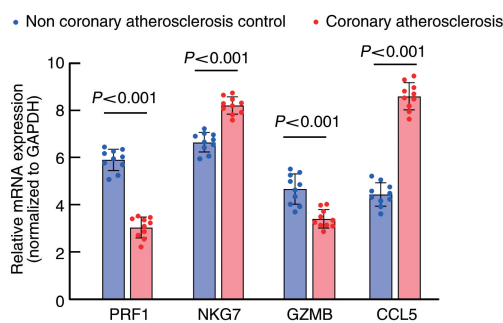


图 6. 冠状动脉粥样硬化患者外周静脉血 PBMC 中关键基因的 mRNA 相对表达量($n=10$)

Figure 6. Relative mRNA expression levels of key genes in peripheral venous blood PBMC of patients with coronary atherosclerosis($n=10$)

3 讨论

动脉粥样硬化是一种慢性炎症性病变^[6],早期可以没有明显的临床表现,但是随着动脉粥样硬化斑块不断演进,最终导致不同程度的血管狭窄乃至闭塞,随之出现不同的临床表现,晚期不稳定斑块破裂导致急性心血管事件,如急性心肌梗死的发生发展,以及后续一系列并发症的产生^[7]。目前大部分动脉粥样硬化疾病尤其是早期发病时缺乏敏感而特异的血液诊断标志物,因此,探寻一种可用于动脉粥样硬化疾病诊断的血液生物化学指标具有重要意义。

本研究对三个公开的 GEO 数据集进行了数据分析,在批量归一化的背景下,在动脉粥样硬化患者和对照者外周血样本中鉴定出 74 个下调基因和 145 个上调基因,这些差异基因代表了动脉粥样硬化环境下外周血细胞基因表达谱的变化。为了进一步探讨其生物学意义,进行了差异表达基因富集分析,GO 和 KEGG 富集分析发现差异表达基因主要在中性粒细胞活化、粒细胞活化、白细胞脱颗粒、细胞因子-细胞因子受体相互作用、趋化因子信号通路和自然杀伤细胞介导的细胞毒性等方面显著富集。进一步利用 WGCNA 筛选了与样本特征相关的

基因,并根据其共表达网络确定了前 10 个 hub 基因。此外,基于对 PPI 网络的挖掘,筛选了前 20 个 hub 基因。其中 PRF1、NKG7、GZMB 和 CCL5 在 WGCNA 和 PPI 分析中具有较高的核心地位。冠状动脉粥样硬化是动脉粥样硬化导致器官病变的最常见类型,因此,本研究采用冠状动脉粥样硬化患者外周静脉血 PBMC 对关键基因进行了验证。与非冠状动脉粥样硬化对照者相比,冠状动脉粥样硬化患者外周静脉血 PBMC 中 PRF1 和 GZMB 的 mRNA 表达水平显著降低,而 NKG7 和 CCL5 的 mRNA 表达水平显著升高。

PRF1 是一种从自然杀伤细胞和细胞毒性 T 淋巴细胞的细胞毒性颗粒中释放的孔形成毒素,在免疫反应期间,PRF1 被释放后聚集在靶细胞膜上并形成膜孔,以便于丝氨酸蛋白酶(颗粒酶)进入靶细胞从而引起细胞凋亡^[8-9]。本研究中 PRF1 的表达下调,同样 Chen 等^[10]的研究也发现并验证了急性心肌梗死患者外周血中 PRF1 的下调。NKG7 是一种新型的炎症介质,参与淋巴细胞毒性颗粒胞吐作用和下游炎症的调节,阻断 NKG7 的表达可能会是治疗炎症性疾病的新方法^[11]。NKG7 曾被鉴定为糖尿病相关动脉粥样硬化发生发展的关键基因^[12]。GZM 属于丝氨酸蛋白酶大家族,储存在自然杀伤细胞和细胞毒性 T 淋巴细胞的细胞毒性颗粒中,以便于与被细胞内病原体感染的细胞接触时快速释放^[13]。目前已发现 5 种(A、B、H、K 和 M)人 GZM,其中 GZMB 的细胞毒性能力最大^[14]。GZM 在心血管疾病的发病机制中发挥重要作用,尤其是 GZMB^[15],抑制 GZMB 可以减轻缺血缺氧诱导的血管内皮细胞损伤^[16],GZMB 抑制剂治疗可有效改善心肌梗死大鼠的心脏重塑和心脏功能^[17]。CCL5,又称 RANTES(激活时调节正常 T 细胞表达和分泌)属于 C-C 基序趋化因子配体家族,可表达于大多数炎症细胞,可以结合多种趋化因子受体,包括 CCR1、CCR3、CCR4 和 CCR5,其中对 CCR5 的亲合力最高^[18],CCR5-CCL5 参与循环单核细胞的募集^[19]。统计学研究发现,急性心肌梗死和稳定型心绞痛患者血浆 RANTES 水平升高,并在稳定型心绞痛患者中浓度最高,提示 RANTES 可能反映慢性冠状动脉疾病的存在^[20]。Jongstra-Bilen 等^[21]在富含胆固醇饮食喂养 3 周的 LDLR^{-/-}小鼠主动脉内膜中检测到 CCL5 mRNA 和蛋白表达水平显著升高。

综上所述,本研究通过生物信息学方法和 RT-

qPCR 的综合分析发现,PRF1、NKG7、GZMB 和 CCL5 是动脉粥样硬化患者血液转录组中的关键基因,可能在动脉粥样硬化疾病的诊断和评估中发挥作用。本研究虽然在临床样本上进行了验证,但样本量偏少且临床样本仅限于冠状动脉粥样硬化患者外周静脉血,缺乏对其他动脉受累患者的研究和分析,仍需要在大量临床样本和动物模型上进行验证。

[参考文献]

- [1] LI Y C, FENG Q X, WANG L Y, et al. Current targeting strategies and advanced nanoplatforams for atherosclerosis therapy[J]. *J Drug Target*, 2024, 32(2): 128-147.
- [2] 史张,刘崎,陆建平. 多功能纳米粒在动脉粥样硬化性疾病诊治中的研究进展[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2021, 29(10): 908-912.
SHI Z, LIU Q, LU J P. Study advances in multi-functional nanoparticles targeting diagnosis and treatment of atherosclerotic disease[J]. *Chin J Arterioscler*, 2021, 29(10): 908-912.
- [3] SINNAEVE P R, DONAHUE M P, GRASS P, et al. Gene expression patterns in peripheral blood correlate with the extent of coronary artery disease[J]. *PLoS One*, 2009, 4(9): e7037.
- [4] MASUD R, SHAMEER K, DHAR A, et al. Gene expression profiling of peripheral blood mononuclear cells in the setting of peripheral arterial disease[J]. *J Clin Bioinforma*, 2012, 2: 6.
- [5] RAVI S, SCHUCK R N, HILLIARD E, et al. Clinical evidence supports a protective role for CXCL5 in coronary artery disease[J]. *Am J Pathol*, 2017, 187(12): 2895-2911.
- [6] LIBBY P. Inflammation and the pathogenesis of atherosclerosis[J]. *Vascul Pharmacol*, 2024, 154: 107255.
- [7] 孟庆雯,刘华江,易泓汝,等. NLRP3 炎症小体在动脉粥样硬化中的作用机制和靶向炎症治疗的研究进展[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2024, 32(1): 79-86.
MENG Q W, LIU H J, YI H R, et al. Mechanisms of NLRP3 inflammasome in atherosclerosis and advances in targeted inflammatory therapy[J]. *Chin J Arterioscler*, 2024, 32(1): 79-86.
- [8] CHAUDHRY M S, GILMOUR K C, HOUSE I G, et al. Missense mutations in the perforin (PRF1) gene as a cause of hereditary cancer predisposition[J]. *Oncoimmunology*, 2016, 5(7): e1179415.
- [9] LOPEZ J A, SUSANTO O, JENKINS M R, et al. Perforin forms transient pores on the target cell plasma membrane to facilitate rapid access of granzymes during killer cell attack[J]. *Blood*, 2013, 121(14): 2659-2668.

- [10] CHEN J Q, YU L, ZHANG S W, et al. Network analysis-based approach for exploring the potential diagnostic biomarkers of acute myocardial infarction[J]. *Front Physiol*, 2016, 7: 615.
- [11] NG S S, DE LABASTIDA RIVERA F, YAN J M, et al. The NK cell granule protein NKG7 regulates cytotoxic granule exocytosis and inflammation[J]. *Nat Immunol*, 2020, 21(10): 1205-1218.
- [12] HUANG Q, DENG G X, WEI R G, et al. Comprehensive identification of key genes involved in development of diabetes mellitus-related atherogenesis using weighted gene correlation network analysis[J]. *Front Cardiovasc Med*, 2020, 7: 580573.
- [13] AYBAY E, RYU J, FU Z R, et al. Extended cleavage specificities of human granzymes A and K, two closely related enzymes with conserved but still poorly defined functions in T and NK cell-mediated immunity[J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1211295.
- [14] GARZÓN-TITUAÑA M, ARIAS M A, SIERRA-MONZÓN J L, et al. The multifaceted function of granzymes in sepsis: Some facts and a lot to discover[J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 1054.
- [15] ZEGLINSKI M R, GRANVILLE D J. Granzymes in cardiovascular injury and disease[J]. *Cell Signal*, 2020, 76: 109804.
- [16] YANG H, SU J J, MENG W X, et al. MiR-518a-5p targets GZMB to extenuate vascular endothelial cell injury induced by hypoxia-reoxygenation and thereby improves myocardial ischemia[J]. *Int Heart J*, 2021, 62(3): 658-665.
- [17] XU H C, WEI Z X, CHEN B X, et al. Granzyme B PET imaging inflammation and remodeling in myocardial infarction[J]. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2024, 51(4): 991-1001.
- [18] ZENG Z, LAN T X, WEI Y Q, et al. CCL5/CCR5 axis in human diseases and related treatments[J]. *Genes Dis*, 2022, 9(1): 12-27.
- [19] 肖素军, 赵明. 动脉粥样硬化与免疫[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2022, 30(4): 277-286.
- XIAO S J, ZHAO M. Atherosclerosis and immunity[J]. *Chin J Arterioscler*, 2022, 30(4): 277-286.
- [20] KOPER-LENKIEWICZ O M, KAMIŃSKA J, LISOWSKA A, et al. Factors associated with RANTES concentration in cardiovascular disease patients[J]. *Biomed Res Int*, 2019, 2019: 3026453.
- [21] JONGSTRA-BILEN J, TAI K, ALTHAGAFI M G, et al. Role of myeloid-derived chemokine CCL5/RANTES at an early stage of atherosclerosis[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2021, 156: 69-78.
- (此文编辑 文玉珊)

(上接第 668 页)

- [10] JUNG E S, CHOI H, SONG H, et al. p53-dependent SIRT6 expression protects Aβ42-induced DNA damage[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 25628.
- [11] GROOTAERT M O J, FINIGAN A, FIGG N L, et al. SIRT6 protects smooth muscle cells from senescence and reduces atherosclerosis[J]. *Circ Res*, 2021, 128(4): 474-491.
- [12] FAN Y Q, CHENG J, YANG Q, et al. SIRT6-mediated Nrf2/HO-1 activation alleviates angiotensin II-induced DNA DSBs and apoptosis in podocytes[J]. *Food Funct*, 2021, 12(17): 7867-7882.
- [13] MORSY M A, EL-DALY M, KAMEL B A, et al. Pregnenolone protects the liver against doxorubicin-induced cellular injury by anti-inflammatory, antioxidant, and antiapoptotic mechanisms: role of Keap1/Nrf2/HO-1 and P-glycoprotein[J]. *Eur Rev Med PharmacolSci*, 2023, 27(10): 4718-4734.
- [14] 黄勇, 李蔚华, 尹虹, 等. 氧化槐定碱通过 Nrf2/HO-1 通路抑制大鼠急性心肌梗死后心肌细胞凋亡[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2020, 28(3): 207-212.
- HUANG Y, LI W H, YIN H, et al. Study on oxysophoridine inhibiting cardiomyocyte apoptosis after acute myocardial infarction via Nrf2/HO-1 pathway in rats[J]. *Chin J Arterioscler*, 2020, 28(3): 207-212.
- [15] VASCONCELOS A R, DOS SANTOS N B, SCAVONE C, et al. Nrf2/ARE pathway modulation by dietary energy regulation in neurological disorders[J]. *Front Pharmacol*, 2019, 10: 33.
- [16] YANG Y J, TIAN T, WANG Y P, et al. SIRT6 protects vascular endothelial cells from angiotensin II-induced apoptosis and oxidative stress by promoting the activation of Nrf2/ARE signaling[J]. *Eur J Pharmacol*, 2019, 859: 172516.
- [17] WU K H, WANG Y Q, LIU R M, et al. The role of mammalian Sirtuin 6 in cardiovascular diseases and diabetes mellitus[J]. *Front Physiol*, 2023, 14: 1207133.
- [18] JI R, JIA F Y, CHEN X, et al. Salidroside alleviates oxidative stress and apoptosis via AMPK/Nrf2 pathway in DHT-induced human granulosa cell line KGN[J]. *Arch Biochem Biophys*, 2022, 715: 109094.
- (此文编辑 许雪梅)