

# 基于生物信息学筛选糖尿病视网膜病变进展中的关键基因

## Screening Key Genes in the Progression of Diabetic Retinopathy Based on Bioinformatics

张慧仪 崔秀成\*

Huiyi Zhang Xiucheng Cui\*

承德医学院附属医院眼科 中国·河北承德 067000

Department of Ophthalmology, Affiliated Hospital of Chengde Medical University, Chengde, Hebei, 067000, China

**摘要:** 目的: 通过生物信息学分析的方法, 筛选糖尿病视网膜病变 (Diabetic retinopathy, DR) 中的关键基因, 探索新的治疗靶点。方法: 通过 GEO 数据库检索 DR 相关的 mRNA 芯片数据, 利用 R 包分析差异表达基因 (DEG), 然后进行富集分析以及构建蛋白质-蛋白质相互作用网络。结果: 共筛选得到了 415 个 DEG, 包括上调基因 21 个, 下调基因 394 个。PPI 网络分析得到包含 402 个节点和 146 条连线的网络图。利用 Cytoscape 软件可以筛选得到 RHO、GNAT1、RDH10、PDE6B、GNAT2、PDE6A、PDE6G、TYR、GNGT1、RGS9BP 这 10 个核心基因。结论: 获得 DR 的差异表达基因、核心基因及 PPI 网络图, 将为 DR 的治疗提供潜在的靶点。

**Abstract: Objective:** To screen key genes in Diabetic retinopathy (DR) and explore new therapeutic targets by means of bioinformatics analysis. **Methods:** The DR-related mRNA microarray data were retrieved from GEO database, and differentially expressed genes (DEGs) were analyzed using R packets, then enrichment analysis was performed and protein-protein interaction network was constructed. **Results:** A total of 415 DeGs were screened, including 21 up-regulated genes and 394 down-regulated genes. PPI network analysis results in a network diagram containing 402 nodes and 146 connections. Cytoscape software was used to select RHO, GNAT1, RDH10, PDE6B, GNAT2, PDE6A, PDE6G, TYR, GNGT1 and RGS9BP. **Conclusion:** The differential expression genes, core genes and PPI network map of DR Can provide potential targets for the treatment of DR.

**关键词:** 糖尿病视网膜病; GEO 数据库; 微血管病变

**Keywords:** diabetic retinopathy; GEO database; microangiopathy

**DOI:** 10.12346/pmr.v4i5.7482

## 1 引言

随着全球经济的发展和人们生活水平的提高, 罹患糖尿病的人数激增。DR 是糖尿病最常见的微血管并发症之一, 大约 2/3 的糖尿病患者会出现眼底的病理性改变<sup>[1]</sup>。视网膜微血管的病变会引起毛细血管的闭塞, 从而引起缺血缺氧, 进一步引起眼底血管的渗漏<sup>[2]</sup>。到了晚期, 可引起病人视力的完全丧失。目前, 关于 DR 的发病机制还未明确阐述, 需进一步的探索和研究。

生物信息学是一门整合了多个学科知识的新兴学科, 为医学疾病的研究提供发了新的思路 and 方向<sup>[3]</sup>。基因芯片是目前生物信息学中最常用的工具之一, 通过将成千上万的核酸探针固

定在芯片上, 可以一次性地检测大量基因的表达情况<sup>[4]</sup>。关于糖尿病视网膜病变的生物信息学分析较少, 因此, 笔者在本研究中比较了 DR 患者增殖膜和正常人视网膜之间的差异基因表达的基因, 筛选可能在 DR 发病过程中发挥功能的关键基因, 为寻找 DR 的差异基因和治疗靶点提供思路。

## 2 材料和方法

打开 GEO 数据库 (www.ncbi.nlm.nih.gov/geo), 检索 “diabetic retinopathy”, 须符合满足以下两个条件<sup>[5]</sup>: ①种属: Homo sapiens。②同时具备正常视网膜组织和 DR 患者的视网膜组织。经过检索和筛选得到数据集 GSE60436 数据芯片

【作者简介】张慧仪 (1996-), 女, 中国河南新乡人, 在读硕士, 从事眼底病研究。

【通讯作者】崔秀成 (1964-), 男, 中国河北承德人, 主任医师, 从事白内障、玻璃体及视网膜疾病研究。

1 张。包含 3 个正常对照组标本和 6 个糖尿病视网膜膜病患者的病例组标本。

### 2.1 数据的处理及差异表达基因 (Differentially expressed gene, DEG) 的筛选

利用 R 语言对 DR 和正常组数据进行分析, 得到差异表达基因 (DEGs), 其中以  $|\log_2FC| \geq 2$ 、 $p < 0.05$  为截取标准用于差异表达基因的筛选, 采用 R 语言绘制 DEG 的火山图以及热图。

### 2.2 DEG 的功能注释 (GO) 富集和京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路分析

功能富集分析和京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路富集分析主要用于高通量基因组或转录组数据鉴定的生物学机制, 包括分子功能 (MF)、生物学过程 (BP) 和细胞组分 (CC) 三个部分。利用 R 语言的 “clusterProfile” 富集分析包括对糖尿病视网膜病的差异基因进行 GO 功能富集分析和 KEGG 通路富集分析。

### 2.3 蛋白质-蛋白质相互作用网络 (protein-protein intertein network,PPI) 构建与核心基因 (hub gene) 的筛选

在 STRING 网站中分析得到的差异基因, 构建 PPI 网络图, 把所有差异基因导入 STRING 线上数据库中, 进行蛋白相互作用分析, 将 STRING 数据导入 Cytoscape 软件中进行构图。

## 3 结果

### 3.1 DEG 筛选

从 GSE60436 中, 以  $|\log_2FC| \geq 2$ 、 $p < 0.05$  为筛选标准得到差异基因, 得到了 415 个差异基因, 其中包括 21 个上调的基因和 394 个下调的基因。对 DEGs 进行分析, 利用 R 语言将筛选结果绘制成热图和火山图, 见图 1、图 2。

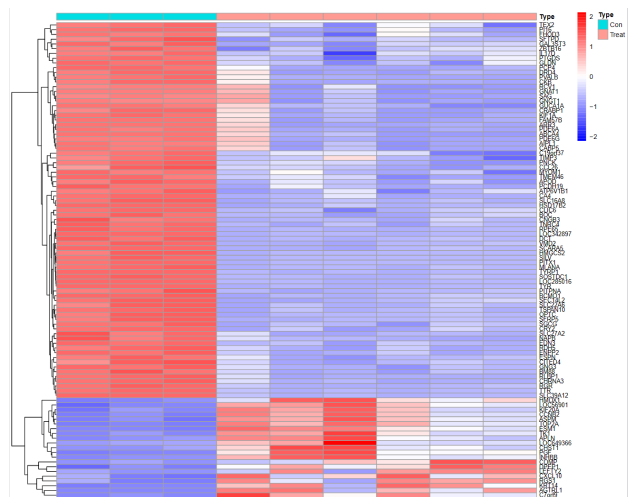


图 1 差异基因热图

注: Con: 正常对照组样本; Treat: DR 样本。红色基因高表达; 蓝色基因低表达。

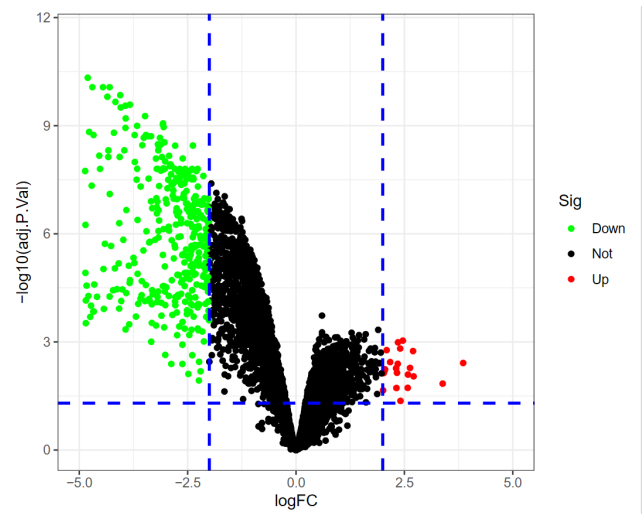


图 2 差异基因火山图

### 3.2 GO 和 KEGG 富集通路分析

将差异基因输入 DAVID 网站进行在线分析, 结果可分为生物过程组、细胞组和分子功能组。BP 主要富集在视觉感知, 光的感官知觉刺激, 眼睛发育等; CC 主要富集在感光细胞纤毛、光感受器内外段, 感光器内外段等; MF 主要富集在 GMP 结合、视黄醇结合、视网膜结合等; KEGG 主要富集在光传导、近端小管碳酸氢盐回收、精氨酸和脯氨酸代谢、胆碱能突触、视黄醇代谢等, 见图 3、图 4。

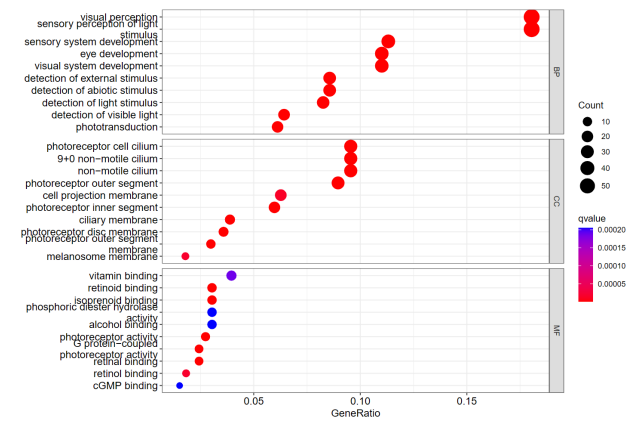


图 3 差异基因的 GO 功能分析

### 3.3 PPI 网络构建与核心基因筛选

将差异基因导入 STRING 网站, 利用 STRING 在线工具对 415 个差异表达基因进行 PPI 构建, 最低置信度为  $> 0.9$  (“minimum required interaction score  $> 0.9$ ”) 得到了由 402 个节点、146 条连线构成的网络图, 见图 5。

通过 Cytoscape 软件的 CytoHubba 插件筛选出连接度 (Degree) 排名前 10 的 hub 基因, 分别为 RHO、GNAT1、RDH10、PDE6B、GNAT2、PDE6A、PDE6G、TYR、RGS9BP、GNGT1, 见图 6。

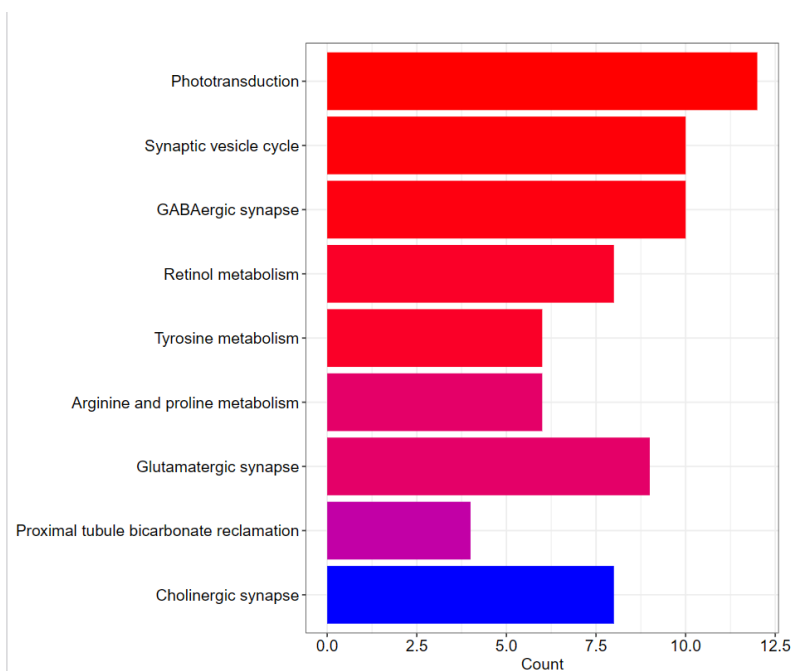


图 4 差异基因的 KEGG 功能分析

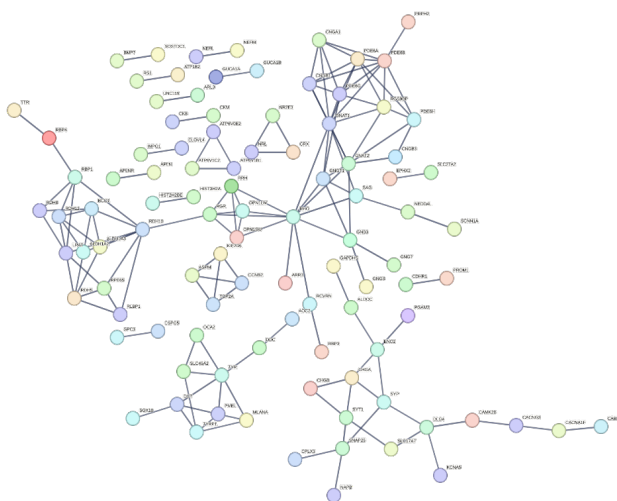


图 5 显著差异基因的 PPI 网络

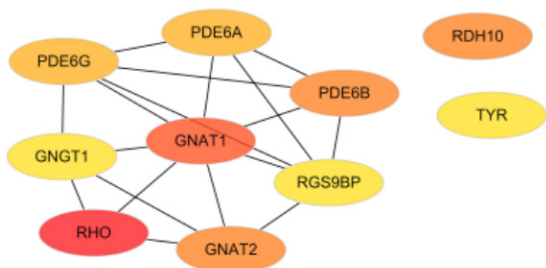


图 6 排名前 10 的关键基因网络

## 4 讨论

DR 是糖尿病患者最常见的微血管并发症，是成人致

盲的主要原因<sup>[6]</sup>。在本次研究中，笔者筛选出 21 个上调的 DEG 和 394 个下调 DEG，对其进行功能和通路的富集分析及 PPI 网络的构建，同时得到了 10 个核心基因。通过对相关文献的阅读与查阅，关于基因 GNAT1、GNAT2、PDE6A、TYR、RGS9BP 与 DR 的关系尚未有进一步的研究与进展。以下对基因 RHO、RDH10、PDE6B、PDE6G、GNGT1 与 DR 的关系做简单介绍。

Rho 亚家族属于 Ras 超家族，具有 GTPase 活性。它作为分子开关从失活状态（与 GDP 结合）到激活状态（与 GTP 结合）<sup>[7]</sup>。Rho-associated kinases (ROCK) 是丝氨酸-苏氨酸家族中最重要的效应分子，参与 Rho GTP 结合蛋白的下游信号转导。陈等研究发现<sup>[8]</sup>，高血糖环境可以诱导 Rho/ROCK 的活化，活化的 ROCK 上调 TNF- $\alpha$ 、ICAM-1 的表达，增加白细胞黏附，引发一系列的炎症反应<sup>[9]</sup>，从而加重 DR 的发展过程。

Al-Hussaini H 等人的实验证明<sup>[10]</sup>，糖尿病可抑制维 A 酸代谢通路基因 RDH10 的表达，糖尿病大鼠 RPE 细胞的芯片分析显示，与对照组相比，糖尿病大鼠视网膜中 RDH10 表达下调，反式白藜芦醇可恢复糖尿病引起的大鼠 RPE 细胞中 RDH10 蛋白的增加。

丙酮酸激酶 M2 亚型 (PKM2) 可通过调节磷酸二酯酶 6 $\beta$  (PDE6B) 来调节视觉功能，该酶可参与调节光感受器的功能<sup>[11]</sup>。DR 中 PDE6B 的表达水平降低，db/db 小鼠杆状光感受器功能也出现了下降的趋势。

章等人通过对 GEO 数据库芯片的分析发现在 DR 中，视觉感知相关基因 PDE6G 上调，MALAT1 可能通过 miR-125b-5p 调控 PDE6G 在 DR 中发挥作用<sup>[12]</sup>。此外，LI X 的

实验表明, lncRNA MALAT1 通过 miR-378a-3p 上调 PDE6G 促进糖尿病视网膜病变, MALAT1/miR-378a-3p/PDE6G 信号轴可能是 DR 治疗的潜在靶点<sup>[13]</sup>。

在 PIGF 敲除的糖尿病小鼠中<sup>[14]</sup>, 参与胰岛素抵抗通路的蛋白 GNGT1 显著下调。胰岛素抵抗必需蛋白的下调突出并概括了未来抗 PIGF 治疗 DR 的重要潜在机制。

本研究筛选出了 DR 的差异基因与关键基因, 但对于差异基因的功能以及其相关通路的联系并未进一步探讨。RHO、GNAT1、RDH10、PDE6B、GNAT2、PDE6A、PDE6G、TYR、RGS9BP、GNGT1 为筛选出的关键基因, 可为 DR 的研究提供一个新的方向。

### 参考文献

- [1] TEO Z L, THAM Y C, YU M, et al. Global Prevalence of Diabetic Retinopathy and Projection of Burden through 2045: Systematic Review and Meta-analysis[J]. *Ophthalmology*,2021,128(11):1580-1591.
- [2] HAMMES H P. Diabetic retinopathy: hyperglycaemia, oxidative stress and beyond[J]. *Diabetologia*,2018,61(1):29-38.
- [3] TORO-DOMINGUEZ D, MARTORELL-MARUGAN J, LOPEZ-DOMINGUEZ R, et al. ImaGEO: integrative gene expression meta-analysis from GEO database[J]. *Bioinformatics*,2019,35(5):880-882.
- [4] YIN G, BIE S, GU H, et al. Application of gene chip technology in the diagnostic and drug resistance detection of *Helicobacter pylori* in children[J]. *J Gastroenterol Hepatol*,2020,35(8):1331-1339.
- [5] BENISCH P, SCHILLING T, KLEIN-HITPASS L, et al. The transcriptional profile of mesenchymal stem cell populations in primary osteoporosis is distinct and shows overexpression of osteogenic inhibitors[J]. *PLoS One*,2012,7(9):45142.
- [6] ANTONETTI D A, SILVA P S, STITT A W. Current understanding of the molecular and cellular pathology of diabetic retinopathy[J]. *Nat Rev Endocrinol*,2021,17(4):195-206.
- [7] MATEOS-OLIVARES M, GARCIA-ONRUBIA L, VALENTIN-BRAVO F J, et al. Rho-Kinase Inhibitors for the Treatment of Refractory Diabetic Macular Oedema[J]. *Cells*, 2021,10(7).
- [8] 陈曦,史运迪,铁璐.Rho激酶(ROCK)在糖尿病并发症中的研究[J].*生理科学进展*,2015,46(6): 433-438.
- [9] 陈珍,俞颂平,李俊,等.七叶皂苷钠对糖尿病模型大鼠血-视网膜屏障损伤的保护作用及机制研究[J].*浙江中西医结合杂志*,2019,29(7): 530-533.
- [10] AL-HUSSAINI H, KITTANEH R S, KILARKAJE N. Effects of trans-resveratrol on type 1 diabetes-induced up-regulation of apoptosis and mitogen-activated protein kinase signaling in retinal pigment epithelium of Dark Agouti rats[J]. *Eur J Pharmacol*,2021(904):174167.
- [11] RAJALA A, SONI K, RAJALA R. Metabolic and Non-metabolic Roles of Pyruvate Kinase M2 Isoform in Diabetic Retinopathy[J]. *Sci Rep*,2020,10(1):7456.
- [12] 章余兰.长链非编码RNA MALAT1在糖尿病视网膜神经退行性变中的作用研究[D].南昌:南昌大学,2019.
- [13] LI X. lncRNA MALAT1 promotes diabetic retinopathy by upregulating PDE6G via miR-378a-3p[J]. *Arch Physiol Biochem*,2021:1-9.
- [14] SADDALA M S, LENNIKOV A, GRAB D J, et al. Proteomics reveals ablation of PIGF increases antioxidant and neuroprotective proteins in the diabetic mouse retina[J]. *Sci Rep*,2018,8(1):16728.