DOI:10.13210/j.cnki.jhmu.20210609.001
网络出版地址:https://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1049.R.20210609.0915.002.html

基于生物信息学的银屑病基因集富集及免疫细胞浸润分析

周 扬[1],韩 露[1],方如男[1],赵 艳[2],郭 杨[2],翟 烨[2],李 萍[3],李建红[2]✉
(1.北京中医药大学,北京 100029;2.北京中医药大学东直门医院,北京 100700;3.北京中医医院,北京 100010)

[摘要] **目的**:基于生物信息学对银屑病表达谱芯片数据进行基因集富集分析(GSEA)和免疫细胞浸润分析,以更深入了解银屑病的发病机制。**方法**:从GEO数据库中获取GSE6710芯片数据,利用GSEA软件进行基因本体论(GO)和京都基因与基因组百科全书(KEGG)富集分析;CIBERSOFT官网下载22种免疫细胞基因表达矩阵及R包,运用R软件获取免疫细胞浸润矩阵并绘制相关图形。**结果**:与细胞增殖、先天免疫相关的通路在银屑病皮损组高表达,一些癌症相关通路在银屑病皮损组高表达。免疫细胞浸润分析显示活化的记忆T细胞、滤泡辅助性T细胞、M0巨噬细胞、活化的树突状细胞在银屑病皮损组中上调,未活化的肥大细胞在银屑病皮损组下调。活化的树突状细胞与滤泡辅助性T细胞呈正相关,活化的肥大细胞与M0巨噬细胞呈正相关。未活化的肥大细胞和活化的记忆T细胞呈负相关,M1巨噬细胞与调节性T细胞呈负相关,M0巨噬细胞和未活化的肥大细胞呈负相关。**结论**:细胞增殖与先天免疫在银屑病的发病中具有重要意义;免疫细胞浸润分析与目前银屑病发病模型大致符合,巨噬细胞和肥大细胞在银屑病发病中也起着一定作用。

[关键词] 银屑病;基因集富集分析;免疫浸润;细胞增殖;先天免疫
[中图分类号] R758.63 [文献标识码] A [文章编号] 1007-1237(2021)21-1652-07

Bioinformatics-based gene set enrichment and immune cell infiltration analysis of psoriasis

ZHOU Yang[1], HAN Lu[1], FANG Ru-nan[1], ZHAO Yan[2], GUO Yang[2], ZHAI Ye[2], LI Ping[3], LI Jian-hong[2]✉
(1. *Beijing University of Traditional Chinese Medicine*, *Beijing* 100029, *China*; 2. *Dongzhimen Hospital Affiliation to Beijing University of Traditional Chinese Medicine*, *Beijing* 100700, *China*; 3. *Beijing Chinese Medicine Hospital*, *Beijing* 10010, *China*)

[*Foundation Project*]: *This study was supported by Beijing Key Laboratory of Clinical Basic Research on Psoriasis of Traditional Chinese Medicine* (*BZ*0375-*KF*201602)

[*Author*]: *ZHOU Yang*, *E-mail*: 105310999@qq.com.
[*Correspondence to*]: *LI Jian-hong*, *Ph.D.*, *Chief Physician*, *E-mail*: *ymszd*0701@163.com.

Received: 2021-01-06 *Revised*: 2021-06-04 *JHMU*, 2021;27(21):1652-1658

View from specialist: It is creative, and of certain scientific and educational value.

[ABSTRACT] **Objective**: To further understand the pathogenesis of psoriasis based on bioinformatics, gene set enrichment analysis (GSEA) and immune infiltration analysis were carried out on the microarray data of psoriasis expression profile. **Methods**: GSE6710 chip data were obtained from gene expression database (GEO), and gene ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) enrichment analysis were performed using GSEA software. A total of 22 kinds of immune cell gene expression matrices and R packages were downloaded from CIBERSOFT official website, and the immune cell infiltration matrix was obtained by R software and related graphs were drawn. **Results**: The pathways related to cell proliferation and innate immunity were highly expressed in psoriatic lesions, and some cancer-related pathways were highly expressed in psoriatic lesions. Immunized cell infiltration analysis showed that activated memory T cells, follicular helper T cells, M0 macrophages and activated dendritic cells were up-regulated in the psoriatic skin lesion group, and inactive mast cells were down-regulated in the psoriatic skin lesion group. Activated dendritic cells were positively correlated with follicular helper T cells, activated mast cells were positively correlated with M0 macrophages. Inactivated mast cells were negatively correlated with activated memory T cells, M1 macro-

[基金项目] 银屑病中医临床基础研究北京市重点实验室(BZ0375-KF201602)
[作者简介] 周扬,E-mail:105310999@qq.com。
[通讯作者] 李建红,博士,主任医师,E-mail:ymszd0701@163.com。
[收稿日期] 2021-01-06 [修回日期] 2021-06-04 网络出版时间:2021-06-09 10:14:46

phages were negatively correlated with regulatory T cells, M0 macrophages were negatively correlated with inactive mast cells. **Conclusion**: Cell proliferation and innate immunity are of great significance in the pathogenesis of psoriasis. Immune cell infiltration analysis is generally consistent with the current psoriasis pathogenesis model. Macrophages and mast cells also play a certain role in psoriasis.

[**KEYWORDS**] Psoriasis; Gene Set Enrichment Analysis; Immune infiltration; Cell proliferation; Maternal immunity

银屑病(Psoriasis)是一种遗传与环境共同作用的免疫介导的慢性、复发性、炎症性、系统性疾病,发病机制目前尚不完全清楚[1]。银屑病易于复发、影响美观、可伴发代谢综合征等系统性疾病,严重影响了患者的生活质量。对银屑病有效治疗靶点的探索一直是皮肤科领域研究的热点和重点。

近年来,生物信息学越来越多的应用于包括银屑病在内的自身免疫相关的疾病的发病机制研究。有研究者对筛选出的银屑病差异基因进行了基因本体论(Gene Ontology,GO)和京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of genes and Genomes,KEGG)富集研究,然而这种方法可能会遗漏某些差异不显著但功能重要的基因[2]。目前对于免疫细胞的研究也局限于T淋巴细胞、肥大细胞等几个种类,尚需全面系统的揭示参与银屑病发病的多种免疫细胞的浸润和作用机制。

本研究应用基因集富集分析(Gene Set Enrichment Analysis,GSEA)进行全基因组表达分析,根据基因表达与类别之间的相关性对基因进行排名,筛选出在银屑病中上调的基因集和通路[3]。同时,利用CIBERSOFT反卷积算法进行22种免疫细胞浸润分析,分析银屑病中各类免疫细胞之间的相互作用,以期更深入的研究银屑病的发病机制,为临床治疗提供新靶点。

1 材料与方法

1.1 基因芯片数据

从基因表达数据库(Gene expression omnibus,GEO,https://www.ncbi.nlm.nih.gov/)下载编号为GSE6710,平台为GPL96[(HG-U133A) Affymetrix Human Genome U133A Array]的芯片数据集和注释文件。该研究包含26个样品,来自于13位寻常型银屑病患者的皮损和非皮损活检样本。

1.2 GSEA分析

从GSEA官网(https://www.gsea-msigdb.org/gsea/index.jsp)下载GSEA(GSEA_4.0.3)软件及c5.all.v7.0.symbol.gmt和c2.cp.kegg.v7.0.symbols.gmt文件,使用GSEA软件对芯片数据矩阵分别进行1 000次模拟分析,获取GO和KEGG富集分析结果。

1.3 免疫细胞浸润矩阵

对来自GEO数据的芯片数据进行分组,使用R软件"Bioconductor-limma"包进行数据矫正。从CIBERSOFT官网(https://cibersort.stanford.edu/)下载22种免疫细胞基因表达矩阵及R包,使用R软件(https://www.r-project.org/ R_3.6.3)"e1071"包获取免疫细胞浸润矩阵。运用Perl脚本,筛选$P<0.05$的可信样本,获得新的过滤后的免疫细胞浸润矩阵。

1.4 样本聚类评价

使用R软件进行主成分分析,对过滤后的免疫细胞浸润矩阵数据进行降维处理,并通过R软件"ggplot2"包获取主成分分析图像。

1.5 免疫细胞浸润评估

使用R软件绘制柱状图、热图、共表达热图、小提琴图、成对差异图,用以分析免疫细胞浸润分布差异及其相关性。

2 结果

2.1 GSEA分析

在GO富集分析中,共2 616个基因集在银屑病皮损中上调,其中526个基因集FDR<25%,558个基因集P值<0.05,见图1A。主要富集于核分裂的调节(regulation of unclear division)、染色体分离(chromosome segregation)等细胞增殖相关过程和细胞质模式识别受体信号通路(cytoplasmic pattern recognition receptor signaling pathway)、天然免疫反应的激活(activation of innate immune response)等免疫相关过程。表1展示了在银屑病皮损中上调的归一化富集分数(Normalized Enrichment Score,NES)排名前20的基因集。

在KEGG富集中,共95条通路在银屑病皮损中上调,其中20条通路FDR<25%,21条通路P值<0.05,见图1B。主要富集于细胞周期(cell cycle)、亚油酸代谢(Linoleic acid metabolism)、嘧啶代谢(Pyrimidine metabolism)等细胞增殖相关过程和Nod样受体信号通路(Nod like receptor signaling pathway)、RIG-Ⅰ样受体信号通路(RIG-Ⅰ like receptor signaling pathway)、Toll样受体信号通路(Toll like receptor signaling pathway)等免疫相关过程以及P53信号通路(P53 signaling pathway)、膀胱癌

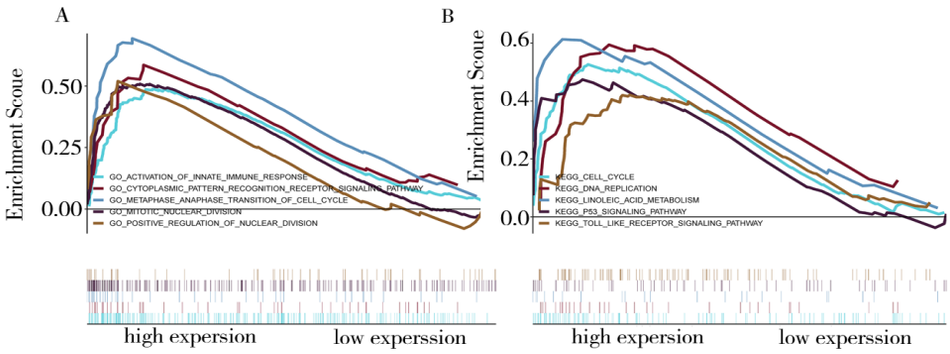


图1　银屑病基因表达矩阵的GSEA

Fig 1　GSEA of gene expression matrix of scurf disease

(Bladder cancer)等癌症相关通路。表2展示了在银屑病皮损中上调的NES排名前20的通路。

表1　GO富集分析NES前20的基因集

Tab 1　GO enrichment analysis of the top 20 gene sets of NES

名称	NES	NOM p-val	FDR q-val
核分裂的调节	2.046	0	0.248
纺锤体微管	2.042	0	0.132
核分裂的正调节	2.032	0	0.103
细胞质模式识别受体信号通路	2.024	0.004	0.090
纺锤体微管与着丝粒的附着	2.007	0	0.085
染色体分离	2.007	0	0.073
染色体分离的调节	2.002	0	0.067
色素颗粒定位	1.997	0	0.062
天然免疫反应的激活	1.993	0	0.059
有丝分裂	1.978	0	0.055
姐妹染色单体分离的调节	1.975	0	0.054
姐妹染色单体分离	1.963	0	0.060
细胞周期的中期后期过渡	1.961	0	0.057
参与有丝分裂的微管细胞骨架组织	1.961	0	0.054
有丝分裂的正调控	1.961	0	0.051
有丝分裂姊妹染色单体分离	1.959	0	0.049
色素颗粒定位的建立	1.950	0	0.053
先天性免疫应答的调节	1.938	0	0.058
核染色体分离	1.936	0	0.057
雌性减数分裂核分裂	1.934	0	0.056

表2　KEGG富集分析NES前20的基因集

Tab 2　KEGG enrichment analysis of the top 20 gene sets of NES

名称	NES	NOM p-val	FDR q-val
细胞周期	1.873	0.002	0.137
nod样受体信号通路	1.783	0.002	0.196
卵母细胞减数分裂	1.763	0.002	0.162
胞质DNA传感通路	1.741	0.002	0.153
p53信号通路	1.721	0.004	0.145
泛素介导的蛋白水解	1.703	0.006	0.143
RIG-I受体信号通路	1.698	0.006	0.130
亚油酸代谢	1.664	0.000	0.154
幽门螺杆菌感染中的上皮细胞信号通路	1.643	0.008	0.163
碱基切除修复	1.643	0.008	0.148
氨基酰tRNA生物合成	1.641	0.033	0.136
嘧啶代谢	1.615	0.023	0.157
DNA复制	1.601	0.038	0.161
蛋白酶体	1.551	0.068	0.217
原发免疫缺陷	1.548	0.046	0.208
半胱氨酸和蛋氨酸代谢	1.543	0.034	0.202
孕酮介导的卵母细胞成熟	1.525	0.039	0.213
乙醚脂质代谢	1.523	0.018	0.205
膀胱癌	1.493	0.041	0.236
Toll样受体信号通路	1.487	0.033	0.231

2.2　免疫细胞浸润分析

经Perl脚本$P<0.05$的筛选后，获得包含26个可信样本的免疫细胞浸润矩阵。对22种免疫细胞的浸润矩阵的主成分分析显示银屑病皮损样本和非皮损样本组间差异明显，样本来源可靠，能够区分银屑病皮损组和非皮损组，见图2。

2.3　免疫细胞浸润分布及组间差异分析

图3A、B的热图、柱状图显示了22种免疫细胞在不同样本中浸润分布差异，前13组为银屑病非皮损组样本，后13组为银屑病皮损组样本。图3C为22种免疫细胞的组间浸润差异小提琴图，蓝色为非

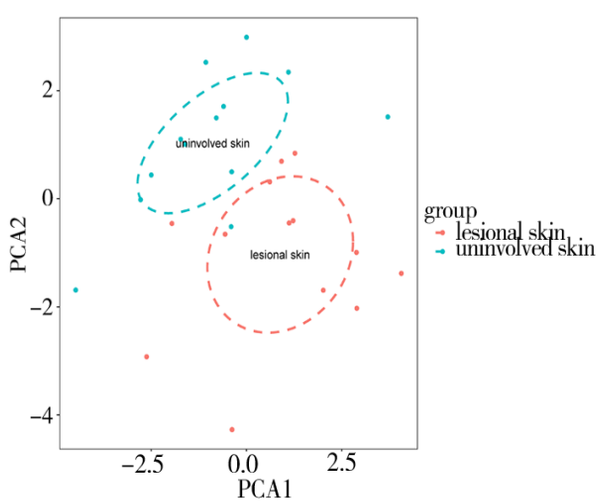


图2　二维PCA聚类图

Fig 2　Two dimensional PCA clustering diagram

皮损组，红色为银屑病皮损组。如图3C所示22种免疫细胞中组间浸润显著（$P<0.05$）的有5种。其中活化的记忆T细胞（T cells CD4 memory activated，TM）、滤泡辅助性T细胞（T cells follicular helper，Tfh）、M0巨噬细胞、活化的树突状细胞在银屑病皮损组中上调，未活化的肥大细胞在银屑病皮损组中下调。图3D为以上5种组间浸润差异显著的免疫细胞在来源于同一个体的样本中的成对差异分析图。

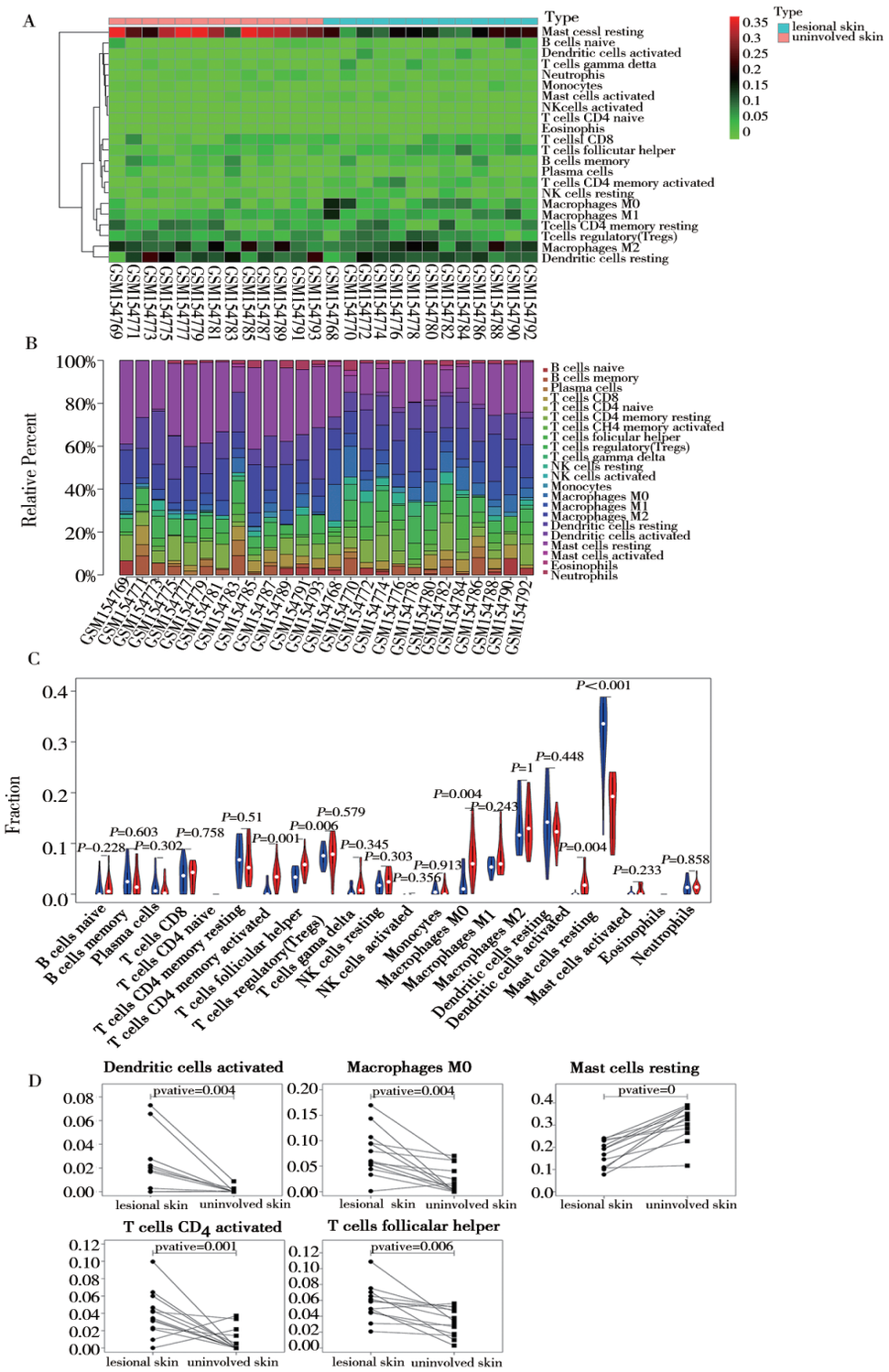


图3　银屑病皮损组与非皮损组免疫细胞浸润差异

Fig 3　The difference of immune cell infiltration between lesional and non lesional psoriasis

2.4　免疫细胞相关性分析

活化的树突状细胞与Tfh呈正相关(r=0.59)，活化的肥大细胞与M0巨噬细胞呈正相关(r=0.67)。未活化的肥大细胞和活化的记忆T细胞TM呈负相关(r=−0.64)，M1巨噬细胞与调节性T细胞(T cells regulatory，Treg)呈负相关(r=−0.63)，M0巨噬细胞和未活化的肥大细胞呈负相关(r=−0.58)。见图4。

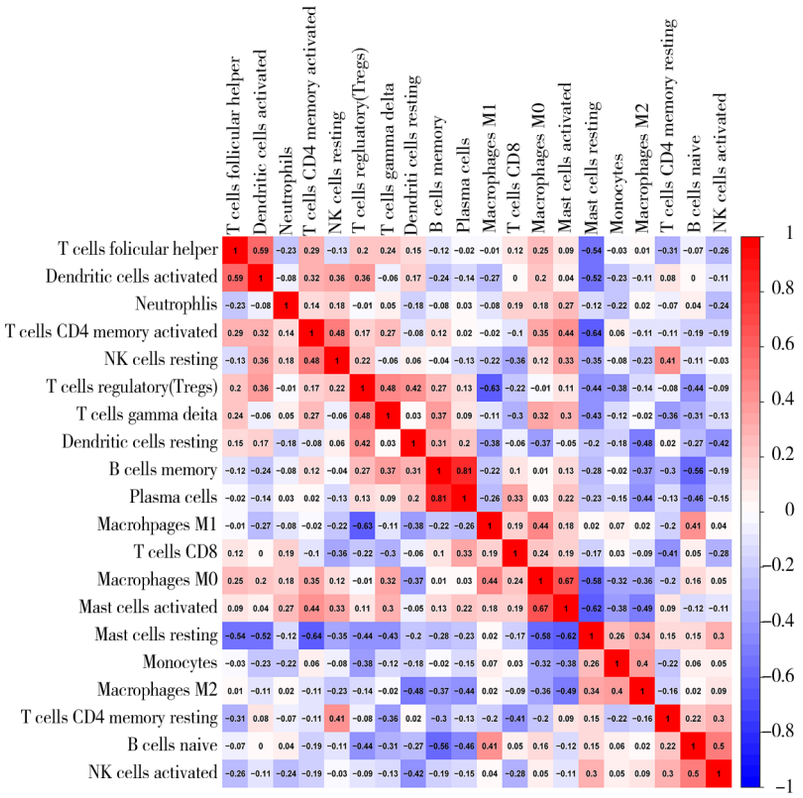


图4　免疫细胞相关性分析

Fig 4　Correlation analysis of immune cells

3　讨论

在GO富集分析中，核分裂、染色体分离等与细胞有丝分裂功能相关的基因集在银屑病皮损中显著上调，细胞增殖活跃。在KEGG富集分析中，涉及DNA复制、核苷酸代谢、蛋白质代谢、脂质代谢的信号通路在银屑病皮损中显著上调，为细胞增殖提供了能量供应和物质储备。角质细胞的过度增殖是银屑病的基本病理特征之一。在现有的发病机制的模型中，角质细胞在疾病触发早期和疾病慢性期方面起着至关重要的作用，当皮肤环境改变时，受损的角质细胞释放的抗菌肽与自身遗传物质结合形成复合物，进而激活树突状细胞开启适应性免疫，放大了局部免疫反应，在这种炎症环境中，IL17、TNF-α、IFN-γ等细胞因子又激活了角质细胞的增殖[4]。角质细胞的增殖在银屑病中的意义并不仅限于此，有研究发现，银屑病角质细胞中47.3%的上调基因与细胞因子的诱导信号无重叠，这表明银屑病表皮可能存在不依赖于炎性细胞因子环境的内在变化[5]。因此，抑制角质细胞的过度增殖，减少细胞增殖所必需的能量供应和物质储备，或许可以成为银屑病治疗的一种新思路。Zhang等[6]通过删除小鼠模型中角质细胞中的葡萄糖转运蛋白1，显著抑制了小鼠模型的皮肤增厚和炎症反应。这种通过抑制细胞代谢从而抑制细胞增殖的方法在肿瘤的研究中应用颇多，主要集中于PI3K-AKT信号通路。银屑病与肿瘤存在着细胞过度增殖的相似性，且抑制细胞的能量供应亦能有效减轻银屑病皮肤增殖和炎症反应，对于银屑病角质细胞增殖与细胞代谢的研究，应该进行更加深入的研究。

Nod样受体、RIG-Ⅰ样受体、Toll样受体均为模式识别受体，在先天免疫中起着识别病原体和内源性细胞应激信号的作用，从而激活NF-κB、MAPK

等信号通路,促进炎症细胞因子的转录,进而介导免疫反应[7,8]。因此这些模式识别受体信号通路的的负调控对于银屑病的治疗具有重要意义。众所周知,P53是一种抑癌基因,具有诱导细胞凋亡的作用,本研究显示,P53在银屑病皮损组上调,结果与大多数研究相一致[9-11]。P53在银屑病皮肤中的表达可能是角质形成细胞过度增殖所诱导的野生型蛋白,是一种对抗过度增殖的保护机制,只不过这种保护机制可能不足以减弱过度增殖状态[12]。除诱导凋亡外,P53也具有抗凋亡的功能,P53可以靶向促生存的*Bcl-2*基因的miR-34,因此P53信号不应被视为单纯的诱导凋亡[13]。

本研究得到的Tfh、Th和活化的树突状细胞在银屑病皮损中上调,活化的树突状细胞与Th呈正相关的结果与现有银屑病发病模型基本符合,即抗原激活树突状细胞后,树突状细胞对其进行处理提呈,激活Th,分泌炎性细胞因子维持炎症环境,而这种炎症环境又促进了TM的增殖[14,15]。然而关于巨噬细胞和肥大细胞,仍需进一步讨论。在本研究中,M0巨噬细胞在银屑病皮损组上调,M1巨噬细胞与Treg呈负相关。巨噬细胞分为M0、M1、M2三种表型,M0巨噬细胞为未经激活的幼稚的巨噬细胞,M0巨噬细胞收到M1或M2特异性信号则会被激活为M1巨噬细胞或M2巨噬细胞[16]。一般来说,M1巨噬细胞的作用是介导炎症和细胞/组织损伤,M2巨噬细胞则调节银屑病的抗炎和修复[17]。

本研究结果显示,未活化的肥大细胞在银屑病皮损组下调,而活化的肥大细胞却未在皮损组上调。肥大细胞在许多皮肤病中是瘙痒的介导物,有研究表明,P物质在银屑病斑块中表达增加,而P物质在精神紧张的情况下可以导致肥大细胞脱颗粒,进而出现瘙痒[18,19]。正常皮肤中不会出现皮肤瘙痒,因而肥大细胞的活化程度较低,而在银屑病皮损中,有部分患者会出现皮肤瘙痒,但并不具有普遍性,这可能是未活化的肥大细胞在银屑病皮损组下调,而活化的肥大细胞却未在皮损组上调的原因。

本研究利用生物信息学技术对银屑病的表达谱芯片进行了GSEA及免疫细胞浸润分析,得到了细胞增殖、免疫及癌症相关通路在银屑病中起到重要作用;免疫细胞浸润与目前银屑病发病模型大体符合,巨噬细胞和肥大细胞在银屑病中也起着一定程度的作用的结论。本研究进一步揭示了细胞增殖与免疫细胞在银屑病发病中的重要作用,为银屑病的临床治疗及药物研究提供新的思路。但本研究是根据GEO数据库中现有的研究数据进行的预测,其中可能会有假阳性或假阴性结论,研究结果尚待进一步实验验证。

作者贡献度说明:

李建红:提供本文思路;李萍:提供本文指导;周扬:撰写论文;周扬、韩露、方如男:共同完成论文相关数据资料的获取和处理;赵艳、郭杨、翟烨:协助完成数据分析和讨论。

参考文献

1 中华医学会皮肤性病学分会银屑病专业委员会.中国银屑病诊疗指南(2018简版)[J].中华皮肤科杂志,2019,52(4):223-230.

2 刘萌,段琪琪,王敏,等.基于生物信息学分析探究银屑病关键基因和通路[J].中国皮肤性病学杂志,2019,33(11):1232-1238.

3 Jain A, Tuteja G. TissueEnrich: Tissue-specific gene enrichment analysis[J]. Bioinformatics, 2019, 35(11): 1966-1967.

4 Rendon A, Schäkel K. Psoriasis pathogenesis and treatment[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(6):1475.

5 Pasquali L, Srivastava A, Meisgen F, et al. The keratinocyte transcriptome in psoriasis: pathways related to immune responses, cell cycle and keratinization[J]. Acta Derm Venereol, 2019, 99(2):196-205.

6 Zhang Z, Zi Z, Lee EE, et al. Differential glucose requirement in skin homeostasis and injury identifies a therapeutic target for psoriasis[J]. Nat Med, 2018, 24(5): 617-627.

7 Platnich JM, Muruve DA. NOD-like receptors and inflammasomes: A review of their canonical and non-canonical signaling pathways[J]. Arch Biochem Biophys, 2019, 670:4-14.

8 Esser-Nobis K, Hatfield LD, Gale M. Spatiotemporal dynamics of innate immune signaling *via* RIG-I-like receptors[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2020, 117(27): 15778-15788.

9 陈健勤,邹玲,王莎莉,等.银屑Ⅰ号含药血清对银屑病样细胞模型的增殖、凋亡相关蛋白及基因的影响[J].中国皮肤性病学杂志,2021,35(4):444-448.

10 谭红雁,胡霞,谭雯,等.加味凉血消风散对寻常型银屑病患者外周血*JAK3*、*STAT3*、*Bcl-2*、*p53*基因及蛋白表达的影响[J].时珍国医国药,2020,31(3):591-593.

11 胡霞,谭红雁,谭雯,等.加味凉血消风散对寻常型银屑病血热证JAK3/STAT3通路BCL-2、P53蛋白水平影

响[J].云南中医中药杂志,2019,40(12):22-27.

12 Kim SA, Ryu YW, Kwon JI, et al. Differential expression of cyclin D1, Ki67, pRb, and p53 in psoriatic skin lesions and normal skin[J]. Mol Med Rep, 2018, 17(1):735-742.

13 Huang R, Bai C, Liu X, et al.The p53/RMRP/miR122 signaling loop promotes epithelial-mesenchymal transition during the development of silica-induced lung fibrosis by activating the notch pathway[J]. Chemosphere, 2021, 263:128133.

14 方路通,王青青.树突状细胞在银屑病中的作用研究进展[J].中国免疫学杂志, 2018, 34(4): 613-617.

15 陈云刘,何焱玲.树突状细胞在银屑病发病中的作用[J].中国皮肤性病学杂志, 2018, 32(2): 223-226.

16 卫倩倩,马宇时,王琪.银屑病发病机制研究概况及其临床意义[J].科技视界,2021,(9):114-116.

17 陈建霞,冯燕艳.巨噬细胞在银屑病发病机制中作用的研究进展[J].临床皮肤科杂志, 2019, 48(11):714-716.

18 陈雪琴,宋志强.银屑病中主要免疫细胞和相关细胞因子的研究进展[J].中国皮肤性病学杂志,2020,34(11):1321-1325.

19 左哲,王君灵,张慧云,等.银屑病患者嗜酸性粒细胞P物质及受体神经激肽/速激肽受体1水平升高[J].细胞与分子免疫学杂志,2017,33(7):966-970.

[本文编辑] 宋睿璞

(上接第1651页)

32 Yamaguchi T, Shirai K, Nagayama D, et al. Bezafibrate ameliorates arterial stiffness assessed by cardio-ankle vascular index in hypertriglyceridemic patients with type 2 diabetes mellitus[J]. J Atheroscler Thromb, 2019, 26(7): 659-669.

33 Koulis C, AMD W, Gray SP, et al. Linking RAGE and Nox in diabetic micro-and macrovascular complications[J]. Diabetes Metab, 2015, 41(4): 272-281.

34 Sanajou D, Ghorbani HA, Argani H, et al. AGE-RAGE axis blockade in diabetic nephropathy: Current status and future directions[J]. Eur J Pharmacol, 2018, 833(1): 158-164.

35 Burke AP, Kolodgie FD, Zieske A, et al. Morphologic findings of coronary atherosclerotic plaques in diabetics: A postmortem study[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2004, 24(7): 1266-1271.

36 刘肖梅,李才锐,孙曙光.糖尿病周围神经病变与NF-κB、TNF-α和HSP70的关系[J].黑龙江医药, 2016, 29(3):401-404.

37 Haslbeck KM, Schleicher E, Bierhaus A, et al. The AGE/RAGE/NF-κB pathway may contribute to the pathogenesis of polyneuropathy in impaired glucose tolerance (IGT)[J]. Exp Clin Endocrinol Diabetes, 2005, 113(5): 288-291.

[本文编辑] 宋睿璞