

Bioinformatics Excavation of Potential Genes for Intracranial Aneurysm Rupture

Fengyue Zhang, Yuezhen Zhang, Chenghao Wang*

Department of Medicine, Qingdao University, Qingdao Shandong
Email: *18953505780@189.cn

Received: Aug. 3rd, 2020; accepted: Aug. 21st, 2020; published: Aug. 28th, 2020

Abstract

Objective: To excavate the difference between ruptured and unruptured intracranial aneurysms (IAs) for genetic analysis of its potential significance in the rupture of intracranial aneurysms. **Methods:** Three gene expression datasets (GSE26969, GSE15629 and GSE6551) were obtained from the GEO database for differential gene analysis. The interested genes were analyzed and obtained using GO and KEGG, and the key genes in the key modules were searched using the Molecular Complexity Module (MCODE) plug-in in Cytoscape. **Results:** After multi-data set analysis using the data set obtained from THE GEO database, 116 differentially expressed genes, 56 highly expressed genes and 60 low-expressed genes were obtained. After the protein expression network was constructed, the key gene for PTPRB was found out by using the Molecular Complexity Module (MCODE) plug-in in Cytoscape. **Conclusion:** Bioinformatics analysis of different intracranial aneurysm wall samples shows that PTPRB down-regulation has a high correlation with intracranial aneurysm rupture, which provides a potential alternative target for drug therapy and prevention of intracranial aneurysm rupture.

Keywords

Intracranial Aneurysms, Bioinformatics Analysis, PTPRB

关于颅内动脉瘤破裂潜在基因的生物信息学挖掘

张风越, 张悦振, 王成浩*

青岛大学医学部, 山东 青岛
Email: *18953505780@189.cn

*通讯作者。

收稿日期: 2020年8月3日; 录用日期: 2020年8月21日; 发布日期: 2020年8月28日

摘要

目的: 挖掘颅内动脉瘤(Intracranial Aneurysms, IAs)中的破裂颅内动脉瘤和未破裂动脉瘤之间的差异是基因并分析其在颅内动脉瘤破裂的潜在意义。**方法:** 我们从GEO数据库获得了三个基因表达的数据集(GSE26969, GSE15629和GSE6551)进行差异基因分析, 利用GO和KEGG分析并获得其中有意义的基因, 利用Cytoscape中的分子复杂性模块(MCODE)插件寻找关键模块中的关键基因。**结果:** 利用从GEO数据库获得的数据集进行多数据集分析后得出116个差异基因, 56个高表达基因, 60个低表达基因, 进行蛋白表达网络构建后, 利用Cytoscape中的分子复杂性模块(MCODE)插件找出关键基因为PTPRB。**结论:** 经过生物信息学分析不同的颅内动脉瘤壁样本表明, PTPRB下调在颅内动脉瘤出现破裂具有较高的相关性, 这为相关药物治疗并预防颅内动脉瘤破裂提供潜在的可选择靶点。

关键词

颅内动脉瘤, 生物信息学分析, PTPRB

Copyright © 2020 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

颅内动脉瘤(Intracranial Aneurysms, IAs)是颅内常见的脑血管病之一, 它是发生在动脉壁上的异常凸起, 既往的研究显示有 3.6%~6%的人群患有 IAs [1] [2]。颅内动脉瘤破裂是蛛网膜下腔出血(Subarachnoid Hemorrhage, SAH)的常见原因, 且预后往往较差[3]。既往研究表明, 年龄、高血压、饮酒等因素是颅内动脉瘤发生的高危因素, 近年来又有关于血流动力学的研究发现血管内剪切力的改变也是颅内动脉瘤破裂的发病因素, 但仍不能预测颅内动脉瘤发生破裂的风险[4], 而为了更进一步分析颅内动脉瘤破裂的危险因素, 进行了解颅内动脉瘤形成和破裂的分子机制具有重要意义。人体基因组图谱所使用的高通量表达(Gene Expression Omnibus, GEO)在肿瘤中应用很多, 但是该生物信息学分析方法在颅内动脉瘤中的应用较少, 本文旨在试图挖掘潜在的核心基因。

2. 研究方法

2.1. 获取基因表达数据集

基因表达数据集是从 GEO 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)获得的。选择了 IAs 的三个基因表达数据集(GSE26969, GSE15629 和 GSE6551)。其中, GSE26969、GSE6551 基于平台 GPL570, 芯片类型是 Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array 表达谱芯片(Affymetrix, Santa Clara, CA); GSE15629 基于平台 GPL6244 芯片类型是 Affymetrix Human Gene 1.0 ST Array。GSE15629 数据集[5]包括 8 个破裂颅内动脉瘤和 6 个未破裂颅内动脉瘤。GSE26969 数据集[6]包括 3 个未破裂颅内动脉瘤和 3 个正常血管壁, GSE6551 数据集[6]包括 8 个破裂颅内动脉瘤、6 个未破裂颅内动脉瘤和 5 个正常血管壁。

2.2. 获得差异基因

数据预处理: GEO 数据库包括原始数据和预处理(背景校正, 分位数标准化和探针总结)后的数据, 本文下载了经过预处理的系列矩阵文件中的数据。然后, 将探针级数据转换为基因表达值。不符合的探针组被删除。对于与一个基因相对应的多个探针, 将平均表达值作为基因表达值。该过程使用 R 语言从 Bioconductor (<http://www.bioconductor.org/>) 下载的 GSEquery 和 Limma 软件包对数据进行处理。差异表达基因(Differentially Expressed Genes, DEGs)的筛选: 实验组与对照组之间的 DEG 使用 Bioconductor 的 limma 包的 t-检验鉴定, 矩阵使用配对样本的方式构建。DEGs 筛选标准: \log_2 基因表达差异倍数(Fold Change, FC)绝对值 ≥ 1 , $\text{adjust } P < 0.05$ 。

2.3. DEG 的 GO 和 KEGG 途径分析

GO 功能富集和通路分析: 为了解每个共表达模块对应的生物学功能, 使用在线分析工具 DAVID (the Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery, <https://David.ncicrf.gov/>) 数据库[7]对 DEGs 行基因本体论(Gene Ontology, GO)和 KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)信号通路分析, 得到 DEGs 的生物学过程分析结果和 KEGG 信号通路分析结果, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2.4. PPI 网络建设与模块分析

DEGs 的 PPI 网络构建和关键基因筛选验证通过在线分析网站 STRING (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes, <https://string-db.org/>) [8]得到 DEGs 的 PPI 网络, 筛选条件为 combined score > 0.4 , 之后进一步用 Cytoscape 筛选出 PPI 网络中处于关键位置的前 10 个基因, 利用 Cytoscape [9]的 MCODE 插件分析关键通路, 条件参数设置为: Node Score Cutoff = 0.2, K-Core = 2, Max.Depth = 100, 软件将自动生成核心 Cluster。

3. 结果

3.1. 识别与 IAs 相关的 DEG 破裂

从 GEO 数据库中提取了 IAs 相关基因表达谱破裂的三个数据集(GSE26969, GSE15629 和 GSE6551)。为了集成不同的实验和测序平台, 需要对数据进行处理和标准化, 见图 1。最后, 通过 R 软件包在 GSE26969, GSE15629 和 GSE6551 数据集中筛选了 116 个 DEGs, 其中 60 个基因表达上调, 56 个基因表达下调, 热图可以清楚的显示这些基因的差异, 见图 2、图 3, 红色为上调基因。

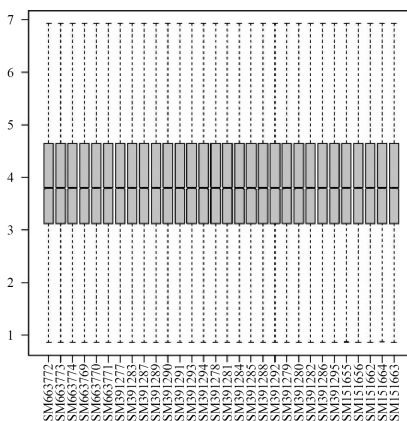


Figure 1. Data normalization

图 1. 数据归一化

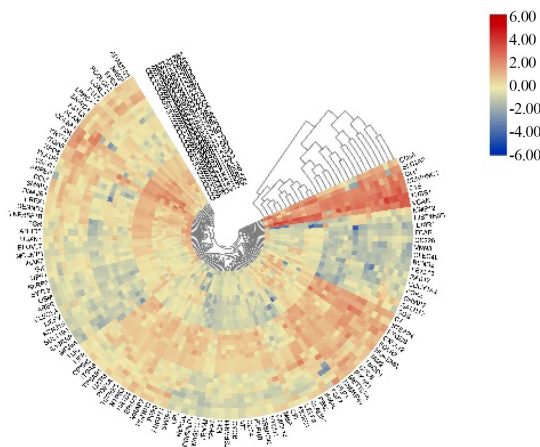


Figure 2. Heat map
图 2. 热图

3.2. DEGs 的 GO 和 KEGG 分析

DEGs 包括 60 个上调基因和 56 个下调基因，对其进行 GO 分析，结果显示其生物学过程(Biological Progress, BP)主要和血管内皮相关性结合受体相关性高，如细胞因子受体结合、细胞粘附分子结合、外源蛋白结合、模式识别受体等，见图 4，气泡越红越大表示相关性越高。

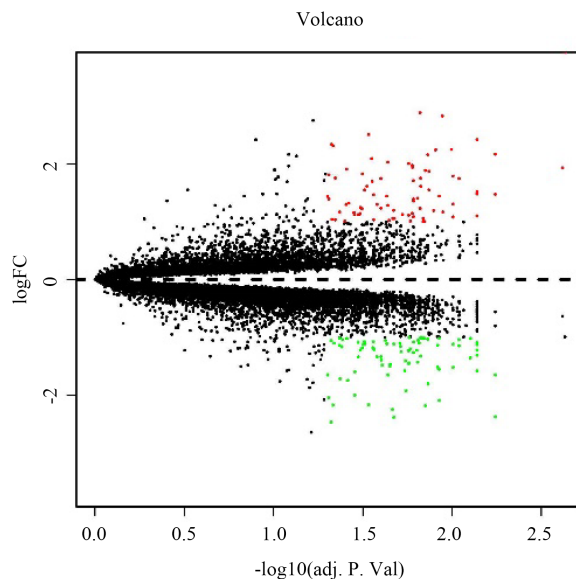


Figure 3. The volcano figure
图 3. 火山图

3.3. PPI 网络的建设与模块分析

使用 STRING 数据库构建了 60 个上调 DGEs 和 56 个下调 DGEs 的 PPI 网络，见图 5。利用 Cytoscape 软件的 Cytoscape，对以上 DEGs 进行关键的蛋白交互作用分析，结果显示，存在 1 个显著的蛋白交互网络，其 KEGG 通路富集分析列于表，血管内皮蛋白酪氨酸磷酸酶(VE-PTP, PTPRB)及相关的通路在颅内动脉瘤的发病过程中存在显著地相关性，见图 6。

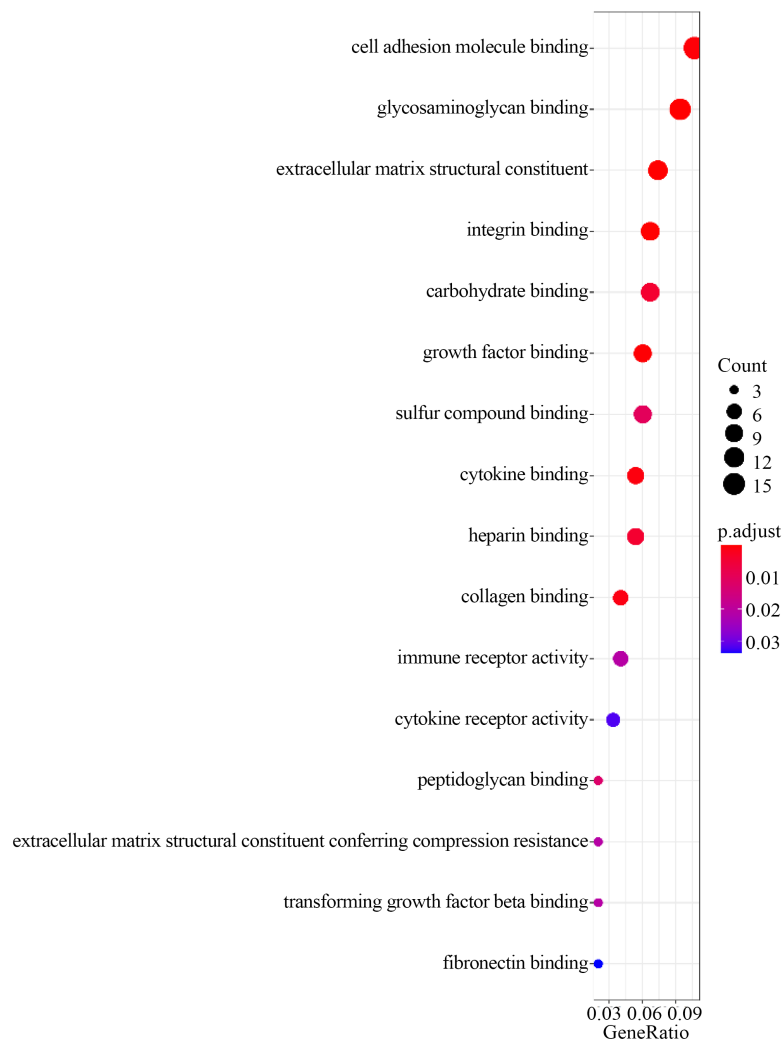


Figure 4. The dot plot figure
图 4. 气泡图

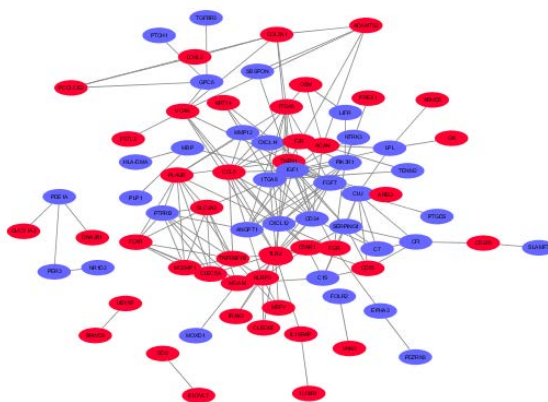


Figure 5. STRING protein interaction network diagram, red is up, blue is down
图 5. STRING 蛋白质相互作用网络图, 红色为上调, 蓝色为下调



Figure 6. PTPRB protein-protein interaction network

图 6. PTPRB 的蛋白 - 蛋白相互作用网络

4. 讨论

颅内动脉瘤的全球发病率约为 3.2%，每年的发病率约为 9.1 人/10 万人，大多数的颅内动脉瘤并不会破裂，但是一经破裂，则会造成 SAH。在发生颅内动脉瘤破裂的蛛网膜下腔出血(aSAH)之后，有高达 23% 的患者将存在严重的后遗症，无论对个人生命安全，还是对家庭和社会，都会造成巨大的负担[3]。

随着医疗水平的提高，患者对于生存质量有了更高的要求，健康查体的次数较往年有着明显的增加。在这个过程中就会检查出颅内动脉瘤，尽管有很多患者的动脉瘤并不会破裂，仅凭影像学并不能更好的辨别颅内动脉瘤是不是会破裂。血管内血流动力学的相关研究已经表明有些动脉瘤会不断的增大，会出现破裂的风险，但是其准确性仍有待提高。

吸烟、饮酒、高血压等危险因素已经证实可以导致颅内动脉瘤的发生，也是颅内动脉瘤破裂的危险因素。基因芯片技术已经应用于肿瘤很多年，但是在颅内动脉瘤方面仍较少应用。本次研究分析出 116 个 DEGs，其中有 60 个上调基因和 56 个下调基因，我们通过生物信息学的方法，分析出血管内皮蛋白酪氨酸磷酸酶受体 B 型(VE-PTP, PTPRB)下调造成颅内血管内皮损伤的一个原因。

PTPRB 编码的蛋白质属于蛋白质酪氨酸磷酸酶(PTP)家族，在血管内皮细胞中有特异性表达，在动脉和小动脉中尤为突出[10]。由于胚胎和卵黄囊中多种与血管生成相关的缺陷，VE-PTP 在小鼠中的消融导致妊娠 10 天时胚胎死亡。这些缺陷包括血管丛无法重构为大静脉和分支的血管网络，这表明对于血管生成过程(如血管的重构和维持)很重要[11]。PTPs 被认为是调控多种细胞过程的信号分子，包括细胞生长、分化、有丝分裂周期和致癌转化。该 PTP 包含一个胞外结构域、一个跨膜结构域和一个胞浆内催化结构域，因此属于受体型 PTP [12]。

PTPRB 对于调节内皮连接和血管发育至关重要，已有小鼠动物模型表明它能稳定视网膜血管。PTPRB 的极化再分布促进了血管内皮细胞中 Rac 或 Src 的活化。VE-PTP 与整合素合作通过上调 c-Src 活性来促进血管内皮细胞的扩散和迁移[12]，从而诱导了血管内皮细胞排列和伸长。PTPRB 还显示出通过介导 VEGFR2 的去磷酸化而使其失活，从而导致血管内皮细胞增殖的抑制以及血管内皮细胞极性和管腔形成的建立[13]。此外，PTPRB 被认为与 VE-Ga 黏着蛋白形成复合物，从而促进其黏附功能[14] [15]。鉴于整联蛋白，VEGFR2 和 VE-Ga 粘着蛋白是在血管内血流剪切力下诱导血管内皮细胞中反应的关键调节因子[16] [17] PTPRB 响应于血管内血流剪切力，相对于流向快速地重新分布到血管内皮细胞的下游边缘。PTPRB 的这种积累可能有助于剪切力诱导的细胞形态变化。仍有相关研究认为血管内皮细胞可能是适应性的改变，但是我们综合了生物信息学分析和既往的研究表明，PTPRB 下调仍然是颅内动脉瘤破裂的危险因素。

5. 结论

血管内皮蛋白酪氨酸磷酸酶(VE-PTP, PTPRB)及相关的通路在颅内动脉瘤的发病过程中存在显著相关性。PTPRB 下调在颅内动脉瘤出现破裂具有较高的相关性, 这为相关药物治疗并预防颅内动脉瘤破裂提供潜在的可选择靶点。

参考文献

- [1] Macdonald, R.L. and Schweizer, T.A. (2017) Spontaneous Subarachnoid Haemorrhage. *The Lancet*, **389**, 655-666. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)30668-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)30668-7)
- [2] Wardlaw, J.M. and White, P.M. (2000) The Detection and Management of Unruptured Intracranial Aneurysms. *Brain*, **123**, 205-221. <https://doi.org/10.1093/brain/123.2.205>
- [3] Goldmann, T., Tay, T.L. and Prinz, M. (2013) Love and Death: Microglia, NLRP3 and the Alzheimer's Brain. *Cell Research*, **23**, 595-596. <https://doi.org/10.1038/cr.2013.24>
- [4] Nixon, A.M., Gunel, M. and Sumpio, B.E. (2010) The Critical Role of Hemodynamics in the Development of Cerebral Vascular Disease. *Journal of Neurosurgery*, **112**, 1240-1253. <https://doi.org/10.3171/2009.10.JNS09759>
- [5] Pera, J., Korostynski, M., Krzyszkowski, T., et al. (2010) Gene Expression Profiles in Human Ruptured and Unruptured Intracranial Aneurysms: What Is the Role of Inflammation? *Stroke*, **41**, 224-231. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.109.562009>
- [6] Li, L., Yang, X., Jiang, F., Dusting, G.J. and Wu, Z. (2009) Transcriptome-Wide Characterization of Gene Expression Associated with Unruptured Intracranial Aneurysms. *European Neurology*, **62**, 330-337. <https://doi.org/10.1159/000236911>
- [7] Huang da, W., Sherman, B.T. and Lempicki, R.A. (2009) Systematic and Integrative Analysis of Large Gene Lists Using DAVID Bioinformatics Resources. *Nature Protocols*, **4**, 44-57. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.211>
- [8] Szklarczyk, D., Franceschini, A., Wyder, S., et al. (2015) STRING v10: Protein-Protein Interaction Networks, Integrated over the Tree of Life. *Nucleic Acids Research*, **43**, D447-D452. <https://doi.org/10.1093/nar/gku1003>
- [9] Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., et al. (2003) Cytoscape: A Software Environment for Integrated Models of Biomolecular Interaction Networks. *Genome Research*, **13**, 2498-2504. <https://doi.org/10.1101/gr.1239303>
- [10] Souma, T., Thomson, B.R., Heinen, S., et al. (2018) Context-Dependent Functions of Angiopoietin 2 Are Determined by the Endothelial Phosphatase VEPTP. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **115**, 1298-1303. <https://doi.org/10.1073/pnas.1714446115>
- [11] Baumer, S., Keller, L., Holtmann, A., et al. (2006) Vascular Endothelial Cell-Specific Phosphotyrosine Phosphatase (VE-PTP) Activity Is Required for Blood Vessel Development. *Blood*, **107**, 4754-4762. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-01-0141>
- [12] Mantilidewi, K.I., Murata, Y., Mori, M., et al. (2014) Shear Stress-Induced Redistribution of Vascular Endothelial-Protein-Tyrosine Phosphatase (VE-PTP) in Endothelial Cells and Its Role in Cell Elongation. *Journal of Biological Chemistry*, **289**, 6451-6461. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.529503>
- [13] Hayashi, M., Majumdar, A., Li, X., et al. (2013) VE-PTP Regulates VEGFR2 Activity in Stalk Cells to Establish Endothelial Cell Polarity and Lumen Formation. *Nature Communications*, **4**, 1672. <https://doi.org/10.1038/ncomms2683>
- [14] Nawroth, R., Poell, G., Ranft, A., et al. (2002) VE-PTP and VE-Cadherin Ectodomains Interact to Facilitate Regulation of Phosphorylation and Cell Contacts. *The EMBO Journal*, **21**, 4885-4895. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf497>
- [15] Nottebaum, A.F., Cagna, G., Winderlich, M., et al. (2008) VE-PTP Maintains the Endothelial Barrier via Plakoglobin and Becomes Dissociated from VE-Cadherin by Leukocytes and by VEGF. *Journal of Experimental Medicine*, **205**, 2929-2945. <https://doi.org/10.1084/jem.20080406>
- [16] Ando, J. and Yamamoto, K. (2009) Vascular Mechanobiology: Endothelial Cell Responses to Fluid Shear Stress. *Circulation Journal*, **73**, 1983-1992. <https://doi.org/10.1253/circj.CJ-09-0583>
- [17] Hahn, C. and Schwartz, M.A. (2009) Mechanotransduction in Vascular Physiology and Atherogenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **10**, 53-62. <https://doi.org/10.1038/nrm2596>