

# 基于生物信息学方法对抑郁症中铁死亡特征基因的筛选与实验验证

梁达来<sup>1\*</sup>, 司永珍<sup>1</sup>, 郭映伯<sup>1</sup>, 顾文雅<sup>1</sup>, 樊小龙<sup>1</sup>, 乌云格日勒<sup>2#</sup>

<sup>1</sup>内蒙古科技大学包头医学院研究生学院, 内蒙古 包头

<sup>2</sup>内蒙古自治区人民医院麻醉科, 内蒙古 呼和浩特

收稿日期: 2026年2月3日; 录用日期: 2026年2月26日; 发布日期: 2026年3月6日

## 摘要

目的: 基于生物信息学方法筛选出抑郁症中铁死亡相关特征基因并通过体内实验验证, 探讨铁死亡在抑郁症中的作用及价值。方法: 以美国国家生物技术信息中心(NCBI)基因表达综合数据库(GEO)中的微阵列芯片数据集GSE20388为源, 采用R语言limma包, 以 $P < 0.05$ ,  $|\log_2FC| > 0.1$ 为标准, 进行差异分析, 得到差异基因; 再与从Ferrdb数据库选出的铁死亡相关基因取交集, 得到差异表达的铁死亡相关基因。对GSE20388数据集进行加权基因共表达网络分析(Weighted Gene Co-Expression Network Analysis, WGCNA), 筛选出与抑郁症最相关的模块基因; 利用最小绝对收缩与选择算子回归模型(Least Absolute Shrinkage and Selection Operator, LASSO)模型和蛋白质相互作用网络分析(Protein-Protein Interaction Network Analysis, PPI)进一步筛选出关键基因, 对关键基因进行富集分析。最后, 通过慢性不可预见轻度应激(CUMS)的方法建立抑郁样小鼠模型, 收集海马组织标本采用实时荧光定量PCR (Quantitative Real-Time PCR, RT-qPCR)方法验证关键基因信使RNA (Messenger RNA, mRNA)的表达水平。结果: 我们分析并确定了3个关键基因: OTUB1, GOT1, CYLD; GO富集分析表明这些基因参与了细胞的代谢, 氨基酸的代谢以及蛋白的泛素化/去泛素化; KEGG富集分析显示与氨基酸代谢, 碳代谢以及TNF信号通路密切相关。免疫浸润分析结果显示, 调节性T细胞和未成熟树突状细胞在抑郁模型中高表达而单核细胞在抑郁症模型中低表达且差异显著( $P < 0.001$ )。qPCR结果显示: CYLD与GOT1均在抑郁模型中显著高表达, 而GPX4与OTUB1在抑郁模型中显著低表达。MDA结果显示: 与对照组相比, 抑郁小鼠模型中MDA水平显著高表达。结论: CYLD、GOT1、OTUB1是抑郁症与铁死亡的关键枢纽基因, 有着深远的治疗价值。

## 关键词

抑郁症, 铁死亡, 生物信息学

\*第一作者。

#通讯作者。

# Identification and Experimental Validation of Ferroptosis-Related Signature Genes in Depression Based on Bioinformatics Analysis

Dalai Liang<sup>1\*</sup>, Yongzhen Si<sup>1</sup>, Yingbo Guo<sup>1</sup>, Wenya Gu<sup>1</sup>, Xiaolong Fan<sup>1</sup>, Gerile Wuyun<sup>2#</sup>

<sup>1</sup>Graduate School of Baotou Medical College, Inner Mongolia University of Science & Technology, Baotou Inner Mongolia

<sup>2</sup>Anesthesiology Department, Inner Mongolia People's Hospital, Hohhot Inner Mongolia

Received: February 3, 2026; accepted: February 26, 2026; published: March 6, 2026

## Abstract

**Objective:** To identify ferroptosis-related characteristic genes in depression using bioinformatics approaches and validate them through in vivo experiments, thereby exploring the role and potential value of ferroptosis in depression. **Methods:** Based on the microarray dataset GSE20388 from the NCBI GEO database, differential expression analysis was performed using the R package “limma” with thresholds of  $P < 0.05$  and  $|\log_2FC| > 0.1$  to obtain differentially expressed genes (DEGs). These DEGs were intersected with ferroptosis-related genes retrieved from the FerrDb database to identify ferroptosis-associated DEGs. Weighted gene co-expression network analysis (WGCNA) was applied to GSE20388 to identify modules most correlated with depression. The least absolute shrinkage and selection operator (LASSO) regression and protein-protein interaction (PPI) network analyses were then used to further screen for hub genes, followed by functional enrichment analysis of these genes. Finally, a depression-like mouse model was established using the chronic unpredictable mild stress (CUMS) protocol. Hippocampal tissues were collected, and mRNA expression levels of the hub genes were validated by quantitative real-time PCR (RT-qPCR). **Results:** Three hub genes—OTUB1, GOT1, and CYLD—were identified. GO enrichment analysis indicated their involvement in cellular metabolism, amino acid metabolism, and protein ubiquitination/deubiquitination. KEGG enrichment analysis revealed significant associations with amino acid metabolism, carbon metabolism, and the TNF signaling pathway. Immune infiltration analysis demonstrated that regulatory T cells and immature dendritic cells were significantly upregulated, whereas monocytes were significantly downregulated in the depression model ( $P < 0.001$ ). RT-qPCR results showed that CYLD and GOT1 were significantly upregulated, while GPX4 and OTUB1 were significantly downregulated in the depression model. Additionally, malondialdehyde (MDA) levels were significantly elevated in depressed mice compared with controls. **Conclusion:** CYLD, GOT1, and OTUB1 are key hub genes linking depression and ferroptosis, highlighting their potential therapeutic value in depression.

## Keywords

Depression, Ferroptosis, Bioinformatics

Copyright © 2026 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

抑郁症是一种常见的以认知和情感功能障碍为主要特征的精神疾病,是世界范围内自杀的主要原因,也是目前全球疾病负担的主要原因之一[1]。尽管近几十年对抑郁症的研究取得了长足的进展,但其复杂的病因和致病机制尚未完全阐明,这种复杂性直接转化为临床实践中的巨大挑战,特别是在早期诊断、有效监测疾病进展和优化治疗干预方面,往往导致高误诊率和不尽人意的临床效果[2]。近几年,随着生物信息学的发展,为探索抑郁症的客观生物标志物提供了新的方向,尽管各类生物标志物层出不穷,但都未能成功应用到临床实践。因此,及时探索并识别出抑郁症致病机制的特征基因,从而提高诊断和诊疗效果,具有非常重要的临床价值。

铁死亡是一种新型的细胞死亡方式,不同于细胞的自噬、凋亡等其他细胞死亡方式,铁死亡是以铁的蓄积和脂质过氧化为核心特征[3]。首次发现铁死亡,是因其与肿瘤组织密切相关,然而近几年越来越多的研究表明,它与神经系统疾病紧密相关。如:帕金森、阿尔茨海默病以及亨廷顿病等[3][4]。一些研究[5]发现,在抑郁样动物模型的脑组织中发现了铁沉积的现象,尽管这些现象暗示铁死亡与抑郁症之间可能存在一定联系,但是目前尚无学者提出明确的结论。

基于铁死亡在其他神经系统疾病中的重要作用,以及我们在研究抑郁症过程中所观察到的现象,我们推测铁死亡可能在抑郁症的病理生理机制中发挥重要作用。因此,本研究旨在通过生物信息学分析方法,筛选出抑郁症中与铁死亡相关的特征基因,并通过实验方法对其进行验证。我们的研究目标是为抑郁症的诊断生物标志物和治疗靶点提供潜在的新价值。

为实现上述目标,我们采用了差异表达基因(DEGs)分析、加权基因共表达网络分析(Weighted Gene Co-Expression Network Analysis, WGCNA)、最小绝对收缩与选择算子回归模型(Least Absolute Shrinkage and Selection Operator, LASSO)、蛋白质-蛋白质相互作用网络分析(Protein-Protein Interaction Network Analysis, PPI)和富集分析等多种分析方法。最后,在动物实验,我们构建了慢性不可预见轻度应激(CUMS)诱导的抑郁样小鼠模型,提取海马组织,通过实时荧光定量 PCR (Quantitative Real-Time PCR, RT-qPCR) 技术对前期生物信息学筛选出的关键基因表达水平进行实验验证。

本次研究揭示了铁死亡在抑郁症中的潜在作用,从而为抑郁症的诊断和治疗提供新的视角和靶点。同时,深化对抑郁症病理生理学的理解,为未来进一步探索及其在临床中的研究奠定基础。

## 2. 材料与方法

### 2.1. 数据收集与预处理

本研究使用来自美国国家生物技术信息中心(NCBI)基因表达综合数据库(GEO)中的芯片数据集 GSE20388,利用 R 语言中的“GEOquery”包下载原始表达矩阵。该数据集包含 22 例弗洛斯特拉特(FRL)大鼠和 17 例弗洛斯特赖特(FSL)大鼠的海马组织样本。数据经过“limma”包进行背景校正与标准化,并依据 GEO 提供的注释文件将探针 ID 转换为相应的基因符号(图 1)。

### 2.2. 差异表达铁死亡相关基因的筛选

从 FerrDb 数据库中提取与铁死亡高度相关(Relevance Score > 1)的基因集。使用“limma”包对 GSE20388 数据进行差异表达分析(筛选标准为  $P < 0.05$ ,  $|\log_2FC| > 0.1$ ),得出抑郁症差异基因(DEGs);随后将 DEGs 与铁死亡高度相关基因取交集,得到差异表达的铁死亡相关基因(DE-FRGs)。利用“pheatmap”包绘制热图展示其表达模式。

### 2.3. 加权基因共表达网络分析(WGCNA)

为识别与抑郁症临床表型显著相关的基因模块,采用“WGCNA”包构建共表达网络。首先进行样

本聚类并设定剪切阈值(cut height = 31)以去除离群样本。确定最优 soft-thresholding power 后, 计算邻接矩阵并转化为拓扑重叠矩阵(TOM)。利用动态剪枝算法识别模块, 合并高度相似模块。最终, 计算模块特征向量与抑郁表型的相关性, 筛选出与表型密切相关的模块, 并与 DE-FRGs 取交集以获得候选核心基因。

## 2.4. LASSO 回归筛选关键基因

为进一步筛选核心基因, 利用“glmnet”包实施 LASSO 回归分析。构建多元诊断模型, 并计算每个样本的风险评分(score =  $\sum \text{exp} \times \beta_i$ ), 其中 exp 为基因表达水平,  $\beta_i$  为对应回归系数。通过该方法筛选出具有潜在生物学意义的关键铁死亡基因。

## 2.5. 富集分析

采用“clusterProfiler”包对关键基因集进行 Gene Ontology (GO)与 Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG)通路富集分析。筛选阈值设为  $P < 0.05$ 。该分析有助于揭示相关基因在细胞代谢、凋亡调控及信号通路中的潜在功能。

## 2.6. PPI 蛋白互作网络构建

为探究关键基因间的相互作用关系, 借助 STRING 数据库(v12.0)构建蛋白质-蛋白质相互作用网络。随后使用 Cytoscape 软件(v3.9.0)进行可视化, 识别潜在调控中心基因节点。

## 2.7. 免疫浸润分析

采用“GSVA”包进行单样本基因集富集分析(ssGSEA), 评估 GSE20388 各样本中 28 种免疫细胞的相对浸润程度。浸润结果通过箱线图进行直观展示, 以刻画抑郁状态下免疫微环境的变化特征。

## 2.8. 动物实验设计与实施

### 2.8.1. 抑郁模型构建

本实验获得内蒙古医科大学附属医院实验动物伦理委员会批准(编号: YKD202405053), 并严格遵循《实验动物使用指南》。选用 SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠 12 只, 随机分为对照组与实验组(各 6 只)。实验组小鼠接受为期 21 天的慢性不可预见轻度应激(CUMS)处理, 每日随机施加一种应激源, 内容包括摇晃、禁水、冷水游泳等共 12 种干预方式, 确保每种刺激间隔不少于 7 天; 对照组正常饲养。

### 2.8.2. 行为学测试

为验证模型构建有效性, 分别进行以下三项行为学测试: 强迫游泳实验(Forced Swimming Test, FST): 在 23℃~25℃水温下进行, 总时间 6 分钟, 记录最后 4 分钟的静止时间。悬尾实验(Tail Suspension Test, TST): 小鼠尾部被固定悬挂 6 分钟, 记录后 4 分钟静止时间。旷场实验(Open Field Test, OFT): 在低照度下进行, 自由探索 5 分钟, 记录活动路径与中心区域停留时间。

### 2.8.3. 样本收集

测试结束后对小鼠进行充分麻醉, 迅速摘取双侧海马组织并于-80℃冻存。

## 2.9. 丙二醛(MDA)水平测定

为评估脂质过氧化程度, 采用 MDA 检测试剂盒检测海马组织中 MDA 含量, 结果用于反映铁死亡相关的氧化应激程度。

## 2.10. RT-qPCR 验证关键基因表达

使用 TRIzol 法提取总 RNA，逆转录为 cDNA 后，利用 qPCR 检测关键基因 GPX4、OTUB1、CYLD、GOT1 的表达水平。实验使用 GoScript 反转录系统与 GoTaq Master Mix 扩增体系，引物信息如下表 1 所示。表达量以  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  方法计算。

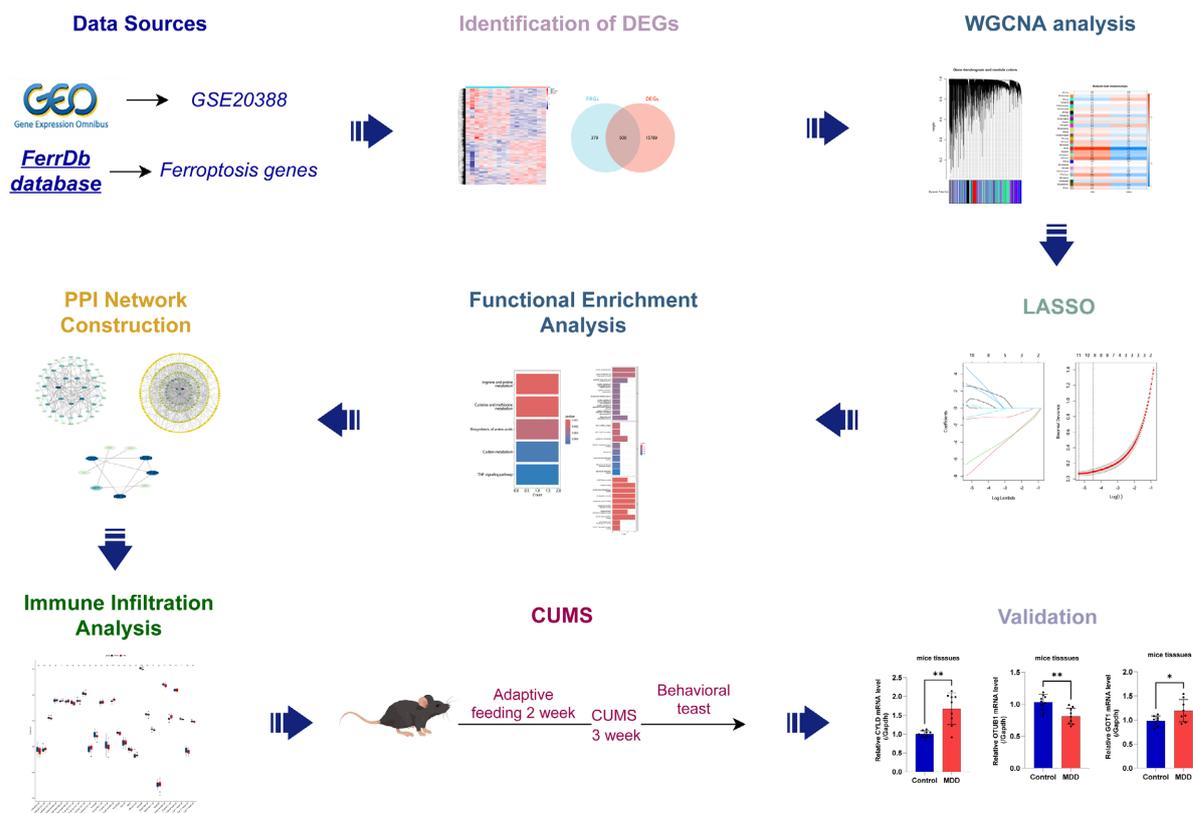
**Table 1.** Primer sequences for quantitative real-time PCR

**表 1.** 实时定量 PCR 引物序列

基因	上游引物	下游引物
GPX4	ATGAAAGTCCAGCCCAAGGG	GCTAGAGATAGCACGGCAGG
GOT1	CTGGGGTTAGAGCCTGTGG	GGGCATCACTCCTGCAGAAT
CYLD	ACGGAAGTGTCGGGATGTTC	CCCCTACTTCTCTGGCTCCT
OTUB1	GAGCAGCTAGGCATCCTCTG	TGCAGATATGGCCCAAGCAA
GAPDH	ACGGCAAATCAACGGCACAG	ACACCAGTAGACTCCACGACATAC

## 2.11. 统计分析

生物信息学分析使用 R (v4.3.1) 进行，行为学与实验数据分析采用 GraphPad Prism 9.1。正态分布数据以均值  $\pm$  标准差表示，两组间采用独立样本 t 检验。不服从正态分布者则采用非参数检验。统计显著性以  $P < 0.05$  为界定。



**Figure 1.** Flowchart of the multistep screening and validation strategy

**图 1.** 多步骤筛选和验证策略的流程图

### 3. 结果

#### 3.1. 差异表达铁死亡相关基因的筛选

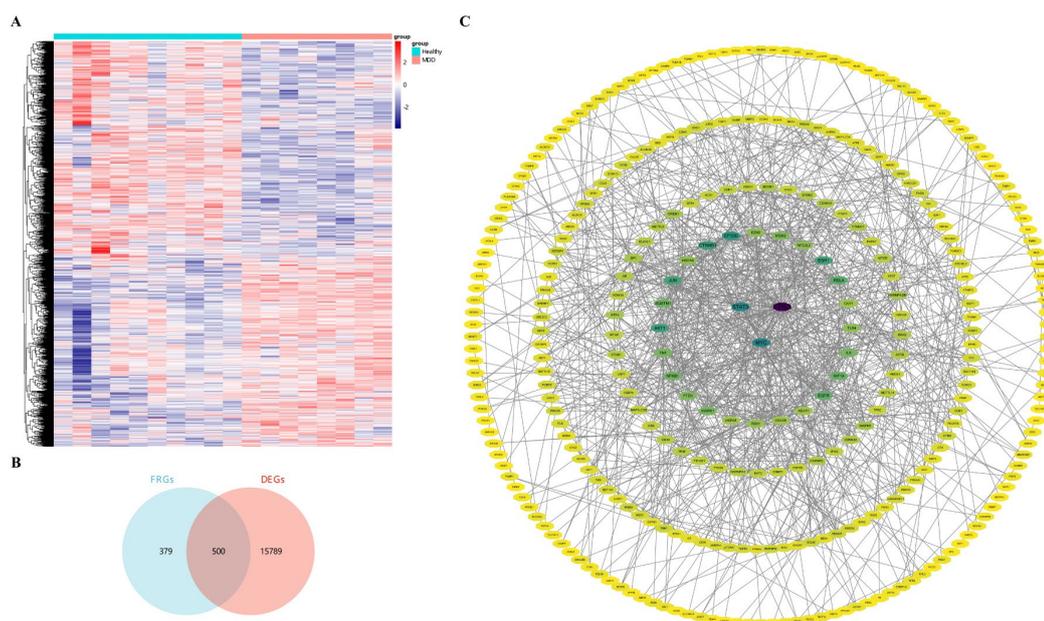
使用 R 语言的“limma”包对 GSE20388 数据集进行差异表达分析，共检测到 16,289 个差异表达基因 (DEGs) (图 2(A))。随后，与 FerrDb 数据库中已注释的铁死亡相关基因进行交集分析，最终获得 500 个差异表达铁死亡相关基因 (DE-FRGs)，为后续分析奠定了基础 (图 2(B))。

#### 3.2. 加权基因共表达网络分析(WGCNA)

利用“WGCNA”包构建共表达网络，首先剔除离群样本后进行模块识别。相关性分析显示多个模块与抑郁表型高度相关，分别是 red 模块(相关系数  $r = 0.93$ ,  $P = 7e-17$ )、grey60 模块( $r = 0.41$ ,  $P = 0.01$ )、lightgreen 模块( $r = 0.39$ ,  $P = 0.02$ )、salmon 模块( $r = 0.64$ ,  $P = 2e-05$ )、darkgrey 模块( $r = 0.47$ ,  $P = 0.003$ )以及 saddlebrown 模块( $r = 0.46$ ,  $P = 0.004$ ) (图 3(A))。合并上述相关模块后共识别出 1605 个模块基因。将其与前述 500 个 DE-FRGs 交集，筛选出 64 个候选核心基因 (图 3(B))，提示这些基因可能在抑郁症与铁死亡之间具有关键调控作用。

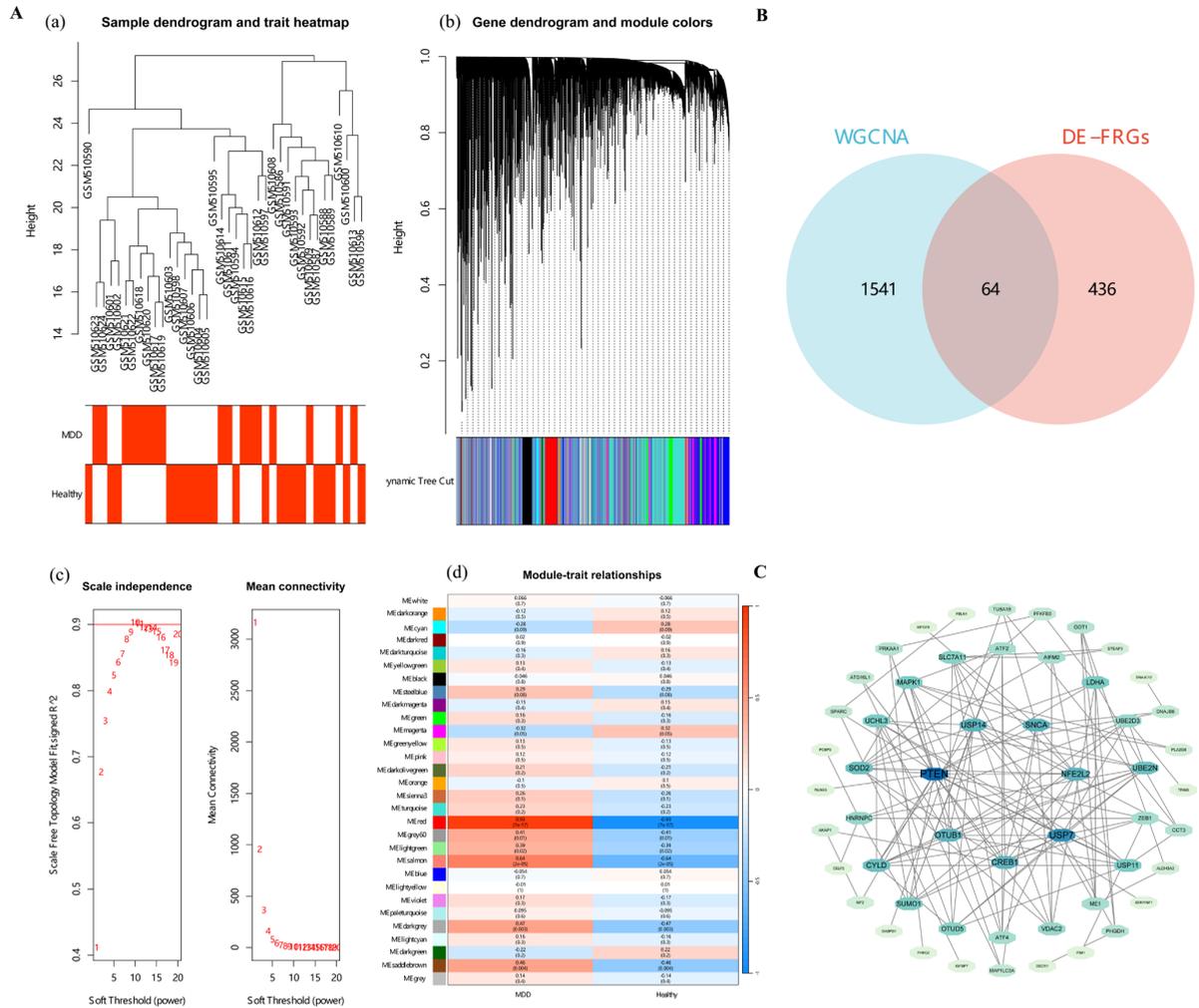
#### 3.3. LASSO 回归筛选关键基因

为进一步筛选关键基因，采用最小绝对收缩与选择算子(LASSO)回归模型对 64 个核心基因进行分析 (图 4(A))。最终筛选出 11 个关键核心基因：TUBA1B、PHGDH、CX3CL1、ALDH3A2、APOC1、UBE2N、UCHL3、OTUB1、GABPB1、GOT1 和 CYLD。



**Figure 2.** Results of differential expression analysis. (A) The clustered heatmap shows differentially expressed genes (DEGs) between the depression and healthy control groups. Upregulated and downregulated genes are colored in red and blue, respectively, with the significance threshold set at an adjusted  $P < 0.05$  and  $|\log_2FC| > 0.1$ . (B) Venn diagram illustrating the overlap between DEGs and ferroptosis-related genes. A total of 500 overlapping genes were identified as ferroptosis-associated DEGs. (C) Protein-protein interaction (PPI) network of the 500 identified ferroptosis-associated DEGs

**图 2.** 差异分析结果。(A) 热图显示抑郁症和健康组之间差异表达的基因(DEGs)，上调基因显示为红色，下调基因显示为蓝色，显著阈值设置为调整后的  $P < 0.05$  和  $|\log_2FC| > 0.1$ 。(B) 韦恩图显示了 DEGs 和铁死亡相关基因的交集，共有 500 个重叠基因被鉴定为与铁死亡相关的 DEGs。(C) 对 500 个已确定的铁死亡相关 DEGs 进行 PPI 网络分析



**Figure 3.** Weighted gene co-expression network analysis (WGCNA) and candidate gene identification. (A) WGCNA results. (a) Sample clustering dendrogram. (b) Gene clustering dendrogram based on topological overlap, with modules identified by dynamic tree cutting and represented by different colors. (c) Soft threshold selection and the corresponding scale-free topology fit index and mean connectivity. The optimal soft threshold was chosen to maintain a scale-free network topology. (d) Heatmap showing module-trait correlations, illustrating the associations between the identified gene modules and depression. Color intensity indicates the strength and direction of the correlation. (B) Venn diagram displaying candidate core genes, with a total of 64 overlapping genes identified as candidate target genes. (C) Protein-protein interaction (PPI) network analysis of the 64 candidate target genes

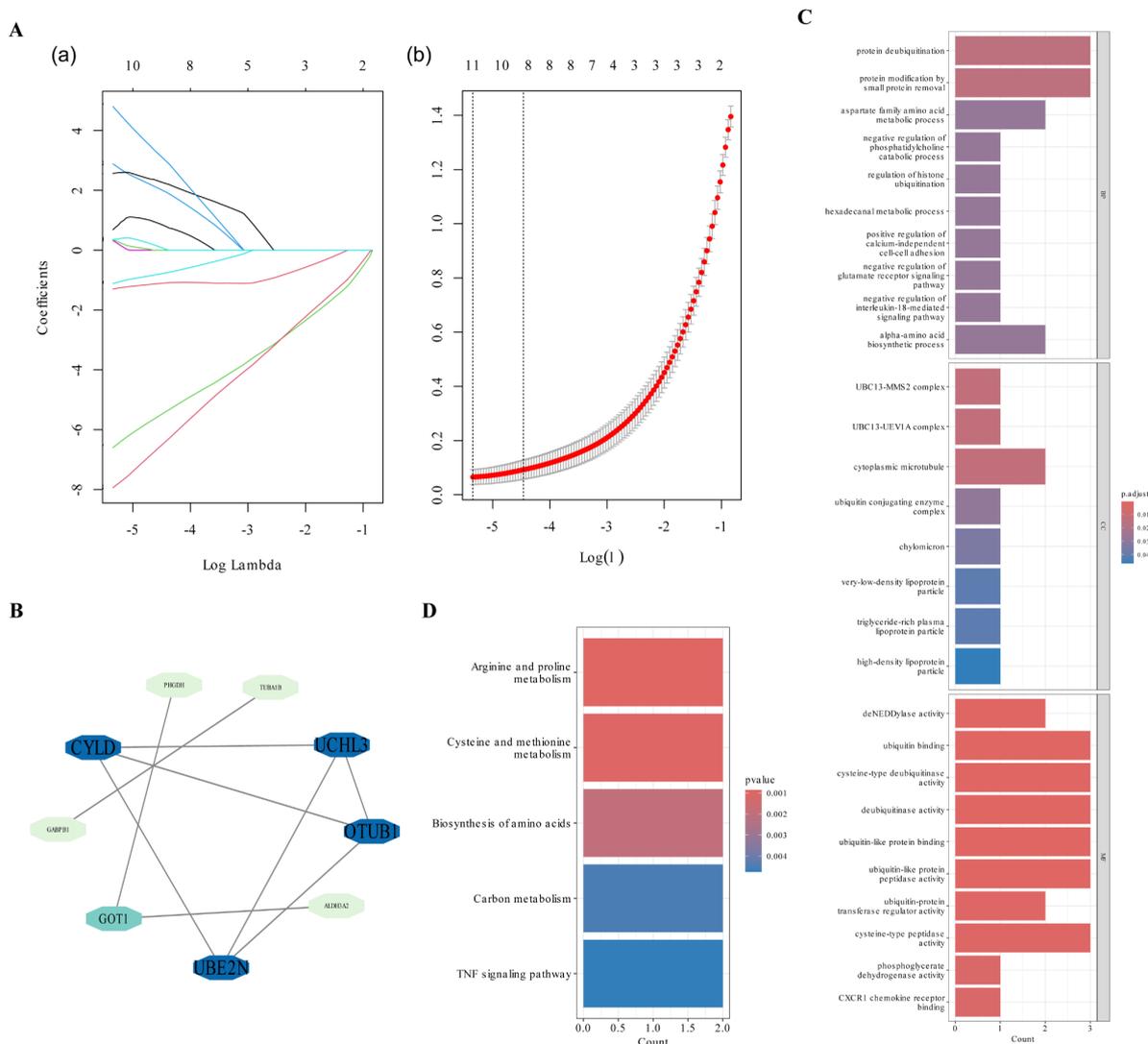
**图 3.** (A) 加权基因共表达网络分析(WGCNA)。(a) 样本聚类结果。(b) 基于拓扑重叠的基因聚类树状图，通过动态树切割来识别不同颜色表示的模块。(c) 软阈值选择和相应的无标度拓扑拟合指数和平均连接性，选择最佳软阈值以保持无标度的拓扑。(d) 热图显示不同模块与抑郁症的相关性，说明所识别的基因模块与抑郁症之间的关联，颜色强度表示相关性的强度和方向。(B) 显示候选核心基因的韦恩图，共鉴定出 64 个重叠基因作为候选目标基因。(C) 64 个候选目标基因的 PPI 网络分析

### 3.4. 功能富集分析

对上述 11 个关键基因进行 GO 与 KEGG 富集分析以探索其潜在功能。GO 分析显示，这些基因显著富集于以下生物过程：蛋白质去泛素化、氨基酸代谢、信号转导调控、细胞复合物组装等(图 4(C))。KEGG 通路分析则揭示这些基因主要涉及：精氨酸与脯氨酸代谢，半胱氨酸与蛋氨酸代谢，氨基酸生物合成，碳代谢，TNF 信号通路等炎症相关通路(图 4(D))，这些结果提示铁死亡相关基因可能通过调控多种代谢与免疫信号通路参与抑郁症的发生发展。

### 3.5. 蛋白质互作网络(PPI)分析

首先基于 64 个核心基因构建 PPI 网络, 发现 OTUB1 等基因位于网络中心, 显示其在蛋白互作中具有关键节点作用。进一步将 LASSO 筛选出的 11 个关键基因输入 STRING 数据库构建 PPI 网络, 并使用 Cytoscape (v3.9.0) 可视化, 识别出 OTUB1、GOT1、CYLD 为网络中连通度较高的枢纽基因(图 4(B))。



**Figure 4.** LASSO analysis and functional enrichment of core genes. (A) LASSO analysis of core genes. (a) Path plot of LASSO coefficients for key genes, illustrating the relationship between gene coefficients and the penalty parameter. (b) Cross-validation curve for LASSO regression, highlighting the optimal lambda value corresponding to the minimum partial likelihood deviance. (B) Protein-protein interaction (PPI) network analysis of the 11 core genes. (C) Gene Ontology (GO) enrichment analysis of core genes in the biological process (BP), cellular component (CC), and molecular function (MF) categories. (D) Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) enrichment analysis of core genes

**图 4.** (A) 核心基因的 LASSO 分析。(a) 关键基因 LASSO 系数的路径图, 说明基因系数与参数之间的关系。(b) LASSO 回归的交叉验证曲线, 突出显示与最小偏似然偏差对应的最佳 lambda 值。(B) 11 个核心基因的 PPI 网络分析。(C) BP、CC 和 MF 类别的 GO 富集分析。(D) KEGG 核心基因富集分析

### 3.6. 关键基因表达分析

基于 GSE20388 数据集, 对三个候选目标基因的表达量进行分析, 结果显示: CYLD 在 MDD 模型中

的表达量显著高于 Healthy 组( $P < 0.01$ ), GOT1 在 MDD 模型中的表达量显著高于 Healthy 组( $P < 0.001$ ), OTUB1 在 MDD 模型组中的表达量显著低于 Healthy 组( $P < 0.001$ ) (图 5)。提示这些基因可能在 MDD 相关铁死亡机制中扮演相反的调控角色。

### 3.7. 免疫浸润分析

采用 ssGSEA 算法对免疫细胞亚群在样本中的浸润情况进行估算。分析结果显示: 在 MDD 组中, 调节性 T 细胞(Tregs)显著上调, 未成熟树突状细胞(iDCs)表达上升, 单核细胞表达明显下调(图 6)。上述差异均有统计学意义, 提示 MDD 的免疫微环境发生显著改变, 可能与铁死亡相关基因的表达变化密切相关。

### 3.8. 动物实验验证

#### 3.8.1. 行为学评估

为验证抑郁模型, 构建 CUMS 模型后进行行为学检测。与对照组相比, 模型组小鼠表现出典型的抑郁行为学特征: 旷场实验(OFT)中总移动距离减少( $P < 0.01$ ), 悬尾实验(TST)中静止时间显著增加( $P < 0.05$ ), 强迫游泳实验(FST)中静止时间显著增加( $P < 0.001$ ), 表明 CUMS 模型构建成功, 抑郁样行为显著(图 7(B))。

#### 3.8.2. qRT-PCR 验证

进一步采用 qRT-PCR 检测关键基因在海马组织中的表达水平。结果与生物信息学分析一致: CYLD 在 MDD 模型中的表达量显著高于 Control 组( $P < 0.01$ ), GOT1 在 MDD 模型中的表达量显著高于 Control 组( $P < 0.05$ ), OTUB1 在 MDD 模型组中的表达量显著低于 Control 组( $P < 0.01$ ), GPX4 在 MDD 模型中的表达量显著低于 Control 组( $P < 0.001$ ) (图 7(A)~(C))。

#### 3.8.3. MDA 检测

在海马组织中检测脂质过氧化终产物 MDA 的含量, 结果显示模型组小鼠海马体 MDA 表达水平显著高于 Control 组( $P < 0.05$ ), 结合 PCR 结果: MDD 模型中 GPX4 表达下调, 提示模型小鼠发生铁死亡。

这些结果从分子层面进一步支持了 OTUB1、GOT1 和 CYLD 在抑郁症病理生理中的潜在关键作用, 为我们后续深入研究这些铁死亡相关基因在抑郁症中的具体功能提供了坚实的实验基础。

## 4. 讨论

近年来, 关于抑郁症的病理机制已有诸多探索, 包括神经递质失衡、神经可塑性受损、神经炎症等方面, 但在治疗策略上仍缺乏突破性进展, 尤其是缺乏明确且有效的分子靶点。本研究在探索抑郁症发病机制的过程中, 在慢性不可预见轻度应激(CUMS)抑郁小鼠模型海马体中观察到丙二醛(MDA)水平显著升高, 以及抗氧化相关基因 GPX4 表达下调, 鉴于 MDA 作为脂质过氧化终产物的标志性作用, 以及 GPX4 作为核心抗铁死亡酶的关键功能, 这些初步发现提示铁死亡这一独特的程序性细胞死亡方式可能在抑郁症的发生发展中扮演着重要角色。因此, 本研究基于生物信息学分析, 结合动物实验, 筛选并验证了与抑郁症密切相关的铁死亡关键基因, 并探讨其潜在的机制与治疗价值。

抑郁症作为一种常见的神经精神障碍性疾病, 其病理过程往往伴随着细胞死亡的调控异常[6]。铁死亡(Ferroptosis)是一种依赖铁离子、以脂质过氧化为特征的程序性细胞死亡方式, 近年来被广泛认为在多种神经系统疾病中发挥关键作用[7]。铁死亡的发生主要由三个因素驱动: (1) 细胞内游离铁水平异常升高; (2) 脂质过氧化物的异常积聚; (3) 抗氧化系统功能受损, 尤其是 GPX4 活性的下降[3] [8]。

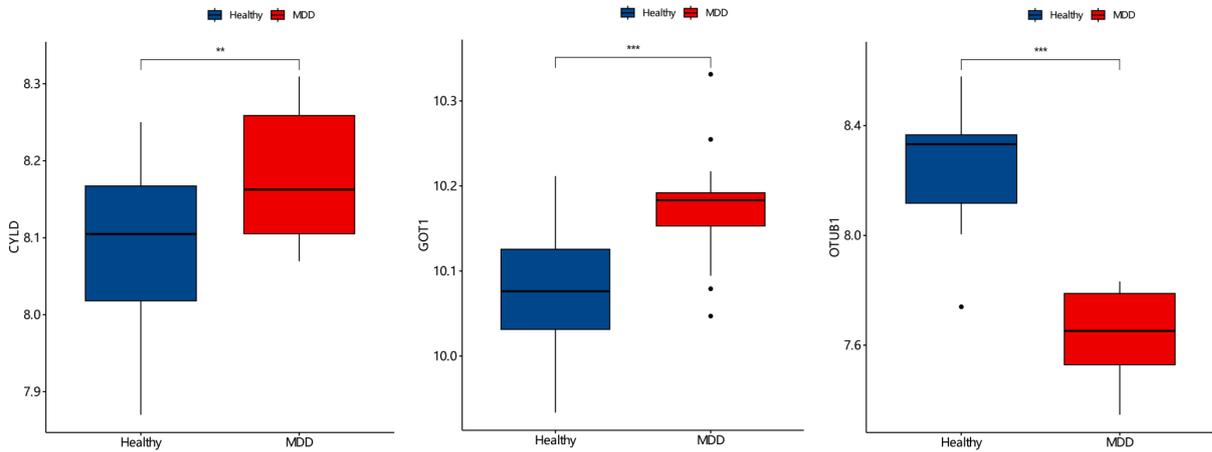


Figure 5. Expression levels of the three target genes were analyzed based on the GSE20388 dataset

图 5. 基于 GSE20388 数据集，分析了三个靶基因的表达水平

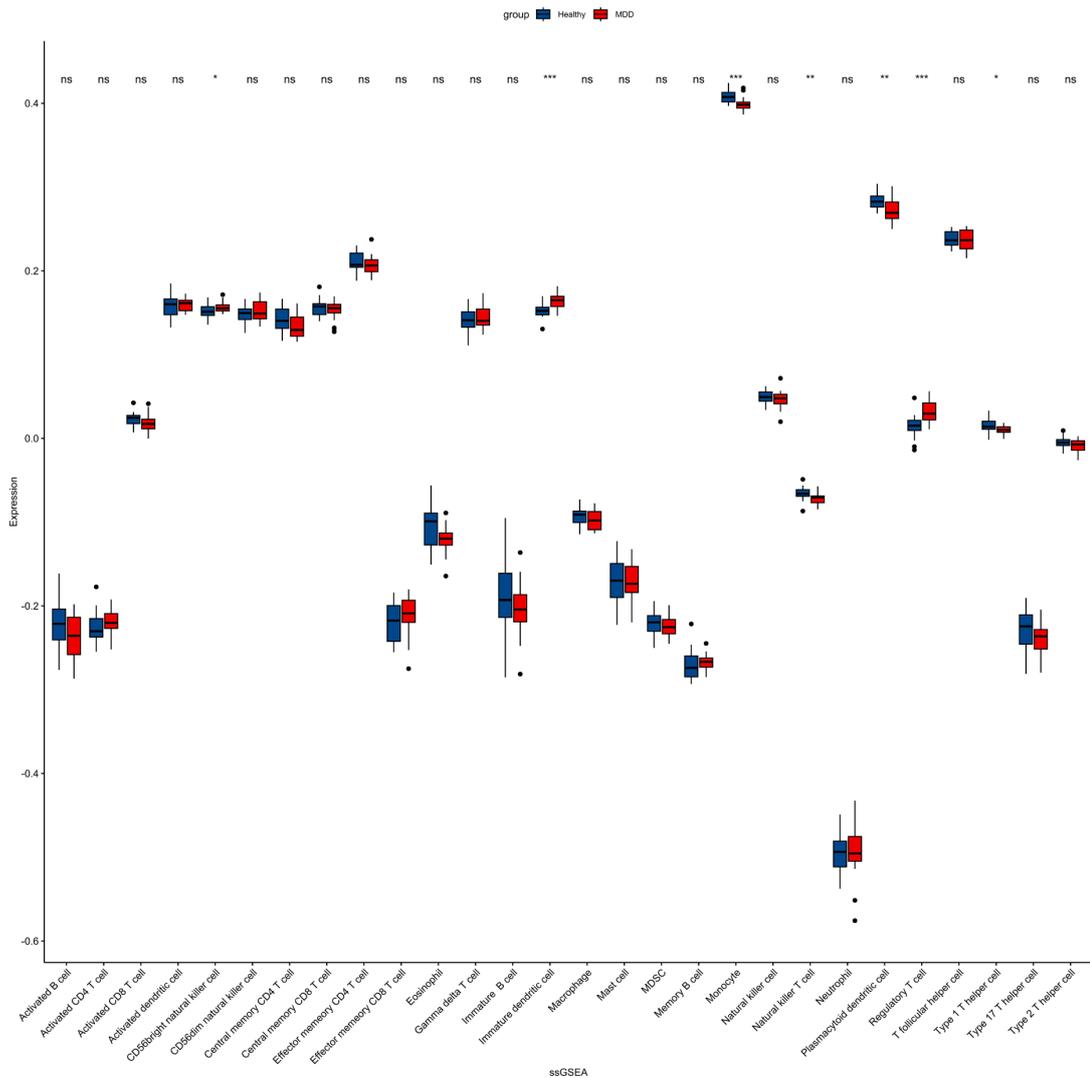
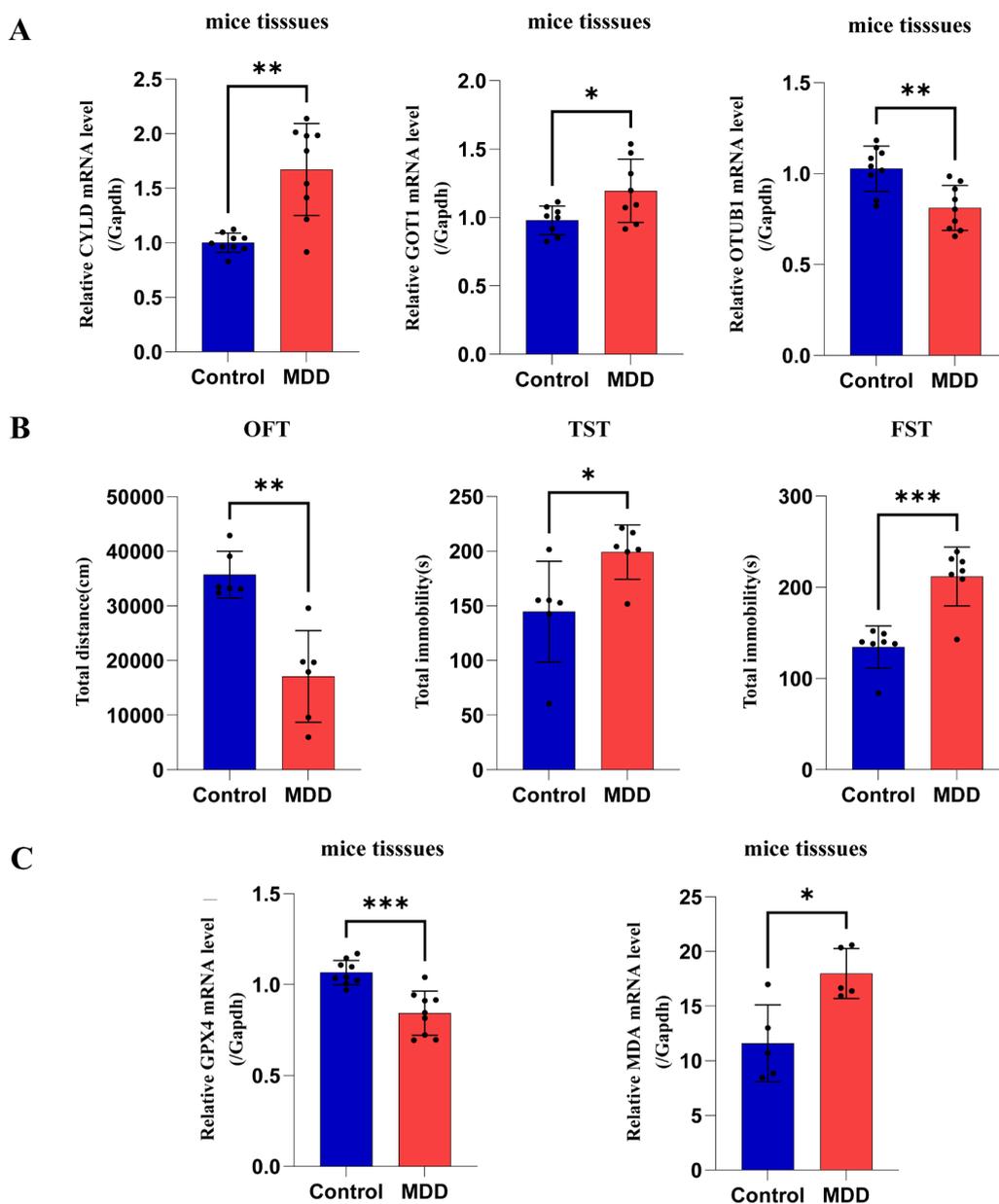


Figure 6. Boxplots illustrating the proportions of immune cells based on ssGSEA analysis

图 6. 基于 ssGSEA 分析的免疫细胞比例的箱式图



**Figure 7.** In vivo experimental results. (A) Expression levels of the three target genes in the mouse hippocampus. (B) Results of behavioral tests. (C) Expression levels of GPX4 and MDA in the mouse hippocampus

**图 7.** 动物实验结果。(A) 小鼠海马体中 CYLD、GOT1、OTUB1 mRNA 表达水平。(B) 行为学检测结果。(C) 小鼠海马体中 GPX4 和 MDA 的表达水平

本次实验中，我们选择在大鼠数据中进行生信筛选，是基于 GSE20388 作为经典抑郁模型数据集的质量和可靠性。随后在小鼠 CUMS 模型中验证，是为了检验这些发现在跨物种及跨病因(遗传性→环境诱导性)情境下的普适性。我们研究的核心通路，铁死亡、代谢，在哺乳动物中高度保守，这支持了该策略的科学合理性。实验结果的一致性也证明了我们发现的稳健性。我们成功筛选并确认了三个具有关键意义的铁死亡关键基因，它们分别是：第 63 位赖氨酸去泛素化酶(CYLD)、谷氨酸 - 草酰乙酸转氨酶 1 (GOT1) 以及泛素醛结合蛋白 1 (OTUB1)。这些基因不仅在抑郁症样本中呈现出差异表达，更在复杂的基因共表达网络中与疾病表型紧密关联。

## 4.1. CYLD

目前发现人类一共有 100 种去泛素化酶, 而第 63 位赖氨酸去泛素化酶(CYLD)是其中一种[9]。CYLD 属于泛素特异性蛋白酶(USP)半胱氨酸蛋白酶家族。以往的研究证明, CYLD 的失调与功能障碍能引起许多的疾病, 包括癌症, 感染性疾病和神经退行性疾病[10]。有研究表明, 具有高保守性的基因 CYLD 有着名为 M719V 的致病突变株, 且与人类额颞痴呆相关[11]。CYLD-M719V 基因过表达的小鼠表现出焦虑、抑郁样行为的增加和认知能力的下降[12]。此外, 另一项动物研究得出, CYLD 在大脑中高表达, 显著诱导焦虑行为[13]。然而, 2021 年王等人的研究指出, 氧化反应会抑制 CYLD 基因的功能活性[14]。而我们的研究结果得出, 在抑郁样小鼠模型中, 不仅发生了脂质过氧化反应, 而且 CYLD 基因表达量明显升高, 同时, 生信分析的结果也支持这一现象, 我们认为这一现象可能是反射性代偿过表达引起的。在免疫系统方面, 有诸多研究表明, CYLD 基因与 B 细胞、T 细胞、树突状细胞和调节 T 细胞的功能息息相关[15] [16]。而我们的实验的结果佐证了这一点, 在 CYLD 高表达的抑郁组中, 调节 T 细胞和未成熟树突状细胞明显高表达。这提示 CYLD 可能通过影响免疫细胞的功能, 间接参与抑郁症的病理过程。同样, CYLD 与铁死亡的发生密切相关, 近年, 有学者指出, CYLD 在前列腺癌中通过 Hippo/YAP 信号传导通路促进细胞铁死亡[17]。另有学者提出, SPATA2/CYLD 通路通过增强铁蛋白自噬, 进而促进铁死亡。CYLD 还参与微管结构的功能, 而微管结构的异常会促进细胞内铁离子的过载[4]。

总而言之, CYLD 作为一种去泛素化酶, 同时也是一种抑癌基因。我们认为, 虽然它通过增强癌细胞对铁死亡的敏感性消灭癌细胞, 但是如果这种利好功能在正常组织中高表达, 就成了危害健康的基因因素, 如在神经系统高表达, 就会引起焦虑、抑郁行为。在抑郁样模型小鼠的海马体中, 高表达的 CYLD 通过增强神经细胞的铁死亡敏感性, 促进其发生铁死亡, 进而引起抑郁症状。因此 CYLD 可能作为一种干预抑郁症的潜在靶点, 或许能有效改善抑郁症状。

## 4.2. GOT1

谷氨酸 - 草酰乙酸转氨酶 1 (GOT1)是一种与多种癌症和神经退行性疾病相关的基因。在我们的分析结果中, GOT1 是 KEGG 通路富集分析的关键基因, 分析结果显示, 它广泛参与了氨基酸的代谢与合成, 以及碳代谢。尤以精氨酸、脯氨酸、半胱氨酸和蛋氨酸为主。半胱氨酸和蛋氨酸都为体内含硫氨基酸, 且都有抗氧化作用[18]。众所周知, 半胱氨酸是合成谷胱甘肽过氧化物酶 4 (GPX-4)的必要原料, 而 GPX-4 是调控铁死亡的关键因子。因此有学者指出, 通过剥夺半胱氨酸和蛋氨酸可以增加小鼠细胞对铁死亡的敏感性[19]。所以我们认为, 影响半胱氨酸代谢的因素, 也能够间接地影响机体对铁死亡敏感性。我们的实验发现, GOT-1 作为影响半胱氨酸代谢因素, 在抑郁小鼠海马标本中高表达。但是我们并没有进一步去证明, GOT-1 对半胱氨酸的代谢是正性还是负性。精氨酸和脯氨酸代谢紊乱是抑郁症患者比较常见的代谢改变[20], 而我们的研究发现 GOT-1 同样参与了这一过程。在免疫方面, GOT-1 高表达的抑郁模型中, 调节 T 细胞的表达量显著增高提示 GOT1 可能通过代谢途径影响免疫细胞功能, 进而参与抑郁症的免疫病理机制。

## 4.3. OTUB1

泛素醛结合蛋白 1 (OTUB1)是去泛素化酶 OTU 家族中的核心成员[21]。目前的研究发现, OTUB1 在神经系统中有非常关键的调节作用。除外其去泛素化功能, OTUB1 也是一种淀粉样蛋白, 其寡聚体的结构与肌动蛋白有类似的作用, 可以通过细胞膜快速内化[22]。该结构是一种特定的分子形式, 可增强神经毒性、细胞骨架破坏、ROS 的突然释放和线粒体的损伤[23]。但是, 关于 OTUB1 的研究结论充满了争议。有研究发现, 当通过某种运动去上调海马区 OTUB1 表达时候, 可以改善老年小鼠的认知功能[24]。OTUB1 可以通过干扰 JAK/STAT 信号通路的激活, 抑制中枢神经系统的神经炎症[25]。有学者认为, 神

经炎症学说是抑郁症的核心机制之一[26]。而更加引人瞩目的是，铁死亡的激活会直接抑制 OTUB1 的表达，当进一步敲除 OTUB1 基因时，会诱导铁死亡的发生[27]。众所周知，SLC7A11 是铁死亡的关键调控因子，而 OTUB1 通过对 SLC7A11 去泛素化而抑制铁死亡[28]-[30]。不仅如此，人体抗铁死亡的关键蛋白 GPX4 的活性也密切依赖 OTUB1 的去泛素化作用[31]。OTUB1 在神经系统中的双重作用可能需要更多的临床证据去证实。我们的研究发现，不论是生信分析的结果还是抑郁模型小鼠海马体中的表达量，OTUB1 均显著低表达，提示在抑郁症当中，OTUB1 可能是一位“好演员”。在健康群体中，OTUB1 可能发挥着正常的去泛素化作用，稳定 SLC7A11 及 GPX4 的生物活性，进而对抗铁死亡的发生和进展，而在抑郁状态下，显著低表达的 OTUB1 使得机体失去了对抗铁死亡的保护作用。

#### 4.4. 研究局限性与未来展望

本研究成功验证了抑郁症中与铁死亡密切相关的三个关键基因 CYLD、GOT1 和 OTUB1，并对其潜在功能进行了探讨，但仍存在一定的局限性。我们未能进一步探讨可能相关的核心信号通路，仍需进一步研究。在后续研究中，会继续研究这些关键基因在抑郁症中的具体分子机制和信号通路。同时，由于项目周期所限，本次动物实验未能添加治疗组和铁死亡抑制剂组，添加铁死亡抑制剂干预实验是建立因果关系的理想方案，在后续的实验中，我们同样会补充这一点，为实现临床转化奠定坚实基础。

#### 5. 结论

在这项研究中，我们通过生物信息学分析方法和体内实验验证，探索了铁死亡和抑郁症之间的潜在联系。这项研究首次确定了三个与抑郁症相关的铁死亡基因：CYLD、GOT1 和 OTUB1，它们可能是抑郁症诊断和治疗的关键靶点，铁死亡可能是抑郁症的一种新机制。在此，为未来的研究和临床干预提供了新的理解。

#### 基金项目

内蒙古医学科学院公立医院科研联合基金科技项目，项目编号：2024GLLH0045。

#### 参考文献

- [1] Cui, Y., Fu, A., Wang, X., Tu, B., Chen, K., Wang, Y., *et al.* (2021) Hippocampal LASP1 Ameliorates Chronic Stress-Mediated Behavioral Responses in a Mouse Model of Unpredictable Chronic Mild Stress. *Neuropharmacology*, **184**, Article 108410. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2020.108410>
- [2] Cao, H., Zuo, C., Huang, Y., Zhu, L., Zhao, J., Yang, Y., *et al.* (2021) Hippocampal Proteomic Analysis Reveals Activation of Necroptosis and Ferroptosis in a Mouse Model of Chronic Unpredictable Mild Stress-Induced Depression. *Behavioural Brain Research*, **407**, Article 113261. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2021.113261>
- [3] Yu, Y., Yan, Y., Niu, F., Wang, Y., Chen, X., Su, G., *et al.* (2021) Ferroptosis: A Cell Death Connecting Oxidative Stress, Inflammation and Cardiovascular Diseases. *Cell Death Discovery*, **7**, Article No. 193. <https://doi.org/10.1038/s41420-021-00579-w>
- [4] Jiang, X., Stockwell, B.R. and Conrad, M. (2021) Ferroptosis: Mechanisms, Biology and Role in Disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **22**, 266-282. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-00324-8>
- [5] Yao, S., Zhong, Y., Xu, Y., Qin, J., Zhang, N., Zhu, X., *et al.* (2017) Quantitative Susceptibility Mapping Reveals an Association between Brain Iron Load and Depression Severity. *Frontiers in Human Neuroscience*, **11**, Article ID: 442. <https://doi.org/10.3389/fnhum.2017.00442>
- [6] Du, L., Wu, Y., Fan, Z., Li, Y., Guo, X., Fang, Z., *et al.* (2023) The Role of Ferroptosis in Nervous System Disorders. *Journal of Integrative Neuroscience*, **22**, Article No. 19. <https://doi.org/10.31083/j.jin2201019>
- [7] Dixon, S.J. and Pratt, D.A. (2023) Ferroptosis: A Flexible Constellation of Related Biochemical Mechanisms. *Molecular Cell*, **83**, 1030-1042. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2023.03.005>
- [8] Zheng, K., Dong, Y., Yang, R., Liang, Y., Wu, H. and He, Z. (2021) Regulation of Ferroptosis by Bioactive Phytochemicals: Implications for Medical Nutritional Therapy. *Pharmacological Research*, **168**, Article 105580.

- <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2021.105580>
- [9] Marin-Rubio, J.L., Raote, I., Inns, J., Dobson-Stone, C. and Rajan, N. (2023) CYLD in Health and Disease. *Disease Models & Mechanisms*, **16**, dmm050093. <https://doi.org/10.1242/dmm.050093>
- [10] Dai, W., Wu, F., McMyn, N., Song, B., Walker-Sperling, V.E., Varriale, J., *et al.* (2022) Genome-Wide CRISPR Screens Identify Combinations of Candidate Latency Reversing Agents for Targeting the Latent HIV-1 Reservoir. *Science Translational Medicine*, **14**, eabh3351. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abh3351>
- [11] Dobson-Stone, C., Hallupp, M., Shahheydari, H., Ragagnin, A.M.G., Chatterton, Z., Carew-Jones, F., *et al.* (2020) CYLD Is a Causative Gene for Frontotemporal Dementia—Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Brain*, **143**, 783-799. <https://doi.org/10.1093/brain/awaa039>
- [12] Zajicek, A.S., Ruan, H., Dai, H., Skolfield, M.C., Phillips, H.L., Burnette, W.J., *et al.* (2022) Cylindromatosis Drives Synapse Pruning and Weakening by Promoting Macroautophagy through Akt-mTOR Signaling. *Molecular Psychiatry*, **27**, 2414-2424. <https://doi.org/10.1038/s41380-022-01571-1>
- [13] Han, Y., Zhou, J., Guo, Z., Wu, Z., Zhang, Z., Liu, D., *et al.* (2023) Multiple Brain Regions Are Involved in Reaction to Acute Restraint Stress in CYLD-Knockout Mice. *Stress*, **26**, Article 2228925. <https://doi.org/10.1080/10253890.2023.2228925>
- [14] Wang, Y. and Wang, F. (2021) Post-Translational Modifications of Deubiquitinating Enzymes: Expanding the Ubiquitin Code. *Frontiers in Pharmacology*, **12**, Article ID: 685011. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.685011>
- [15] Srokowski, C.C., Masri, J., Hövelmeyer, N., Krembel, A.K., Tertilt, C., Strand, D., *et al.* (2009) Naturally Occurring Short Splice Variant of CYLD Positively Regulates Dendritic Cell Function. *Blood*, **113**, 5891-5895. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-08-175489>
- [16] Lee, J.H., Zou, L., Yang, R., Han, J., Wan, Q., Zhang, X., *et al.* (2021) The Deubiquitinase CYLD Controls Protective Immunity against Helminth Infection by Regulation of Treg Cell Plasticity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, **148**, 209-224.e9. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2020.10.042>
- [17] Gu, Y., Wu, S., Fan, J., Meng, Z., Gao, G., Liu, T., *et al.* (2024) CYLD Regulates Cell Ferroptosis through Hippo/Yap Signaling in Prostate Cancer Progression. *Cell Death & Disease*, **15**, Article No. 79. <https://doi.org/10.1038/s41419-024-06464-5>
- [18] Garrido Ruiz, D., Sandoval-Perez, A., Rangarajan, A.V., Gunderson, E.L. and Jacobson, M.P. (2022) Cysteine Oxidation in Proteins: Structure, Biophysics, and Simulation. *Biochemistry*, **61**, 2165-2176. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.2c00349>
- [19] Upadhyayula, P.S., Higgins, D.M., Mela, A., Banu, M., Dovas, A., Zandkarimi, F., *et al.* (2023) Dietary Restriction of Cysteine and Methionine Sensitizes Gliomas to Ferroptosis and Induces Alterations in Energetic Metabolism. *Nature Communications*, **14**, Article No. 1187. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-36630-w>
- [20] Du, Y., Wei, J., Zhang, Z., Yang, X., Wang, M., Wang, Y., *et al.* (2021) Plasma Metabolomics Profiling of Metabolic Pathways Affected by Major Depressive Disorder. *Frontiers in Psychiatry*, **12**, Article ID: 644555. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2021.644555>
- [21] Liao, Y., Yang, M., Wang, K., Wang, Y., Zhong, B. and Jiang, N. (2022) Deubiquitinating Enzyme OTUB1 in Immunity and Cancer: Good Player or Bad Actor? *Cancer Letters*, **526**, 248-258. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2021.12.002>
- [22] Jin, S., Kedia, N., Illes-Toth, E., Haralampiev, I., Prisner, S., Herrmann, A., *et al.* (2016) Amyloid- $\beta$ (1-42) Aggregation Initiates Its Cellular Uptake and Cytotoxicity. *Journal of Biological Chemistry*, **291**, 19590-19606. <https://doi.org/10.1074/jbc.m115.691840>
- [23] Kumari, R., Kumar, R., Kumar, S., Singh, A.K., Hanpude, P., Jangir, D., *et al.* (2020) Amyloid Aggregates of the Deubiquitinase OTUB1 Are Neurotoxic, Suggesting That They Contribute to the Development of Parkinson's Disease. *Journal of Biological Chemistry*, **295**, 3466-3484. <https://doi.org/10.1074/jbc.ra119.009546>
- [24] Kim, J.H., Liu, Q.F., Urnuhsaikh, E., Jeong, H.J., Jeon, M.Y. and Jeon, S. (2018) Moderate-Intensity Exercise Induces Neurogenesis and Improves Cognition in Old Mice by Upregulating Hippocampal Hippocalcin, Otub1, and Spectrin- $\alpha$ . *Molecular Neurobiology*, **56**, 3069-3078. <https://doi.org/10.1007/s12035-018-1239-x>
- [25] Zhu, Q., Fu, Y., Li, L., Liu, C.H. and Zhang, L. (2021) The Functions and Regulation of Otubains in Protein Homeostasis and Diseases. *Ageing Research Reviews*, **67**, Article 101303. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2021.101303>
- [26] Beurel, E., Toups, M. and Nemeroff, C.B. (2020) The Bidirectional Relationship of Depression and Inflammation: Double Trouble. *Neuron*, **107**, 234-256. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2020.06.002>
- [27] Wei, L., Li, Y., Tan, H., Peng, Y., Liu, Q., Zheng, T., *et al.* (2024) OTUB1 Regulates Ferroptosis to Inhibit Myoblast Differentiation into Myotubes by Deubiquitinating P62. *Scientific Reports*, **14**, Article No. 15696. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-66868-3>
- [28] Wang, S., Wang, Y., Li, Q., Li, X. and Feng, X. (2022) A Novel Circular RNA Confers Trastuzumab Resistance in

- Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Positive Breast Cancer through Regulating Ferroptosis. *Environmental Toxicology*, **37**, 1597-1607. <https://doi.org/10.1002/tox.23509>
- [29] Liu, L., Zhang, Y., Xu, D., Zhu, D., Zhou, Y., Chen, Z., *et al.* (2024) Overexpression of USP8 Inhibits Inflammation and Ferroptosis in Chronic Obstructive Pulmonary Disease by Regulating the OTUB1/SLC7A11 Signaling Pathway. *Allergologia et Immunopathologia*, **52**, 60-67. <https://doi.org/10.15586/aei.v52i4.1108>
- [30] Liu, C., Gan, Y., Yong, W., Xu, H., Li, Y., Hu, H., *et al.* (2024) OTUB1 Regulation of Ferroptosis and the Protective Role of Ferrostatin-1 in Lupus Nephritis. *Cell Death & Disease*, **15**, Article No. 791. <https://doi.org/10.1038/s41419-024-07185-5>
- [31] He, J., Li, M., Bao, J., Peng, Y., Xue, W., Chen, J., *et al.* (2024)  $\beta$ -Elemene Promotes Ferroptosis and Reverses Radioresistance in Gastric Cancer by Inhibiting the OTUB1-GPX4 Interaction. *Frontiers in Pharmacology*, **15**, Article ID: 1469180. <https://doi.org/10.3389/fphar.2024.1469180>