

网络出版时间: 2020-12-2 9:33 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20201201.1526.021.html>

◇ 临床医学研究 ◇

基于生物信息学分析子宫内膜异位症的潜在生物标志物和候选治疗药物

赵旭旭^{1,2}, 赵卫东^{1,2}, 张璟鹤³, 陈峥峥², 任萍萍¹, 张影¹, 葛丽², 于明月², 朱美玲¹

摘要 目的 探究子宫内膜异位症中差异表达基因(DEGs) 及其功能, 筛选潜在的生物标志物和候选治疗药物。方法 磁珠分选异位内膜和正常内膜组织中的基质细胞进行基因表达谱分析; 结合 GEO 数据库中可获取的同平台同类芯片数据, 利用 limma 软件包和经验贝叶斯方法筛选 DEGs, 并进行 GO 和 KEGG 富集分析; 查询 STRING 数据库, 进行 PPI 互作网络分析, 筛选核心致病基因; 再检索 CMAP 数据库, 筛得类药物小分子。结果 869 个基因在异位内膜中表达有显著差异, 其中 17 个上调表达, 852 个下调表达; GO 富集分析显示 DEGs 多调控受体配体活性、通道活性和被动跨膜转运蛋白活性等功能; KEGG 富集分析发现 DEGs 多介导神经活性配体-受体相互作用通路、细胞因子-细胞因子受体相互作用通路和 IL-17 信号通路等通路; PPI 网络表明 FPR2、SAA1、RLN3、CXCL8、FPR1、PF4、CCR7 和 CXCL5 共 8 个基因是核心致病基因; 经 CMAP 数据库分析认为硫代罗宁和氟

硝利嗪可能具有治疗内异症的潜在价值。结论 FPR2、SAA1、RLN3、CXCL8、FPR1、PF4、CCR7 和 CXCL5 共 8 个基因是子宫内膜异位症潜在的生物标志物, 硫代罗宁和氟硝利嗪是治疗子宫内膜异位症的候选药物。

关键词 子宫内膜异位症; 生物标志物; 候选治疗药物; 生物信息学

中图分类号 R711.71

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2020)12-1925-07
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.12.021

子宫内膜异位症(内异症)是妇科常见的慢性、炎症性、雌激素依赖性疾病,是导致育龄期女性出现盆腔疼痛、月经紊乱、组织粘连和不孕的主要原因^[1]。其在育龄期女性中的发病率为 5%~10%, 困扰着全世界约 1.76 亿女性^[2]。内异症确切的病因和发病机制尚不清楚, 缺乏特异性的治疗药物。被广泛接受的“经血逆流学说”认为有活性的子宫内膜组织可随逆流经血进入盆腔, 然后种植, 形成内异症。但经血逆流可发生在超过 90% 的输卵管未闭的月经来潮女性中, 而仅约 10% 的女性发病。鉴于异位内膜与正常内膜组织具有相似的组织结构和细胞组成, 因此异位内膜细胞自身特性的改变可能是发病的重要原因。该研究旨在检测正常内膜和卵巢内异症的异位内膜两组基质细胞的转录谱, 并结

2020-08-05 接收

基金项目: 安徽省自然科学基金项目(编号: 1708085MH184); 安徽省公益性研究联动计划项目(编号: 1604J0804010)

作者单位: ¹ 安徽医科大学附属省立医院妇产科, 合肥 230001

² 中国科学技术大学附属第一医院妇产科, 合肥 230031

³ 中国科学技术大学生命科学与医学部免疫研究所和中国科学院天然免疫与慢性疾病重点实验室, 合肥 230027

作者简介: 赵旭旭, 男, 硕士研究生;

赵卫东, 男, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: vic-torzhao@163.com

cancer LNCap cells were cultured *in vitro*, and treated with quercetin(0, 10, 40, 80 $\mu\text{mol/L}$) and methyltransferase inhibitor 5'-aza-dc(10 mol/L) as the control group. After 48 h, CCK-8 method was used to detect the inhibition rate of cell proliferation in each group. Cell apoptosis was detected by flow cytometry. Methylation status of GSTP1 gene was determined by methylation specific PCR(MSP). mRNA and protein expression of GSTP1 in LNCap cells were detected by real-time PCR and Western blot. **Results** The proliferation rate of LNCap cells decreased with the increase of quercetin dosage and time in a certain concentration range($P < 0.05$). The methylation of GSTP1 promoter in LNCap cells decreased($P < 0.05$). The expression level of GSTP1 increased($P < 0.05$). Moreover, the decrease of GSTP1 mRNA was negatively correlated with the methylation of GSTP1 gene($P < 0.05$). **Conclusion** Quercetin inhibited the growth and proliferation of LNCap cells by reducing the methylation of LNCap promoters.

Key words prostate cancer; quercetin; glutathione S transferase; proliferation

合公共数据库的基因表达谱数据,比较两组细胞的基因表达差异,分析介导疾病的主要通路和功能,筛选致病的关键基因和潜在生物标志物,并寻找候选的治疗药物。

1 材料与方法

1.1 病例资料 2018年10月—2019年5月就诊于安徽医科大学附属省立医院,因卵巢内异症行卵巢囊肿剥除手术的8例女性患者。对照组的正常内膜组织取自行子宫肌瘤手术的3例患者。选取的内膜组织均为晚期分泌期(最接近反流性子宫内膜)。纳入标准:①22~43(33.7±6.2)岁;②未绝经,平素月经规律;③无子宫内炎症。排除标准:①吸烟者;②有宫内节育器、慢性或免疫性疾病、凝血功能障碍和深静脉血栓病史;③术前6个月内接受过抗感染、免疫抑制治疗,激素治疗或抗凝血剂治疗。患者的一般临床资料见表1。所有的病理结果均由两位副主任病理医师共同诊断。本研究经安徽医科大学附属安徽省立医院伦理委员会审核通过(2019-ky066),并取得所有患者及其家属的知情同意。

表1 入组患者的临床资料

患者 编号	性别	年龄 (岁)	病理诊断	是否 首诊	ASRM 分期
1	女	28	卵巢异位内膜组织(左侧)	是	I期
2	女	27	卵巢异位内膜组织(右侧)	是	I期
3	女	36	卵巢异位内膜组织(左侧)	是	II期
4	女	32	卵巢异位内膜组织(右侧)	是	II期
5	女	26	卵巢异位内膜组织(右侧)	是	III期
6	女	30	卵巢异位内膜组织(右侧)	是	III期
7	女	28	卵巢异位内膜组织(左侧)	是	IV期
8	女	37	卵巢异位内膜组织(左侧)	是	IV期
9	女	43	正常卵巢组织	是	/
10	女	41	正常卵巢组织	是	/
11	女	43	正常卵巢组织	是	/

ASRM: 美国生殖医学学会

1.2 主要仪器及试剂 DMEM/F-12 购自美国 HyClone 公司; FBS 购自美国 Gibco 公司; IV型胶原酶和 I型脱氧核糖核酸酶购自美国 Sigma 公司; 青霉素-链霉素-两性霉素 B 购自北京索莱宝科技有限公司; CD10 抗体购自美国 BD 公司(PE/555375); 磁珠分选试剂盒和 LS 分离柱购自德国 Miltenyi 公司。

1.3 分离基质细胞 分离基质细胞步骤如下:①无菌条件下采集的新鲜正常内膜和异位内膜组织,置于冰浴的含 10% FBS 及三抗(青霉素 100 U/ml,链

霉素 0.1 mg/ml,两性霉素 B 0.25 μg/ml) 的 DMEM/F-12 培养液中,至实验室分离;② 1×PBS 洗 3 次,剪碎至直径小于 1 mm;③转至含 2.5 mg/ml 的 IV型胶原酶和 50 U/ml 的 I型脱氧核糖核酸酶的 DMEM/F-12 消化液中混匀,37℃消化 40 min;④经 100 目筛网滤除未消化的组织,600 r/min、4℃离心 10 min,去除混杂的白细胞和红细胞;⑤ 1×PBS 冲洗基质细胞,重悬备用。

1.4 磁珠分选 CD10 阳性基质细胞 磁珠分选 CD10 阳性基质细胞步骤如下:①对基质细胞离心计数,以 40 μl/10⁷ 个细胞的比例加入 MACS buffer 重悬;②吹匀悬液,以 10 μl/10⁷ 个细胞的比例加入 10 μl CD10 biotin-antibody cocktail,混匀,4℃避光标记 20 min;③MACS buffer 洗 1 次,4℃离心;④以 70 μl/10⁷ 个细胞的比例加入 MACS buffer 重悬细胞,以 20 μl/10⁷ 个细胞的比例加入 microbeads cocktail,4℃避光标记 20 min;⑤加入 MACS buffer 洗 1 次,4℃离心;⑥ MACS buffer 重悬,过 LS 柱子;⑦用 MACS buffer 冲洗挂柱细胞,4℃离心,得到纯化的 CD10 阳性基质细胞。

1.5 基因芯片数据的下载和处理 纯化的基质细胞,利用 GPL6480(G4112F; Agilent) 平台检测其全基因组表达谱。从基因表达谱综合数据库(GEO) 筛得基于同平台检测分泌期正常内膜和异位内膜基质细胞的 GSE120103 和 GSE3783 两组芯片,补充 9 个正常内膜组织(GSM3393491-GSM3393499) 和 14 个异位内膜组织(GSM3393500-GSM3393508, GSM928792, GSM928800, GSM928806, GSM928808, GSM928810)。依次用 Robust Multiarray Average 和 sva package 对 3 组芯片的原始数据进行预处理并消除批次差异,得到归一化的标准数据。采用 limma 软件包和经验贝叶斯方法筛选差异表达基因(differentially expressed genes, DEGs),其中 $P < 0.05$, $|\log_2 \text{Fold-change}| \geq 1.0$ 的基因被认为表达显著差异。芯片数据可从 GEO 数据库中获取(GSE132464)。

1.6 差异基因的功能富集分析 结合基因本体(GO) 数据库和京都基因与基因组百科全书(KEGG) 数据库,利用 clusterprofiler 软件包对 DEGs 富集通路和功能进行分析和可视化展示。符合错误发现率(FDR) < 0.05 且 $P < 0.05$ 的条件,被认为是差异有统计学意义的显著富集。

1.7 蛋白质-蛋白质相互作用(PPI) 网络的构建 将差异基因提交到在线数据库 STRING(<https://string-db.org/>),得到 PPI 数据。选择综合得分 >

0.7 的 PPI 节点构建 PPI 网络。利用生物信息学软件 Cytoscape v3.4.0(<http://www.cytoscape.org/>) 分析候选蛋白的交互关系,对各节点蛋白相互作用蛋白数目进行排序,筛选出核心靶点。

1.8 类药物小分子化合物的筛选 将差异基因分为上、下调两组,分别输入关联性图谱(CMAP, <http://www.broadinstitute.org/cmap/>) 数据库检索。比较差异基因与 CMAP 中小分子干扰基因的表达模式相似性,识别出与疾病相关的小分子化合物。 $P < 0.001$ 且 mean 绝对值 > 0.5 的小分子被认为与疾病显著相关。

1.9 统计学处理 使用 GraphPad Prism 8.0 统计数据和做图。所有的数据均使用双尾非配对 t 检验进行分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 异位内膜和正常内膜组织中 DEGs 的筛选 为筛选异位内膜和正常内膜组织中 DEGs,以 $P < 0.05$, $|\log_2 \text{Fold-change}| \geq 1.0$ 为条件,对 25 个样本(10 个正常内膜、15 个异位内膜)中 18 690 个基因的表达数据进行筛选。共筛得 869(4.6%) 个差异表达基因,包括 17 个上调基因和 852 个下调基因。见图 1A。利用 R 语言 gplots 包对差异基因进行聚类分析并可视化。见图 1B。

2.2 异位内膜组织中 DEGs 的功能注释和通路富集 为探究异位内膜组织中差异基因的功能,对其

进行 GO 和 KEGG 功能注释。GO 富集分析显示前 10 位变化条目包括受体配体活性、通道活性、被动跨膜转运蛋白活性、DNA 结合转录激活因子活性和 RNA 聚合酶 II 特异性、底物特异性通道活性、离子通道活性、离子门控通道活性、门控通道活性、细胞因子活性、神经递质受体活性。见图 2A。其中,仅 DNA 结合转录激活因子活性和 RNA 聚合酶 II 特异性在病灶中被上调。KEGG 通路富集分析发现,神经活性配体-受体相互作用通路、细胞因子-细胞因子受体相互作用通路、IL-17 信号通路、破骨细胞分化通路、金黄色葡萄球菌感染通路、尼古丁成瘾通路出现功能紊乱。见图 2B。结果表明异位内膜组织可能通过这些显著富集的功能条目和通路机制参与疾病的发生、发展。

2.3 异位内膜组织中差异基因 PPI 网络的构建 为深入挖掘异位内膜组织中核心的致病基因和潜在的生物标志物,将全部差异基因输入 STRING 数据库预测它们之间的相互作用网络。见图 3A。根据各网络节点的度(degree,表示网络中和节点相连路线的条数)筛选出与其他节点蛋白相关性最强的 8 个核心基因,包括甲酰肽受体 2(formyl peptide receptor 2, FPR2)、血清淀粉样蛋白 A1(serum amyloid A1, SAA1)、松弛肽 3(relaxin-3, RLN3)、细胞素 8(C-X-C motif chemokine 8, CXCL8/IL8)、甲酸基肽受体 1(formyl peptide receptor 1, FPR1)、血小板因子 4(platelet factor 4, PF4)、趋化因子受体 7(C-C chemo-

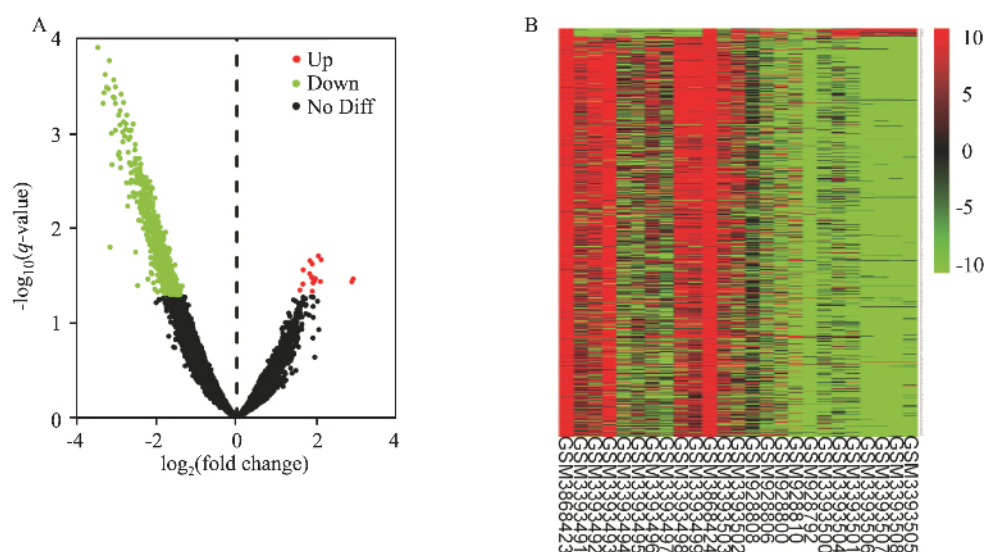


图 1 差异基因的筛选和聚类分析

A: 异位内膜组织与正常内膜组织间不同表达基因的火山图; B: 根据 $|\log_2 \text{FC}|$ 值筛选的 869 个差异基因的热图; Up: 上调基因; Down: 下调基因; NoDiff: 无明显差异基因

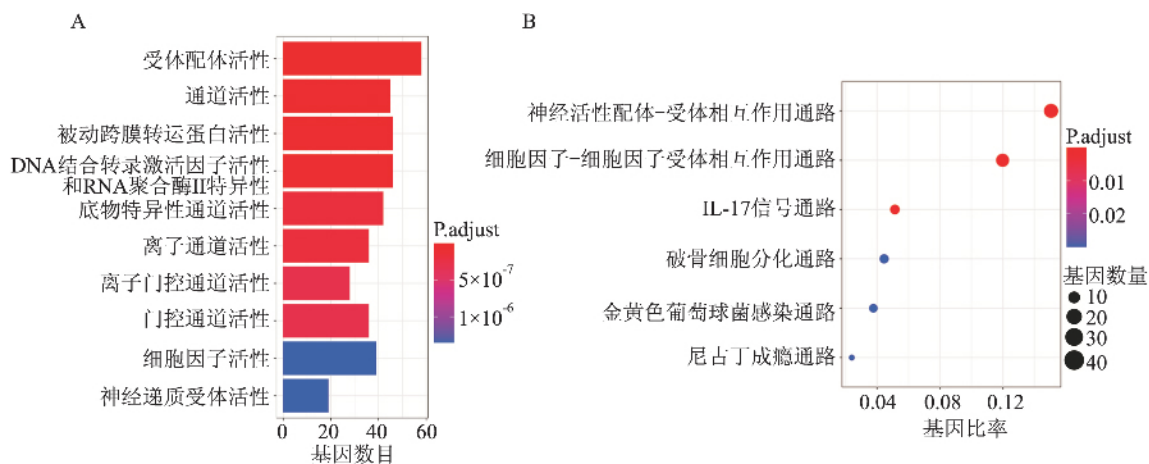


图2 差异基因的功能注释和通路富集分析

A: 上调和下调基因富集分析的前 10 个 GO 条目; B: 上调和下调基因富集分析的 6 条 KEGG 通路

kine receptor type 7, CCR7) 和趋化因子配体 5 (C-X-C motif chemokine 5, CXCL5) 基因。与其相互作用的关系对和基因如表 2 所示。利用小提琴图比较 8 个关键基因的表达变化, 结果显示它们在异位病灶中均下调, 以 FPR2、SAA1 和 CXCL8 基因的下调最显著 ($t = 3.537$, $P = 0.0018$; $t = 2.995$, $P = 0.0065$; $t = 2.187$, $P = 0.0392$; $t = 3.020$, $P = 0.0061$; $t = 2.256$, $P = 0.0339$; $t = 2.775$, $P = 0.0108$; $t = 2.178$, $P = 0.0399$; $t = 2.258$, $P = 0.0337$)。见图 3B。这些核心基因可能在异位内膜病灶的形成中起关键作用, 有望成为内异症潜在的生物标志物。

2.4 与内异症疾病相关的类药物小分子的筛选

为寻找治疗内异症的候选药物小分子, 并为进一步实验验证提供理论依据, 将异位内膜组织的差异基因表达谱与 CMAP 数据库进行比对。包括 Prestwick-692、硫代罗宁、氟硝利嗪、苯海索和喹吡罗在内的 5 个小分子化合物与内异症的关联性最强 (表 3)。其中, 硫代罗宁和氟硝利嗪与病灶中的差异基因具有相反的作用机制, 是拮抗内异症的潜在小分子化合物。而 Prestwick-692、苯海索和喹吡罗与内异症某些生物过程或状态有相似的关系, 与发病可能有类似的作用机制。硫代罗宁和氟硝利嗪的化学分子式、作用机制和临床应用见表 4。

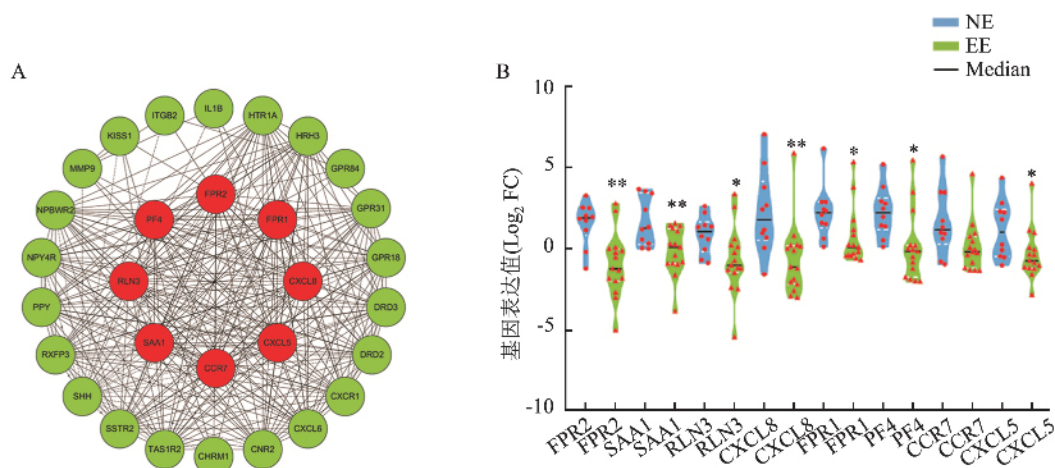


图3 核心差异基因的筛选及表达差异分析

A: PPI 网络的聚类分析筛选 8 个核心差异基因; B: 分别与正常子宫内层膜组比较, 8 个核心基因在异位内层膜组中表达差异的小提琴图; NE: 正常子宫内层膜组; EE: 异位子宫内层膜组; Median: 中位值; 与 NE 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

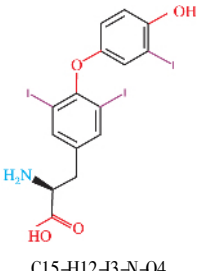
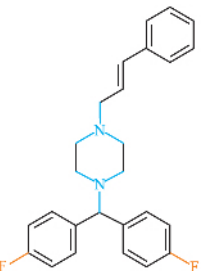
表2 8个核心基因相关的互作基因

核心基因	互作基因数量	互作基因
FPR2	37	CXCL8 FPR2 CXCR1 SAA1 SLC11A1 MCEMP1 GPR84 FCAR PF4 ITGB2 CXCL5 GPR18 P2RX1 CXCL6 EDN2 MGAM CCR7 GPR31 CNR2 CCKBR TAS1R2 DRD3 KISS1 CHRM1 CHRM5 DRD2 OXT SSTR2 KISS1R NTSR2 RXFP3 NPY4R PPY HRH3 RLN3 NPBWR2 HTR1A
SAA1	35	CXCL8 FPR2 FPR1 S100A12 CXCL5 CXCL6 PF4 NFKB2 CXCR1 CCR7 PPY CHRM1 HRH3 GPR18 OXT NPY4R NPBWR2 SSTR2 DRD3 RLN3 KISS1R CNR2 RXFP3 CHRM5 CCKBR GPR31 DRD2 HTR1A EDN2 KISS1 NTSR2 TAS1R2 APOC3 APOA4 CRP
RLN3	33	RXFP3 CRHR1 NPBWR2 MC3R NPY4R LHB PTH2 SSTR2 HTR1A PPY TAAR5 CCR7 GPR18 DRD3 TAS1R2 CXCL5 CXCL8 DRD5 GPR84 HRH3 PF4 HTR6 CXCR1 FPR2 CXCL6 SAA1 GPR31 GPR25 FPR1 DRD2 CNR2 HRH2 GPR45
CXCL8	30	CXCR1 IL1B FPR2 CCR7 SAA1 FPR1 PF4 CXCL6 CXCL5 MMP9 CNR2 HTR1A DRD2 CRP DRD3 PPY NPBWR2 NPY4R GPR18 SSTR2 GPR31 RLN3 HRH3 RXFP3 TAS1R2 IL1RN MMP1 FOS MUC5AC MMP3
FPR1	26	FPR2 SAA1 CXCL8 CXCR1 NPY4R PF4 CXCL5 GPR18 NPBWR2 CCR7 CXCL6 DRD3 DRD2 CHRM1 TAS1R2 SSTR2 CNR2 GPR31 HRH3 HTR1A PPY CEACAM6 RXFP3 RLN3 TREM1 AQP9
PF4	25	CXCR1 SERPINF2 CXCL8 CCR7 CXCL6 FPR2 FPR1 SAA1 CXCL5 ORM2 CNR2 GPR18 GPR31 NPBWR2 HRH3 TAS1R2 RLN3 DRD3 NPY4R PPY HTR1A RXFP3 SSTR2 DRD2 PHF12
CCR7	24	CXCL8 CXCL5 PF4 GPR18 CXCL6 CXCR1 FPR1 FPR2 CNR2 GPR31 SAA1 DRD3 DRD2 RLN3 SSTR2 RXFP3 HRH3 PPY NPY4R TAS1R2 NPBWR2 HTR1A CCL18 PRF1
CXCL5	24	CXCR1 CXCL8 CCR7 SAA1 CXCL6 FPR1 FPR2 PF4 CNR2 GPR31 GPR18 RLN3 NPBWR2 DRD3 HTR1A SSTR2 NPY4R HRH3 TAS1R2 RXFP3 DRD2 PPY IL1B MMP9

表3 CMAP 数据库筛选出的关联度最强的5种小分子化合物

化合物	关联系数	P 值
Prestwick-692	0.638	0.000 02
硫代罗宁	-0.664	0.000 18
氟硝利嗪	-0.596	0.000 3
苯海索	0.615	0.000 38
喹吡罗	0.544	0.000 72

表4 负相关小分子化合物的作用机理及应用

CMAP 名称	药物分子式	主要作用机制	主要应用
硫代罗宁		控制 DNA 转录和蛋白质合成, 促进糖异生, 增加糖原储藏的利用和动员, 并刺激蛋白质合成, 增加基础代谢率。	甲状腺功能减退的替代疗法, 辅助治疗甲状腺癌, 在轻度甲亢或甲状腺自主性抑制试验中作为诊断试剂。
氟硝利嗪		选择性钙进入阻滞剂, 具有钙调蛋白结合特性和组胺 H1 阻断活性。	预防偏头痛, 闭塞性周围血管疾病, 中枢和外周起源的眩晕, 并作为癫痫治疗的佐剂。

3 讨论

异内症作为一种慢性炎症性疾病,可引起严重

的慢性疼痛(痛经、性交困难、腹痛)和一系列生殖问题,长期困扰着世界各地数以百万计的女性。尽管越来越多的证据表明遗传、内分泌、免疫、微生物和环境因素与异内症的发病相关^[1],但明确内异症的病因、发病机制和开发特异性治疗药物仍是难点。

本研究表明异位内膜和正常内膜的基因表达谱整体相似,仅少部分基因差异表达,以下调基因为主。在异位内膜病灶中受体配体活性、细胞因子活性和神经递质受体活性的改变可能介导疾病的发生和疼痛的调节,神经活性配体-受体相互作用通路、细胞因子-细胞因子受体相互作用通路和 IL-17 信号通路等通路的调控紊乱也与疾病发生密切相关,这与之前的研究相符^[9]。深入分析病灶中的基因改变, FPR2、SAA1、RLN3、CXCL8、FPR1、PF4、CCR7 和 CXCL5 共 8 个基因被认为是关键的致病因素,是内异症潜在的生物标志物。本研究首次显示 SAA1 在人内异症病灶中的表达降低。已有研究表明 SAA 是由肝细胞产生和释放的一种急性期蛋白,参与维持黏膜组织中的免疫平衡,在肉牛子宫内膜的正常和炎症状态中均表达^[4]。炎症消退后 SAA1 的高表达被认为参与了子宫内膜组织中免疫平衡的重建,因此,人内异症中低表达的 SAA1 可能反应了组织中的炎症状态^[4]。与 Volpato et al^[4]的研究一致,本研究显示,在分泌晚期异位内膜中 FPR2 和 FPR1 的表达水平均降低。膜粘连蛋白 A1 激活甲酰基肽受体 2 /阿司匹林触发脂蛋白(FPR2 /ALX)可诱导 M1 型巨噬细胞向 M2 型分化,并减弱病灶中

IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 的表达。阻断 FPR1 和 FPR2/ALX 以及缺乏 ANXA1 都可导致腹腔血管平滑肌细胞中 IL-6 的生成增多,而 IL-6 水平与 NK 细胞的溶细胞活性呈负相关,其在降低内异症患者腹腔液中 NK 细胞的活性起至关重要的作用,有助于异位内膜细胞的存活和植入^[5]。已有报道^[6-7] 称内异症患者的血清和腹腔液中 CXCL8 的表达均升高,CXCL8 可通过促进血管生成和内膜细胞的附着、生长,在疾病发生中发挥作用。而该研究结果表明异位内膜组织中 CXCL8 的表达水平相较正常内膜下降。考虑到包括 CXCL8 在内的多种趋化因子配体可介导体内多种复杂的调控网络,如 IL-1 β 和 TNF- α 通过诱导 p38 MAPK 信号通路可介导 CXCL8 在异位内膜中的表达^[8],因此,CXCL8 在内异症中的价值仍需进一步验证。先前的研究^[9] 显示宫腔粘连的子宫内膜组织中 CXCL5 蛋白水平明显降低,CXCL5 的表达在维持正常内膜的功能、抑制宫腔粘连形成中具有重要作用。因此,CXCL5 在异位内膜病灶中的下调表达可能与内膜组织的损伤和粘连功能改变有关。CCR7 被报道^[10] 在内异症中的表达升高,CCL19/CCR7 轴可通过 PI3K/AKT 信号通路介导子宫内膜基质细胞中 B 细胞淋巴瘤因子 2 (BCL2)、基质金属蛋白酶 2 (MMP2) 和基质金属蛋白酶 9 (MMP9) 的表达,促进内膜基质细胞的增殖和侵袭。该研究结果与之相反,提示可能有其他通路途径参与调控 CCR7 在异位内膜病灶中的表达。RLN3 是一种肽激素,可通过 G 蛋白偶联受体信号传导途径介导人子宫内膜基质细胞的蜕膜化^[11]。目前尚无关于内异症中 RLN3 和 PF4 的研究报道。

治疗内异症,临床常推荐的避孕药、高效孕激素以及促性腺激素释放激素激动剂 (GnRH-a) 等多伴随一系列副作用,因此开发特异性强的靶向药物具有重要价值。筛得的硫代罗宁和氟硝利嗪被认为是拮抗内异症的潜在药物。硫代罗宁作用靶点包括甲状腺激素受体 α 蛋白、 β 蛋白和增殖细胞核抗原蛋白。细胞增殖已被证实在内异症中起至关重要的作用,藏红花素可通过靶向增殖细胞核抗原的表达抑制内异症的生长^[12]。因此,硫代罗宁可能具有类似藏红花素的功能——治疗内异症。氟硝利嗪的作用靶点包括电压依赖性 T 型钙通道亚基 α -1G、-1H、-1I 蛋白和组胺 H1 受体蛋白以及钙调蛋白。相比于正常内膜,异位内膜组织中钙调蛋白表达增高,其可通过钙调蛋白激活钙调磷酸酶/活化 T 细胞核因子通路介导 COX-2 的表达,参与内异症中异位内膜组

织的增殖^[13]。因此,作用于钙调蛋白的靶向剂氟硝利嗪可能在治疗内异症中具有潜在价值。

该研究使用生物信息学分析方法探究了内异症中多功能、多通路、多靶点的复杂致病因素,为进一步筛选疾病相关的生物标志物,阐明发病机制和开发靶向药物提供了新思路。

参考文献

- [1] Zondervan K T, Becker C M, Koga K, et al. Endometriosis [J]. Nat Rev Dis Primers, 2018, 4(1): 1-12.
- [2] Klemmt P A B, Starzinski-Powitz A. Molecular and cellular pathogenesis of endometriosis [J]. Curr Womens Health Rev, 2018, 14(2): 106-16.
- [3] Zheng W, Wu J, Gu J, et al. Modular characteristics and mechanism of action of herbs for endometriosis treatment in Chinese medicine: a data mining and Network pharmacology-based identification [J]. Front Pharmacol, 2020, 11: 147.
- [4] Foley C, Chapwanya A, Creevey C J, et al. Global endometrial transcriptomic profiling: transient immune activation precedes tissue proliferation and repair in healthy beef cows [J]. BMC Genomics, 2012, 13: 489.
- [5] Volpato L K, Horewicz V V, Bobinski F, et al. Annexin A1, FPR2/ALX, and inflammatory cytokine expression in peritoneal endometriosis [J]. J Reprod Immunol, 2018, 129: 30-5.
- [6] Cakmak H, Seval-Celik Y, Arlier S, et al. p38 Mitogen-activated protein kinase is involved in the pathogenesis of endometriosis by modulating inflammation, but not cell survival [J]. Reprod Sci, 2018, 25(4): 587-97.
- [7] Singh A K, Dutta M, Chattopadhyay R, et al. Intrafollicular interleukin-8, interleukin-42, and adrenomedullin are the promising prognostic markers of oocyte and embryo quality in women with endometriosis [J]. J Assist Reprod Genet, 2016, 33(10): 1363-72.
- [8] Persson T, Monsef N, Andersson P, et al. Expression of the neutrophil-activating CXC chemokine ENA-78/CXCL5 by human eosinophils [J]. Clin Exp Allergy, 2003, 33(4): 531-7.
- [9] Diao R, Wei W, Zhao J, et al. CCL19/CCR7 contributes to the pathogenesis of endometriosis via PI3K/Akt pathway by regulating the proliferation and invasion of ESCs [J]. Am J Reprod Immunol, 2017, 78(5): e12744.
- [10] Van der Westhuizen E T, Halls M L, Samuel C S, et al. Relaxin family peptide receptors—from orphans to therapeutic targets [J]. Drug Discov Today, 2008, 13(15-16): 640-51.
- [11] Liu Y, Qin X, Lu X. Crocin improves endometriosis by inhibiting cell proliferation and the release of inflammatory factors [J]. Biomed Pharmacother, 2018, 106: 1678-85.
- [12] Abraham F, Sacerdoti F, De León R, et al. Angiotensin II activates the calcineurin/NFAT signaling pathway and induces cyclooxygenase-2 expression in rat endometrial stromal cells [J]. PLoS One, 2012, 7(5): e37750.

(下转第 1935 页)

tistically significant between each two groups ($P < 0.05$). BlueSD showed statistically significant differences among all groups except the normal control group and the chronic hepatitis b cirrhosis group ($P < 0.05$), while the difference of blue mode and blue ave was statistically significant between each two groups ($P < 0.05$). There were statistically significant differences in FD-ratio between all groups except the normal control group and the non-alcoholic fatty liver group ($P < 0.05$). In chronic hepatitis b cirrhosis group, the ROC evaluation showed that the area under the curve (AUC) of red mode, red ave, blue mode and FD ratio (0.940, 0.990, 0.745, 0.920) were greater than 0.7, with higher diagnostic value. The corresponding critical values were 108.32, 111.19, 15.50, 126.84, 145.60, 26.82 and 0.16 respectively. In the non-alcoholic fatty liver group, the ROC evaluation showed that the AUC of each parameter (0.964, 0.951, 0.864, 0.894, 0.852, 0.749, 0.898) was greater than 0.7, indicating higher diagnostic value. The corresponding critical values were 100.64, 104.31, 13.95, 119.28, 126.99, 20.08 and 0.09 respectively. **Conclusion** As a new non-invasive and objective examination method, ASQ technology can not only quantitatively diagnose these two diseases, but also has high value in the diagnosis of non-alcoholic fatty liver disease.

Key words acoustic structure quantification technology; chronic hepatitis b cirrhosis; non-alcoholic fatty liver disease; receiver operating characteristic curve

(上接第 1930 页)

Investigation of potential biomarkers and candidate therapeutic drugs of endometriosis utilizing bioinformatics analysis

Zhao Xuxu^{1,2}, Zhao Weidong^{1,2}, Zhang Jinghe³, et al

(¹Dept of Obstetrics and Gynecology, Anhui Provincial Hospital Affiliated to Anhui Medical University, Hefei 230001; ²Dept of Obstetrics and Gynecology, The First Affiliated Hospital of University of Science and Technology of China, Hefei 230031; ³Institute of Immunology and The CAS Key Laboratory of Innate Immunity and Chronic Disease, School of Life Science and Medical Center, University of Science and Technology of China, Hefei 230027)

Abstract Objective To investigate the differentially expressed genes (DEGs) and their functions in endometriosis and to screen potential biomarkers and candidate therapeutic drugs. **Methods** The stromal cells in ectopic endometrium and normal endometrial tissue were sorted by magnetic beads and analyzed for gene expression profile. Combined with the similar chip data on the same platform available in the GEO database, the DEGs were screened using the limma software package and empirical Bayes method, and GO and KEGG enrichment analysis was performed. The STRING database was queried for PPI interaction network analysis to screen the core pathogenic genes. Then, the CMAP database was retrieved to screen the drug-like small molecules. **Results** There were significant differences in the expression of 869 genes in ectopic endometrium, of which 17 were up-regulated while 852 were down-regulated. GO enrichment analysis showed that the DEGs mainly regulated receptor ligand activity, channel activity and passive transmembrane transporter activity. KEGG enrichment analysis found that DEGs mostly mediated neuroactive ligand-receptor interaction pathway, cytokine-cytokine receptor interaction pathway and IL-17 signaling pathway. PPI network showed that FPR2, SAA1, RLN3, CXCL8, FPR1, PF4, CCR7 and CXCL5 were the core pathogenic genes. The CMAP database showed that thioronine and flunarizine had potential value in the treatment of endometriosis. **Conclusion** FPR2, SAA1, RLN3, CXCL8, FPR1, PF4, CCR7 and CXCL5 are potential biomarkers for endometriosis. Liothyronine and flunarizine are drug candidates for the treatment of endometriosis.

Key words endometriosis; biomarkers; candidate therapeutic drugs; bioinformatics