

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.35.007  
文章编号: 1005-8982 (2018) 35-0033-05

## 经共表达网络初探介入治疗后心房颤动的作用机制

吴晓峰

(青海省心脑血管病专科医院 心内科, 青海 西宁 810000)

**摘要: 目的** 探究加权基因共表达网络识别冠状动脉(以下简称冠脉)介入治疗后与心房颤动(AF)有关的基因模块。**方法** 选取青海省心脑血管病专科医院收治的4例冠脉介入治疗后发生AF患者和4例冠脉介入治疗后未发生AF患者的左心房组织。对其进行转录组测序并筛选出差异表达基因,应用加权基因共表达网络分析算法构建与AF有关的基因模块。**结果** 共识别824个差异表达基因及与患者临床表型有关的模块, *RCAN1* 和 *DNAJA4* 基因与AF严重程度有相关性。**结论** 构建共表达网络并从中筛选与AF有关的枢纽基因,能更好地理解这些枢纽基因在冠脉介入治疗后导致AF的作用。

**关键词:** 心房颤动; 冠状动脉疾病; 基因; 心房功能, 左; 算法

**中图分类号:** R541

**文献标识码:** A

## Preliminary investigation of regulatory mechanisms in atrial fibrillation after percutaneous coronary intervention with co-expression network

Xiao-feng Wu

(Department of Cardiology, Qinghai Provincial Hospital of Cardiovascular and Cerebrovascular Diseases, Xining, Qinghai 810000, China)

**Abstract: Objective** To investigate gene modules associated with atrial fibrillation after percutaneous coronary intervention. **Methods** The left atrial tissues of 4 patients with atrial fibrillation and 4 patients without atrial fibrillation after percutaneous coronary intervention were collected in Qinghai Provincial Hospital of Cardiovascular and Cerebrovascular Diseases. RNA-Seq was performed to screen out differentially-expressed genes (DEGs). Then gene modules related to atrial fibrillation were constructed using weighted gene co-expression network analysis algorithm. **Results** Totally 824 DEGs were identified, and several co-expression modules were significantly correlated with atrial fibrillation. Of note, two significant hub genes (*RCAN1* and *DNAJA4*) were identified in the gene module associated with the severity of atrial fibrillation. **Conclusions** Identification of hub genes for atrial fibrillation severity has implications for further understanding the molecular genetic basis of atrial fibrillation.

**Keywords:** coronary artery disease; atrial fibrillation; percutaneous coronary intervention; gene; algorithm

目前, 冠状动脉(以下简称冠脉)疾病患者在介入治疗时常伴有心律失常等不良反应。其中, 心房颤动(atrial fibrillation, AF)是最常见的持续性心律失常, 普通人群患病率为1%~2%<sup>[1-2]</sup>。AF患者的卒中风险较正常人群增加5倍, AF引起的缺血性卒中可能致命<sup>[3-6]</sup>。本研究将冠脉介入治疗后发生/未发生AF患

者各4例进行转录组测序, 分析这些样本差异表达的枢纽基因与临床表型(如AF等)之间的关系。

### 1 资料与方法

#### 1.1 一般资料

选取2016年5月—2017年5月青海省心脑血管

收稿日期: 2018-06-10

病专科医院收治的 AF 患者 14 例作为 AF 组, 选取同期医院收治的冠脉介入治疗后未发生 AF 患者 14 例作为非 AF 组。两组各 4 例患者的左心房组织用于转录组测序, 各 10 例患者的左心房组织用于基因表达的验证实验。在转录测序患者中, 房颤组男性 3 例, 女性 1 例; 平均年龄 (62.5 ± 3.7) 岁; 高血压 3 例; 非房颤组男性 2 例, 女性 2 例; 平均年龄 (59.2 ± 3.9) 岁; 高血压 1 例。AF 组与非 AF 组患者的一般资料比较, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 具有可比性。本研究经医院伦理委员会的审批同意, 患者均在知情同意书上签字。

## 1.2 方法

**1.2.1 高通量测序** 深圳华大基因生物信息科技有限公司通过 HiSeq 2000 测序仪 (美国 Illumina 公司) 完成了本研究的转录组测序 (RNA sequencing, RNA-Seq) 工作。

**1.2.2 测序数据的前处理** 利用 TopHat v2.01 软件, 比较参考基因和测序数据, 通常状况下序列的比对率要求  $>90\%$ <sup>[7]</sup>。以每百万读段的碱基片段 (fragments per kilo bases per million reads, FPKM) 评估基因表达的水平<sup>[8]</sup>。

**1.2.3 差异基因表达分析** 首先将冠脉介入治疗后两组患者左心房组织的基因表达水平进行比较, 应用 Cufflinks v2.2.1 软件挖掘出错误发现率 (the false discovery rate, FDR)  $< 0.05$  的差异表达基因, 每个差异表达基因经校正后的显著性 = 差异基因的 P 值 × 基因总数 / 最大 P 值对应的排序号<sup>[9]</sup>。

**1.2.4 加权基因共表达网络 (weighted gene co-expression network, WGCN) 分析** 运用 WGCN 来分析差异表达基因<sup>[10]</sup>。本研究提到的共表达网络的定义为: 1 个基因由 1 个节点代表, 在相同的基因网络中, 不同样本有共性表达, 通过其相关表达系数来衡量基因之间的共表达关系。① WGCN 的建立: 连接相关基因时, 选择权重的标准为  $p(i) \sim i^{-r}$ , 即连接数为  $i$  的概率  $p(i)$  与  $i$  的  $n$  次方成反比, 并且服从无尺度网络分布。对加权系数进行选择, 进而实现应用过程中无尺度网络分布。同时满足以下条件: 如果模块不同, 其中的基因平均连接度就高, 这个节点产生概率的对数值  $[\log p(i)]$  和连接点个数的对数值  $[\log(i)]$  呈负相关。② WGCN 构建的方法: 幂指数邻接函数被应

用于 WGCN 算法。应用邻接系数  $\alpha_{mn}$  这个指标可以衡量任何基因对的相关性, 也就是针对相关系数进行次方的幂指数加权:  $\alpha_{mn} = \text{power}(S_{mn} \beta) = |S_{mn}| \beta$ 。确定加权系数  $\beta$  要严格遵守无尺度网络原则, 指连接节点个数取对数  $[\log(k)]$  与节点出现的概率的对数值  $[\log p(k)]$  之间相关系数与 0.8 非常接近。把邻接函数参数  $\beta$  确定好以后, 随后转换相关矩阵  $S = |S_{mn}|$ 。③ 基因集模块与表型信息的关联: 计算得到基因模块特征值, 再计算模块的特征向量与关注表型的相关系数; 对于分组表型数据 (如疾病状态等), 可以首先定义用 t-test 计算每个基因在不同组 (如疾病组和正常组) 间基因比较有差异的 P 值, 并将 P 值以 10 为底的对数值定义为基因显著性, 再将模块内所有基因显著性值取平均数, 该数值即为模块的显著性 (module significant, MS)。MS 值越高说明这个模块与疾病之间的关联越高。④ 基因的显著性也可以定义为某个基因表达谱与表型信息的相关性。

## 1.3 qRT-PCR 检测枢纽基因的表达

用 Trizol 试剂裂解组织, 提取总 mRNA, 使用日本 TOYOBO 公司的逆转录试剂盒, 按说明书操作, 逆转录得到 cDNA 后, 进行 qRT-PCR 扩增检测, ABI7300 设置条件为: 95 °C 预变性 3 min, 95 °C 变性 2 s, 60 °C 延伸 30 s, 反应 40 个循环后扩增终止。

## 1.4 统计学方法

数据分析采用 R 2.39 统计软件, 计量资料以均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 比较用  $t$  检验, 相关分析用 Pearson 法,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

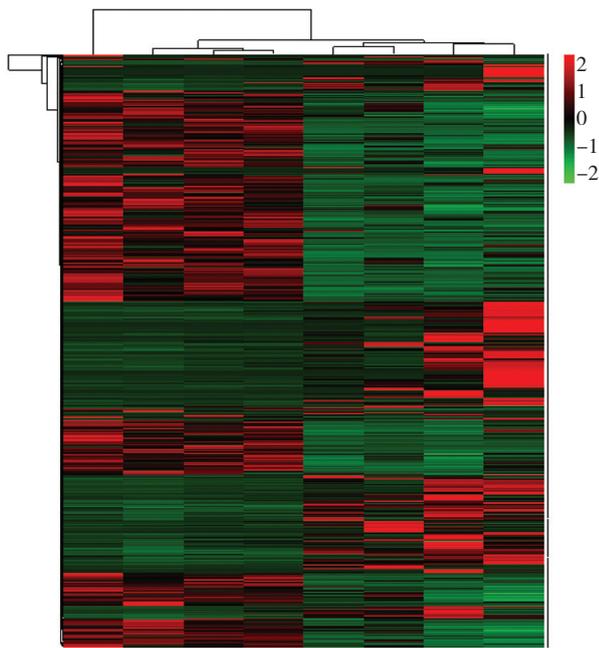
## 2 结果

### 2.1 两组患者差异表达基因分布

两组患者左心房组织的比较中展示了差异表达基因 FPKM 层次聚类图的分布情况, 聚类方式选用欧氏距离法 (见图 1)。本研究一共识别了 824 个差异表达基因, 其中上调基因 314 个, 下调基因 510 个。

### 2.2 基因模块的识别

通过动态剪切树法, 本研究将 824 个差异表达基因用于 WGCN 分析, 共识别 18 个基因模块。对每个基因模块的特征向量基因相似度进行分析, 最终得到了 8 个相似度较高的模块 (见图 2)。



红色代表高表达，绿色代表低表达。

图 1 两组患者差异表达基因分布

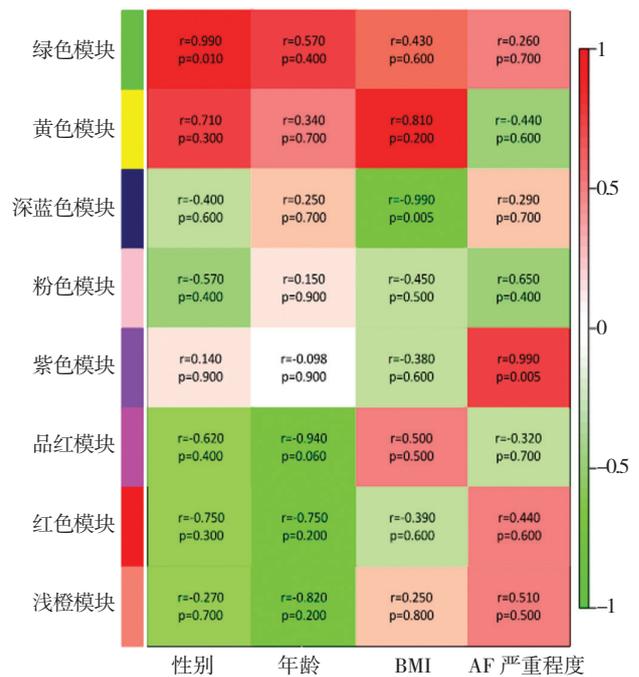
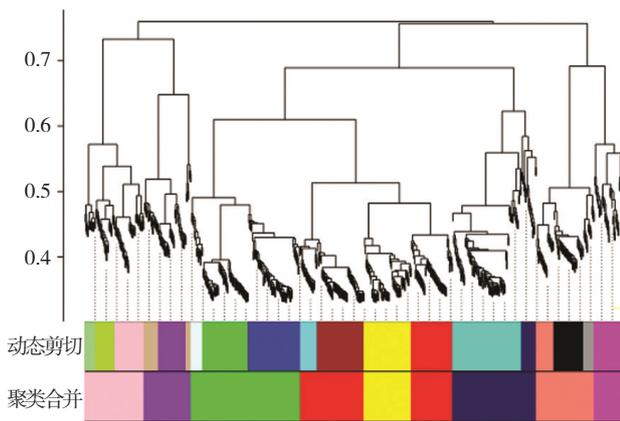


图 3 各基因模块与临床信息的相关性

附表 枢纽基因与 AF 严重程度的相关性参数

基因	$P$ 值	$q$ 值	$r$ 值	$Z$ 值
<i>RCAN1</i>	0.014	0.038	0.668	3.389
<i>DNAJA4</i>	0.021	0.038	0.769	3.452
<i>FHL2</i>	0.024	0.375	-0.956	-4.447
<i>BVES</i>	0.026	0.375	0.956	4.555
<i>CPEB3</i>	0.035	0.375	-0.967	-5.275
<i>NPPB</i>	0.058	0.375	0.945	4.029
<i>TBX5</i>	0.049	0.375	-0.952	-4.347
<i>GATA4</i>	0.058	0.375	-0.945	-4.029
<i>TBX5</i>	0.049	0.375	-0.952	-4.369

注： $q$  值代表校正后的  $P$  值； $Z$  值代表标准分数



不同颜色表示不同的基因模块，动态剪切为最初得到的模块，聚类合并为最终模块。

图 2 基因模块的识别

### 2.3 各基因模块与临床表型的相关性

紫色模块与 AF 严重程度具有相关性 ( $r = 0.990$ ,  $P = 0.005$ )。见图 3。

### 2.4 枢纽基因与 AF 严重程度的相关性

*RCAN1* 和 *DNAJA4* 基因在紫色模块中对 AF 的作用最强 (均  $q = 0.038$ )。见附表。

### 2.5 两组患者 *RCAN1* 和 *DNAJA4* 基因相对表达量比较

AF 组 *RCAN1* 基因相对表达量为  $(9.213 \pm$

$2.132)$ ，非 AF 组为  $(4.891 \pm 2.215)$ ，经  $t$  检验，差异有统计学意义 ( $t = 28.756$ ,  $P = 0.000$ )，AF 组高于未 AF 组。AF 组 *DNAJA4* 基因相对表达量为  $(0.983 \pm 0.321)$ ，非 AF 组为  $(5.263 \pm 0.538)$ ，经  $t$  检验，差异有统计学意义 ( $t = 30.756$ ,  $P = 0.000$ )，AF 组低于未 AF 组。见图 4。

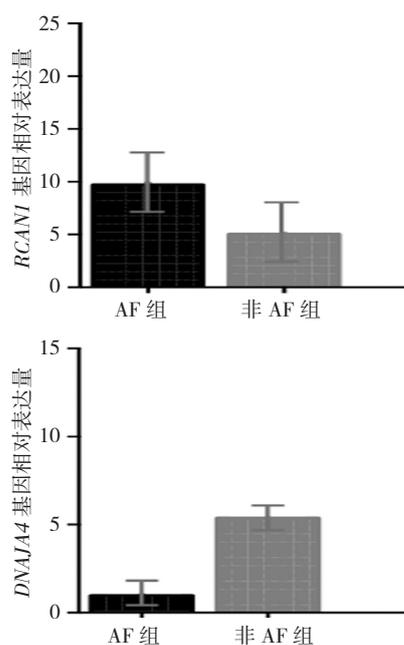


图 4 两组患者 *RCAN1* 和 *DNAJA4* 基因表达量比较  
( $n=4$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

### 3 讨论

随着高通量技术的快速发展及其在复杂性疾病研究中的广泛应用,为研究疾病的发病机制奠定了基础<sup>[11-14]</sup>。本研究对 10 例冠脉介入治疗后发生 AF 患者以及 10 例冠脉介入治疗后未发生 AF 患者的左心房组织进行 RNA-Seq 测序,并根据差异基因表达谱鉴定出与临床表型相关的基因集模块,发现两个枢纽基因 (*RCAN1* 和 *DNAJA4*) 的表达变化与 AF 严重程度显著相关。

之前有研究表明钙调神经磷酸酶是一种胞质  $Ca^{2+}$ /钙调蛋白依赖性蛋白磷酸酶,通过与 NFAT 和 L 型  $Ca^{2+}$  通道的相互作用刺激心脏肥大<sup>[15-16]</sup>。已知 *RCAN1* 可抑制钙调神经磷酸酶及其相关途径<sup>[17]</sup>。但有学者表明,当高度表达并且因此增强肥大信号传导时,*RCAN1* 可以替代地用作钙调神经磷酸酶激活剂<sup>[18]</sup>。因此,*RCAN1* 水平的摄动(归因于遗传变异或突变)可能导致功能异常转换,从而触发心房重构和心律失常发生。*DNAJA4* 调节 *KCNH2* 钾通道的运输和成熟,其在心脏复极化中具有重要作用,且涉及长 QT 综合征<sup>[19]</sup>。*FHL2* 与许多细胞组分相互作用,包括肌动蛋白细胞骨架,转录机制和离子通道<sup>[20]</sup>。*FHL2* 显示增强异丙肾上腺素的肥大作用,表明 *FHL2* 可能调节环境应激对心肌细胞生长的影响。*FHL2* 还与心脏中的几种钾通道如 *KCNQ1*、*KCNE1* 和 *KCNA5* 相互作

用<sup>[21]</sup>。此外,血管心外膜物质(blood vessel epicardial substance, BVES)和其家族其他成员被证明在心脏起搏细胞中高度表达。BVES 敲除小鼠显示窦性结节功能障碍,表明 BVES 调节心脏起搏和传导系统的发展,因此可能参与 AF 的早期发展阶段<sup>[22]</sup>。

本研究的几个缺陷:首先,没有足够大的人类左心房 mRNA 数据集存在。因此,本研究使用独立的数据集通过 PCR 方法验证 RNA-Seq 分析的结果,结果表明本研究识别的枢纽基因是可靠的。其次,缺少基因功能性试验,在后续的研究将深入探究该枢纽基因的功能验证。

总之,本研究运用了新技术 RNA-Seq 对有无 AF 发生的左心房组织的差异表达基因进行了 WGCN 分析,初步定位出冠脉介入治疗后与 AF 有关的枢纽基因为 *RCAN1* 和 *DNAJA4*。后续将对上述基因实施体内外功能验证,进一步阐明冠脉介入治疗后与 AF 发生的机制并制定防治手段。

### 参 考 文 献:

- [1] SHAH R, ZHOU E. Cardioversions and transthoracic echocardiography[J]. Anesthesiol Clin, 2017, 35(12): 655-667.
- [2] ZHANG Y, WU N Q, XU R X, et al. Elevated resting heart rate is associated with the severity of coronary artery disease in non-treated patients who underwent coronary angiography: potential role of lipoprotein subfractions[J]. Arch Physiol Biochem, 2017, 123(39): 356-363.
- [3] DE LUCA L, CASELLA G, RUBBOLI A, et al. Recent trends in management and outcome of patients with acute coronary syndromes and atrial fibrillation[J]. Int J Cardiol, 2017, 248(127): 369-375.
- [4] KANG S H, KIM J, PARK J J, et al. Risk of stroke in congestive heart failure with and without atrial fibrillation[J]. Int J Cardiol, 2017, 248(110): 182-187.
- [5] DOBREV D, CARLSSON L, NATTEL S. Novel molecular targets for atrial fibrillation therapy[J]. Nat Rev Drug Discov, 2012, 11(3): 275-291.
- [6] DOMINGUEZ F, CLIMENT V, ZORIO E, et al. Direct oral anticoagulants in patients with hypertrophic cardiomyopathy and atrial fibrillation[J]. Int J Cardiol, 2017, 248(89): 232-238.
- [7] TRAPNELL C, PACHTER L, SALZBERG S L. TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq[J]. Bioinformatics, 2009, 25(9): 1105-1111.
- [8] RAPAPORT F, KHANIN R, LIANG Y, et al. Comprehensive evaluation of differential gene expression analysis methods for RNA-seq data[J]. Genome Biol, 2013, 14(6): 95.
- [9] TRAPNELL C, ROBERTS A, GOFF L, et al. Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with

- TopHat and Cufflinks[J]. *Nature Protocols*, 2012, 7(2): 562-578.
- [10] LANGFELDER P, HORVATH S. WGCNA: an R package for weighted correlation network analysis[J]. *BMC Bioinformatics*, 2008, 9(2): 559.
- [11] PAN Q, LONG X, SONG L, et al. Transcriptome sequencing identified hub genes for hepatocellular carcinoma by weighted-gene co-expression analysis[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(2): 38487-38499.
- [12] TAN N, CHUNG M K, SMITH J D, et al. Weighted gene coexpression network analysis of human left atrial tissue identifies gene modules associated with atrial fibrillation[J]. *Circulation: Cardiovascular Genetics*, 2013, 6(1): 362-371.
- [13] SHI K, BING Z T, CAO G Q, et al. Identify the signature genes for diagnose of uveal melanoma by weight gene co-expression network analysis[J]. *Int J Ophthalmol*, 2015, 8(2): 269-274.
- [14] 姜晓峰. 高通量测序在临床分子诊断中的应用[J]. *检验医学*, 2017, 32(4): 250-254.
- [15] MACDONNELL S M, WEISSER-THOMAS J, KUBO H, et al. CaMKII negatively regulates calcineurin-NFAT signaling in cardiac myocytes[J]. *Circulation Research*, 2009, 105(67): 316-325.
- [16] TANDAN S, WANG Y, WANG T T, et al. Physical and functional interaction between calcineurin and the cardiac L-type Ca<sup>2+</sup> channel[J]. *Circulation Research*, 2009, 105(72): 51-60.
- [17] LIU Q, BUSBY J C, MOLKENTIN J D. Interaction between TAK1-TAB1-TAB2 and RCAN1-calcineurin defines a signalling nodal control point[J]. *Nat Cell Biol*, 2009, 11(4): 154-161.
- [18] SHIN S Y, YANG H W, KIM J R, et al. A hidden incoherent switch regulates RCAN1 in the calcineurin-NFAT signaling network[J]. *J Cell Sci*, 2011, 124(80): 82-90.
- [19] AHRENDT E, BRAUN JEA. Channel triage: Emerging insights into the processing and quality control of hERG potassium channels by DnaJA proteins 1, 2 and 4[J]. *Channels (Austin)*, 2010, 4(1): 335-336.
- [20] JOHANNESSEN M, MØLLER S, HANSEN T, et al. The multifunctional roles of the four-and-a-half-LIM only protein FHL2[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2006, 63(26): 268-284.
- [21] CHU P H, CHEN J. The novel roles of four and a half LIM proteins 1 and 2 in the cardiovascular system[J]. *Chang Gung Med J*, 2011, 34(9): 127-134.
- [22] FROESE A, BREHER S S, WALDEYER C, et al. Popeye domain containing proteins are essential for stress-mediated modulation of cardiac pacemaking in mice[J]. *J Clin Invest*, 2012, 122(95): 1119-1130.

(李科 编辑)