

· 实验研究 ·

铁死亡在翼状胬肉中作用的生物信息学分析

张宇航 孙潮动 徐素 司玮 毛一 邵敬芝 杜珊珊 张凤妍

郑州大学第一附属医院眼科, 郑州 450000

通信作者: 张凤妍, Email: zhangfengyanx@aliyun.com

【摘要】 目的 利用生物信息学方法探索翼状胬肉组织中铁死亡相关基因。 **方法** 从基因表达综合数据库下载翼状胬肉基因表达谱数据集 GSE2513, 筛选与铁死亡相关的差异表达基因 (DEGs), 通过基因本体论 (GO) 和京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 对 DEGs 进行功能注释和富集分析。通过 LASSO 逻辑回归分析和支持向量机递归特征消除 (SVM-REF) 从 DEGs 中识别枢纽基因, 对枢纽基因进行单基因 GSEA 分析并构建竞争性内源 RNA 互作网络, 以确定枢纽基因的 RNA 调控关系。收集 2022—2023 年于郑州大学第一附属医院行手术治疗的翼状胬肉患者 9 例 9 眼的翼状胬肉组织和斜视患者 9 例 9 眼的结膜组织, 采用实时荧光定量 PCR 法检测枢纽基因和铁死亡相关标记基因的表达量。 **结果** 基因数据集中, 37 个铁死亡相关基因的表达存在显著差异, 其中包括 16 个表达显著升高的基因和 21 个低表达基因。GO 分析显示, DEGs 主要富集在细胞对外界刺激的反应、对营养水平的反应、对细胞外刺激的反应、对氧化应激的反应和对饥饿的反应、转录调节复合物和 RNA 聚合酶 II 转录调节复合物、RNA 聚合酶 II 特异性转录和 DNA 结合转录。KEGG 分析显示, DEGs 主要富集于铁死亡和 NOD 样受体信号通路。LASSO 回归分析筛选出 *DUOX2*、*ATF3*、*NDRG1*、*EGR1* 和 *ALDH3A2* 枢纽基因, SVM-REF 分析筛选出 *NDRG1*、*NF2*、*IDH2*、*DUOX2*、*CHP1*、*ATF3* 和 *SREBF1* 枢纽基因, 取其交集共获得 3 个枢纽基因 *DUOX2*、*ATF3* 和 *NDRG1*。单基因 GSEA 分析显示, *DUOX2* 在细胞黏附分子 CAMs、硫酸乙酰肝素糖胺聚糖生物合成通路、糖胺聚糖生物合成神经节系列通路中富集。*ATF3* 和 *NDRG1* 在 PPAR 等信号通路中富集。与正常结膜组织比较, 翼状胬肉组织中铁死亡相关标记基因 *PTGS2* 和 *TFRC* mRNA 相对表达量升高, *FTH1*、*GPX4*、*SLC40A1*、*HSPB1* 和 *NFE2L2* mRNA 相对表达量降低, 差异均有统计学意义 ($t=12.220, 16.580, 5.664, 6.455, 8.691, 9.883, 17.590$, 均 $P<0.01$)。 **结论** 铁死亡可能在翼状胬肉发病过程中发挥重要作用, *DUOX2*、*ATF3* 和 *NDRG1* 可能是影响这一复杂过程的枢纽基因。

【关键词】 翼状胬肉; 铁死亡; 生物信息学; 生物标志物; 差异表达基因

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20250304-00066

Role of ferroptosis in pterygium based on bioinformatic analysis

Zhang Yuhang, Sun Chaodong, Xu Su, Si Wei, Mao Yi, Shao Jingzhi, Du Shanshan, Zhang Fengyan

Department of Ophthalmology, The First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450000, China

Corresponding author: Zhang Fengyan, Email: zhangfengyanx@aliyun.com

[Abstract] Objective To investigate ferroptosis-related genes in pterygium tissue by using bioinformatic analysis. **Methods** The pterygium gene expression profile dataset GSE2513 was downloaded from the Gene Expression Omnibus Database to identify differentially expressed genes (DEGs) related to ferroptosis. Functional annotation and enrichment analysis of the DEGs were performed using Gene Ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG). Hub genes were identified from the DEGs using LASSO logistic regression analysis and a support vector machine recursive feature elimination (SVM-REF). Single-gene GSEA analysis was performed on hub genes and a competitive endogenous RNA interaction network was constructed to determine the RNA regulatory relationships of the hub genes. Pterygium tissue samples from 9 patients (9 eyes) undergoing pterygium surgery and conjunctival tissue samples from 9 patients (9 eyes) undergoing strabismus surgery who visited the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University were collected from 2022 to 2023 during surgery, and the expression of hub genes and ferroptosis-related marker genes was detected by fluorescence quantitative PCR. This study followed the Declaration of Helsinki, and the study protocol was reviewed and approved by the Ethics Committee of the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University (No. 2022-KY-0006-001). **Results** In the dataset, there were 37 ferroptosis-related genes with significant expression differences, including 16 upregulated genes and 21 downregulated genes. GO analysis revealed significant enrichment in responses to external stimuli, responses to nutritional levels, responses to extracellular stimuli, responses to oxidative stress and starvation, transcription regulatory complexes, and

RNA polymerase II transcription regulatory complexes, RNA polymerase II-specific transcription, and DNA-binding transcription. KEGG analysis showed that the DEGs were primarily enriched in ferroptosis and NOD-like receptor signaling pathways. LASSO regression analysis identified *DUOX2*, *ATF3*, *NDRG1*, *EGR1*, and *ALDH3A2* as hub genes, and SVM-REF analysis identified *NDRG1*, *NF2*, *IDH2*, *DUOX2*, *CHP1*, *ATF3*, and *SREBF1* as hub genes. *DUOX2*, *ATF3*, and *NDRG1* were identified as the intersection hub genes. Single-gene GSEA analysis revealed that *DUOX2* was enriched in the cell adhesion molecule CAMs pathway, the heparan sulfate glycosaminoglycan biosynthesis pathway, and the glycosaminoglycan biosynthesis ganglioside series pathway. *ATF3* and *NDRG1* were enriched in the PPAR signaling pathway and other pathways. Compared with normal conjunctival tissue, the relative expression levels of the ferroptosis markers *PTGS2* and *TFRC* mRNA were increased in pterygium tissue, while the relative expression levels of *FTH1*, *GPX4*, *SLC40A1*, *HSPB1*, and *NFE2L2* mRNA were decreased, with statistically significant differences ($t = 12.220, 16.580, 5.664, 6.455, 8.691, 9.883, 17.590$; all $P < 0.01$). **Conclusions** Ferroptosis may play an important role in the pathogenesis of pterygium. *DUOX2*, *ATF3*, and *NDRG1* may be the hub genes affecting this complicated process.

[Key words] Pterygium; Ferroptosis; Bioinformatics; Biomarkers; Differentially expressed genes

DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20250304-00066

翼状胬肉是人类特有的眼表疾病,在其发生和发展过程中,结膜上皮细胞异常增殖并向角膜表面侵袭,伴随鳞状化生、杯状细胞增生和基质新生血管形成,呈现出类肿瘤样的组织形态和生物学特征^[1]。随着翼状胬肉逐渐增大,其可引起眼部异物感、干涩、刺痛等不适症状,随着病程的进展,可导致屈光改变、干眼和眼球运动受限,当翼状胬肉侵犯角膜中央时,会严重影响患者视觉质量。手术是翼状胬肉的首选治疗方案,但术后复发率高,传统裸巩膜技术的复发率为 38%~88%,自体结膜移植术的复发率为 5%~82%,应用羊膜的复发率为 6%~40%^[2-6],复发性病例的治疗更具挑战。近年来,自体角膜缘结膜移植术等技术的进步以及各种辅助治疗方法的改进有助于降低翼状胬肉复发率^[7-10]。然而,这些治疗手段仍无法完全避免手术相关并发症的风险^[11]。单纯依赖手术干预难以从根本上解决翼状胬肉的复发问题,深入探讨其发病过程中的遗传差异及潜在分子机制对其治疗及预后具有重要意义。

关于翼状胬肉的发病机制,目前尚未完全明确。近年来,研究表明翼状胬肉进展过程中活性氧(reactive oxygen species, ROS)表达增加和谷胱甘肽(glutathione, GSH)水平降低,提示氧化应激在翼状胬肉的发病中起重要作用^[12-13]。铁死亡是由氧化应激驱动的一种非经典细胞死亡方式^[14]。铁死亡主要特征表现为细胞内铁蓄积、脂质过氧化、GSH 耗竭以及铁依赖性 ROS 过度生成,导致细胞抗氧化能力下降^[15]。然而,铁死亡在翼状胬肉的异常增殖和组织重塑中的作用尚不明确。因此,本研究拟采用生物信息学方法筛选翼状胬肉发生和发展过程中的差异表达基因(differentially expressed genes, DEGs),并通过构建机

器学习模型识别铁死亡相关的枢纽基因,探讨翼状胬肉铁死亡的潜在机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 数据来源 从公开的 GEO 数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)下载翼状胬肉基因表达谱数据集 GSE2513。GSE2513 基于 GPL96 平台,包含 4 组对照结膜样本和 8 组翼状胬肉样本。基于相应的矩阵信息将基因 ID 转换为基因符号,所有探针 ID 也均注释为基因符号,采用基因表达的平均值来反映具有相同基因符号的多个探针的值。本研究确保按照引文指南(www.kegg.jp/kegg/kegg1.html)引用数据,并获得 Kanehisa 实验室许可。

1.1.2 临床样本收集 纳入 2022—2023 年于郑州大学第一附属医院眼科就诊的具有明确临床特征且符合翼状胬肉诊断的患者 9 例 9 眼,其中男 7 例 7 眼,女 2 例 2 眼,收集术中切除的翼状胬肉组织;同期纳入拟行斜视手术的斜视患者 9 例 9 眼,其中男 1 例 1 眼,女 8 例 8 眼,术中收集正常结膜组织作为对照。所有手术均由同一经验丰富的医师完成。翼状胬肉组和对照组平均年龄分别为(44.56±4.39)和(27.87±8.42)岁,组间比较差异有统计学意义($t = 5.266, P < 0.001$);2 个组性别构成比的比较差异有统计学意义($P = 0.004$)。本研究遵循《赫尔辛基宣言》,所有患者均签署知情同意书,研究方案经郑州大学第一附属医院伦理委员会审核批准(批文号:2022-KY-0006-001)。

1.2 方法

1.2.1 铁死亡相关 DEGs 的筛选 从铁死亡 FerrDb 数据库(<http://www.zhounan.org/ferrdb/legacy/index>。

html) 共获取 728 个铁死亡相关基因,包括驱动基因、抑制基因和标记基因。从 GSE2513 芯片数据文件中提取铁死亡相关基因的表达水平。采用 R 软件的 limma 包对芯片数据中所有铁死亡相关基因表达进行经典贝叶斯分析,获得相应的 *P* 值和差异倍数 (fold change, FC) 值以及 Benjamini-Hochberg 校正的 *P* 值。铁死亡相关 DEGs 的筛选标准为:错误发现率 (false discovery rate, FDR) < 0.05 和 |Log₂FC| > 0。使用 R 语言 Corplot 包对筛选出的 DEGs 进行交互作用分析。

1.2.2 DEGs 的富集分析 采用 R 软件 clusterProfiler 包对 DEGs 进行基因本体论 (gene ontology, GO) 和京都基因与基因组百科全书 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) 通路富集分析,校正 *P* 值 < 0.05 被认为是显著富集的通路。

1.2.3 机器学习算法识别枢纽基因 采用 R 软件 glmnet 包进行 LASSO 逻辑回归分析,采用 R 软件 e1071 包进行支持向量机递归特征消除 (support vector machine recursive feature elimination, SVM-RFE),以筛选铁死亡相关 DEGs 中的枢纽基因。

1.2.4 枢纽基因验证 采用 R 软件的 pROC 包对每个枢纽基因进行受试者工作特征 (receiver operating characteristic, ROC) 曲线分析,采用曲线下面积 (area under curve, AUC) 评估 DEGs 的变化。

1.2.5 枢纽基因单基因的基因集富集分析 采用 R 软件进行单基因的基因集富集分析 (gene set enrichment analysis, GSEA) 生成一个初始基因分类列表,按照总体枢纽基因的表达值中位数分为枢纽基因高表达组和低表达组并制作成表型数据文件。使用 GSEA 官网 (<http://www.gsea-msigdb.org/gsea/index.jsp>) 提供的基于 JAVA 环境的 GSEA 软件 (version 3.0) 分析并比较枢纽基因不同表达组之间可能存在的 DEGs 及信号通路。在 GSEA 分析中使用 Molecular Signature Database (MsigDB) 作为通路注释源 (同时包含 KEGG 和 REACTOME 等通路注释数据)。为了进行基因组比对,每次分析进行 1 000 个重复,表型标签是枢纽基因的表达水平。

1.2.6 枢纽基因 lncRNA-miRNA-mRNA 相关竞争性内源 RNA 网络的构建 通过 miRcode 数据库 (<http://www.mircode.org/download.php>) 获取相关 miRNA,

采用 Perl 软件比对获得 miRNA 与枢纽基因 mRNA 的相互作用关系。利用 TargetScan 数据库、miR-TarBase 数据库和 miRDB 数据库进行筛选,获取 3 个数据库共同预测的枢纽基因相关性 miRNA,得到 miRNA 与 mRNA 的关系对。使用 spongeScan 数据库进一步预测可能与 miRNA 结合的 lncRNA。采用 Cytoscape 软件 (version 3.9.1) 构建基于 DEGs 的竞争性内源 RNA (competing endogenous RNA, ceRNA) 网络并进行可视化。

1.2.7 各枢纽基因和铁死亡标记基因临床样本验证 使用 RNAiso 试剂 [宝日医生生物技术 (北京) 有限公司] 提取临床样本总 RNA。使用 NanoDrop 微量分光光度计测定浓度和 RNA 纯度。取 1 μg 总 RNA 逆转录合成 cDNA (RR014, 日本 Takara 公司)。将 2.0 μl cDNA 与 10.0 μl SYBR Green Master Mix (美国 Roche 公司) 混合,加入 0.4 μl 引物后用去除核酸酶的超纯水配置 20.0 μl 反应体系,使用 ABI 7500 系统 (美国 Applied Biosystems 公司) 进行 PCR 反应。反应条件:95 ℃ 预变性 30 s;95 ℃ 变性 10 s,60 ℃ 退火及延伸 30 s,共 40 个循环;熔解曲线 95 ℃ 15 s,60 ℃ 60 s,95 ℃ 15 s。以 GAPDH 基因为内参照,使用 2^{-ΔΔCt} 法计算各目的基因的相对表达量。所研究基因的引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成,序列见表 1。

1.3 统计学方法

采用 R 软件 (version 4.2.1) 进行统计学分析和绘图。计量资料经 W 检验证实符合正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,翼状胬肉组与对照组间年龄和各基因相对表达量比较采用独立样本 *t* 检验。计数资料以频数表示,各组间性别构成比的差异比较采用 Fisher 检验。采用双尾检验, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

表 1 各基因引物序列
Table 1 Primer sequences of gene

基因	正向引物 (5'-3')	反向引物 (3'-5')
<i>DUOX2</i>	CCCCTGACTGTGCTTGACTT	CCAGAGAGAAGCAGACTCACTAA
<i>ATF3</i>	GAGTCGGAGAAGCTGGAAAGT	TCTGAGCCCGGACAATACAC
<i>NDRG1</i>	GAATGACATGAACCCCGGCA	AGTTGCACTCCACCACGG
<i>SLC40A1</i>	TCCTTGGCCGACTACCTGAC	CACAGACACCCGAAAAGTGC
<i>FTH</i>	ACGCCTCCTACGTTTACCTG	GAAGATTGCGCCACCTCGTT
<i>TFRC</i>	TCGGCAAGTAGATGGCGATA	CCTGCCAGTCTCTCACACTC
<i>GPX4</i>	GGAGCCAGGGAGTAACGAAG	AGACGCTGTCCAAACTTGCTG
<i>PTGS2</i>	AATCCTTGCTGTCCACCC	GTCCGGGTACAATCGCACTT
<i>HSPB1</i>	GTGGACCCACCCAAGTTTC	ATCTCGTTGGACTGCGTGG
<i>NFE2L2</i>	CCAACTACTCCCAGGTTGCC	AATGCTGCGCCAAAAGCTG
<i>GAPDH</i>	CTCCTGCACCACCAACTGCT	GGGCCATCCACAGTCTTCTG

2 结果

2.1 铁死亡相关 DEGs 的筛选和功能富集分析

从数据集中共筛选出 37 个铁死亡相关 DEGs, 其中 21 个基因表达下调, 16 个基因表达上调 (表 2, 图 1A)。铁死亡相关 DEGs 的相关系数矩阵图显示, DEGs 中的 27 个与其他 DEGs 存在相互作用, 可能表明了这些 DEGs 存在潜在的上下游调控关系 (图 1B)。

表 2 翼状胬肉组织中铁死亡相关 DEGs
Table 2 Differentially expressed ferroptosis-related genes in pterygium tissue

基因	Log ₂ FC/P 值	变化类型	FerrDb 分类
ATG5	-0.214/0.048	下调	驱动基因
YYIAP1	-0.242/0.048	下调	驱动基因
PTPN6	-0.363/0.048	下调	驱动基因
ZFP36	-1.471/0.048	下调	抑制基因
FLT3	-0.592/0.028	下调	驱动基因
NF2	-0.252/0.028	下调	抑制基因
NR4A1	-2.045/0.028	下调	抑制基因
SREBF2	-0.382/0.028	下调	抑制基因
ACSF2	-0.627/0.016	下调	驱动基因
EGR1	-2.428/0.016	下调	驱动基因
BRD3	-0.254/0.016	下调	抑制基因
ALOX5	-0.471/0.008	下调	驱动基因
ATF3	-2.983/0.008	下调	驱动基因
JUN	-1.605/0.008	下调	抑制基因
PLA2G6	-0.216/0.008	下调	抑制基因
ALDH3A2	-0.331/0.008	下调	抑制基因
CIRBP	-0.280/0.004	下调	驱动基因
NDRG1	-0.870/0.004	下调	驱动基因
NFE2L2	-0.399/0.004	下调	抑制基因
CP	-0.819/0.004	下调	抑制基因
DUOX2	0.667/0.016	上调	驱动基因
AKR1C3	0.823/0.016	上调	抑制基因
VDR	0.312/0.016	上调	抑制基因
PARP12	0.237/0.016	上调	抑制基因
FABP4	1.472/0.016	上调	抑制基因
SAT1	0.278/0.004	上调	驱动基因
CHP1	0.421/0.004	上调	驱动基因
SREBF1	0.572/0.004	上调	抑制基因
IDH2	0.398/0.004	上调	抑制基因
FBXW7	0.352/0.048	上调	驱动基因
CTSB	0.284/0.048	上调	驱动基因
OSBPL9	0.338/0.048	上调	驱动基因
GJA1	0.852/0.048	上调	驱动基因
KDM5C	0.273/0.048	上调	驱动基因
GCLC	0.348/0.048	上调	抑制基因
ISCU	0.118/0.033	上调	抑制基因
TLR4	-0.435/0.048	下调	驱动基因

注: DEGs: 差异表达基因; FC: 差异倍数

Note: DEGs: differentially expressed genes; FC: fold change

GO 的生物过程分析显示, DEGs 主要富集在细胞对外界刺激的反应、细胞对营养水平的反应、对细胞外刺激的反应、对氧化应激的反应和对饥饿的反应; 细胞成分分析显示, DEGs 主要富集于转录调节复合物和 RNA 聚合酶 II 转录调节复合物; 分子功能分析显示, DEGs 主要富集于 RNA 聚合酶 II 特异性转录和 DNA 结合转录 (图 1C, 1D)。KEGG 通路富集分析显示, DEGs 主要富集于铁死亡、NOD 样受体信号通路和花生四烯酸代谢等信号通路 (图 1E)。

2.2 枢纽基因鉴定

对 37 个铁死亡相关 DEGs 进行 LASSO 逻辑回归分析, 发现 5 个枢纽基因, 即 *DUOX2*、*ATF3*、*NDRG1*、*EGR1* 和 *ALDH3A2*。SVM-RFE 鉴定出 7 个枢纽基因, 即 *NDRG1*、*NF2*、*IDH2*、*DUOX2*、*CHP1*、*ATF3*、*SREBF1*。取 2 种预测模型分析的交集, 获得 3 个枢纽基因。根据 ROC 曲线分析验证 *DUOX2*、*ATF3*、*NDRG1* 在数据集中 AUC 值分别为 0.938、0.969 和 1.000 (图 2A)。

2.3 枢纽基因的单基因 GSEA 分析

单基因 GSEA 分析结果显示, *DUOX2* 在细胞黏附分子 CAMs、硫酸乙酰肝素糖胺聚糖生物合成通路、糖胺聚糖生物合成神经节系列通路中富集。*ATF3* 和 *NDRG1* 在 PPAR 等信号通路中富集 (图 2B~D)。

2.4 ceRNA 网络的构建

在表观遗传学层面, lncRNA 与 miRNA 及 mRNA 间存在相互调控作用, 共同影响枢纽基因行使生物学功能。以 *DUOX2*、*ATF3* 和 *NDRG1* 为靶点, 构建 lncRNA-miRNA-mRNA 的 ceRNA 网络, 获得了 81 个在 TargetScan、miR-TarBase 和 miRDB 数据库共同预测的枢纽基因相关调控 miRNA, 基于这些 miRNA 获取了 139 个具有潜在调控关系的 lncRNA (图 3)。

2.5 翼状胬肉组和对照组枢纽基因和铁死亡标记基因表达比较

实时荧光定量 PCR 结果显示, 与对照组比较, 翼状胬肉组 3 个枢纽基因中 *DUOX2* mRNA 相对表达量明显升高, *ATF3* 和 *NDRG1* mRNA 相对表达量明显下降, 差异均有统计学意义 ($t = 3.339$ 、 22.370 、 23.560 , 均 $P < 0.05$)。铁死亡标记基因中, 翼状胬肉组 *PTGS2* 和 *TFRC* mRNA 相对表达量明显升高, *FTH1*、*GPX4*、*SLC40A1*、*HSPB1* 和 *NFE2L2* mRNA 相对表达量明显降低, 差异均有统计学意义 ($t = 12.220$ 、 16.580 、 5.664 、 6.455 、 8.691 、 9.883 、 17.590 , 均 $P < 0.01$) (表 3)。

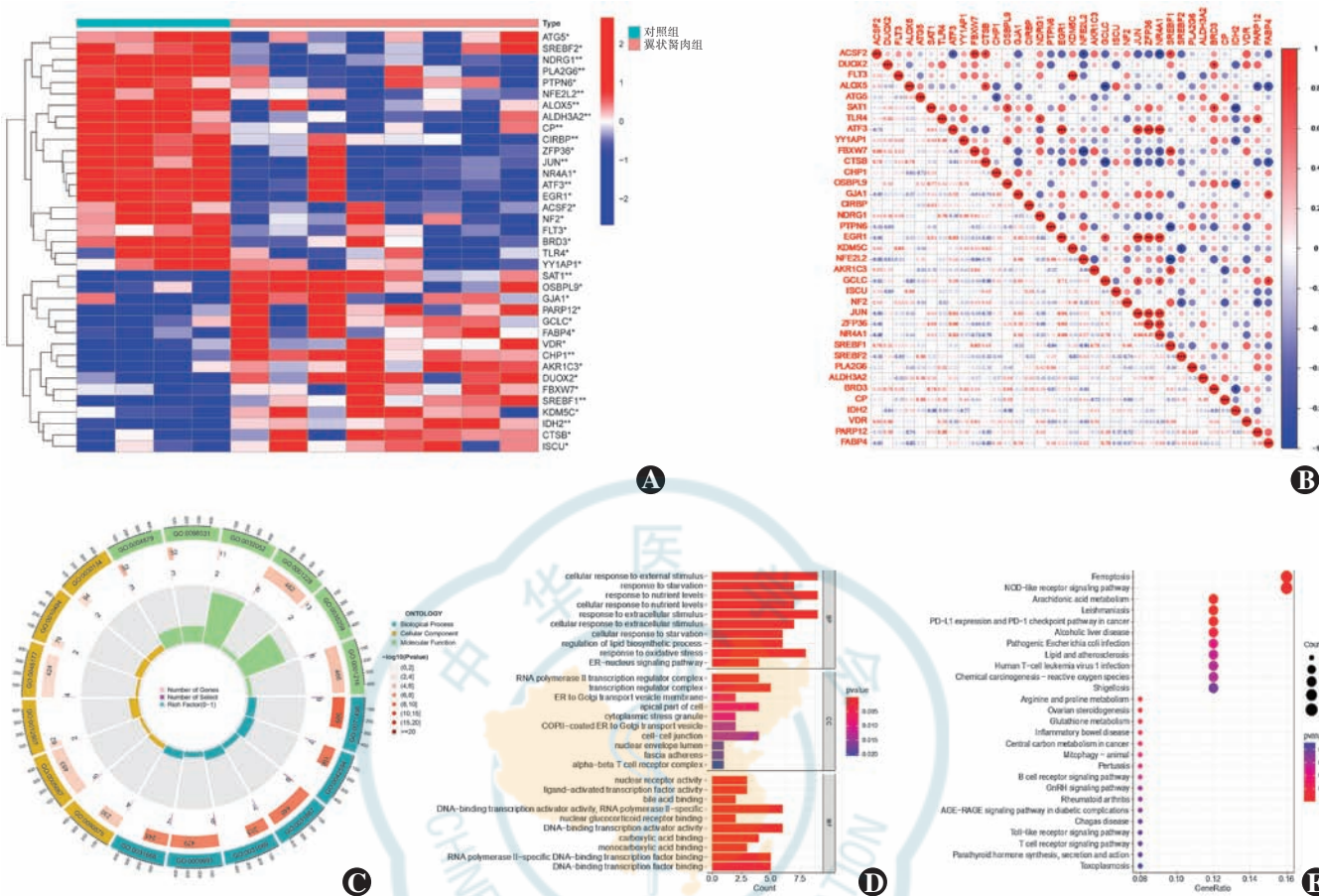


图 1 铁死亡相关 DEGs 的鉴定和富集分析 A:翼状胬肉组与对照组的 DEGs 表达热图 红色代表基因表达上调,蓝色代表基因表达下调 B:DEGs 的相关系数矩阵图 C:GO 富集分析的富集基因数、选择基因数、富集因子 D:DEGs 的 GO 功能分析 E:DEGs 的 KEGG 分析 BP:生物过程;MF:分子功能;CC:细胞成分

Figure 1 Identification and enrichment analysis of ferroptosis-related DEGs A:Heat map of DEGs expression in pterygium group and control group Red represented up-regulated gene expression, and blue represented down-regulated gene expression B:Correlation heat map of DEGs C:Number of enriched genes, number of selected genes, and enrichment factor in GO enrichment analysis D:GO functional analysis of DEGs E:KEGG analysis of DEGs BP: biological process; MF: molecular function; CC: cellular component

3 讨论

翼状胬肉的发生过程包括了结膜上皮细胞的异常病理变化和异常结膜细胞的累积和增殖。既往研究显示, *p53* 基因突变可能导致翼状胬肉上皮细胞的形成^[16]。利用公开数据库进行生物信息学分析可有效筛选疾病关键基因,为阐明翼状胬肉分子机制提供了依据^[17-18]。本研究通过对翼状胬肉组织 GEO 数据集进行分析,筛选出 37 个铁死亡相关 DEGs。GO 富集分析显示,这些基因参与细胞对外界刺激、营养水平、氧化应激和饥饿等的反应,表明氧化性细胞损伤和应激反应可能参与翼状胬肉的发生。KEGG 富集分析进一步显示,铁死亡和 NOD 样受体信号通路可能是探究翼状胬肉分子变化的关键。翼状胬肉作为一种病态的结膜组织,其出现也伴随着结膜上皮细胞的异常变化,包括结膜上皮细胞的死亡、氧化应激、细胞衰老等^[19]。

结膜上皮细胞出现脂质过氧化及铁死亡通路的激活会导致正常结膜细胞的异化,翼状胬肉的发生可能是由于这种异化结膜上皮细胞的堆积以及铁死亡末期崩解细胞的异常蛋白沉积的综合作用。在本研究中, *GPX4*、*TFRC* 和 *FTH* 等关键铁死亡调控基因在铁代谢失衡中发挥核心作用,富集于 NOD 样受体信号通路和花生四烯酸代谢等免疫炎症反应通路,揭示了铁死亡可能通过调节免疫炎症与细胞死亡共同参与翼状胬肉的发病过程,炎症通路的激活可能成为细胞异化的原因,同时也可能对细胞所处微环境产生潜在的影响。

本研究采用 LASSO 逻辑回归分析和 SVM-REF 共同筛选出翼状胬肉中 *DUOX2*、*ATF3* 和 *NDRG1* 枢纽基因,进一步收集 9 例患者的翼状胬肉组织和正常结膜组织进行 PCR 验证,发现翼状胬肉组织中 *DUOX2* mRNA 表达明显升高, *ATF3* 和 *NDRG1* mRNA 表达明显降低。ceRNA 网络调控系统通过 lncRNA 或环状

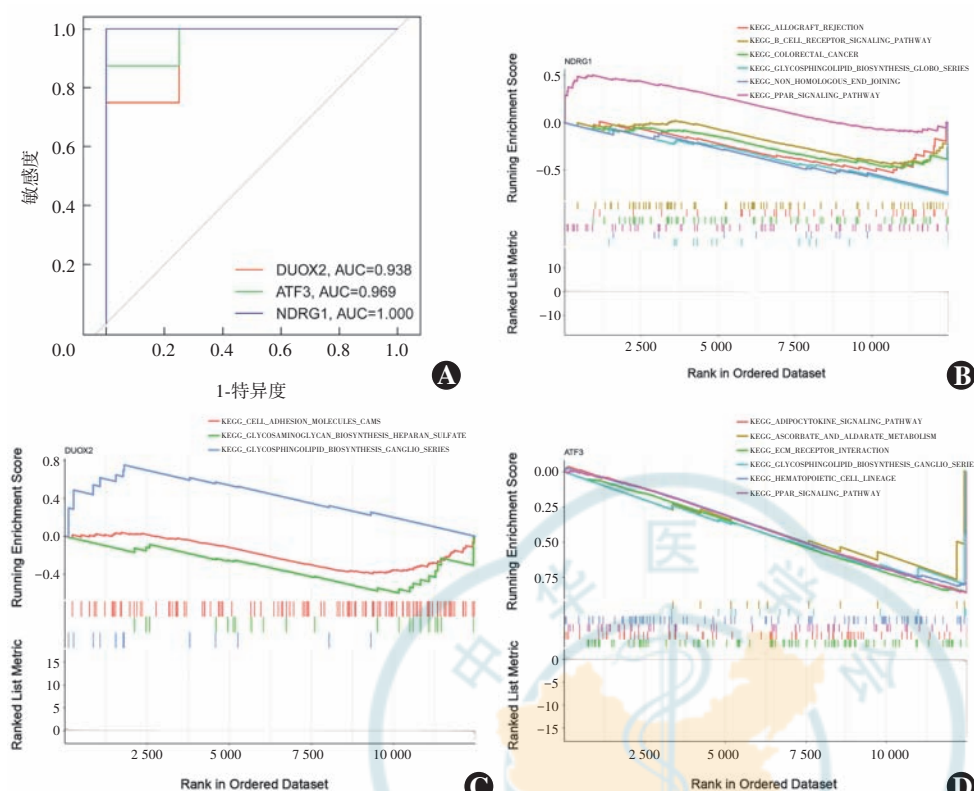


图2 枢纽基因的鉴定与分析 A:各枢纽基因诊断翼状胬肉的ROC曲线 B:*NDRG1*的单基因GSEA分析 C:*DUOX2*的单基因GSEA分析 D:*ATF3*单基因GSEA分析 AUC:曲线下面积

Figure 2 Identification and analysis of hub genes A: ROC curve for hub genes B: Single-gene GSEA analysis of *NDRG1* C: Single-gene GSEA analysis of *DUOX2* D: Single-gene GSEA analysis of *ATF3* AUC: area under curve

RNA 竞争性结合 miRNA 影响 mRNA 表达^[20]。lncRNA 和环状 RNA 起 miRNA 海绵作用,降低体内 miRNA 丰度,从而干扰 miRNA 对下游靶基因的抑制作用。越来越多的证据表明, lncRNA-miRNA-mRNA ceRNA 网络在人类多种癌症中发挥关键作用^[21]。翼状胬肉作为一种类肿瘤, ceRNA 网络所涉及的表现遗传学调控机制可能为翼状胬肉的干预方案和调控机制研究提供潜在的思路。因此在枢纽基因的基础上,本研究构建了 ceRNA 网络,并验证了特定 lncRNA 和 miRNA 对枢纽基因的调控作用。

DUOX2 是烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶家族成员之一,在多种上皮细胞中表达,调节细胞内 ROS 的产生^[22-23]。FerrDb 数据库显示, *DUOX2* 是铁死亡过程的驱动基因。单基因 GSEA 分析表明, *DUOX2* 富集于细胞黏附分子 CAMs、硫酸乙酰肝素的生物合成和神经节系列的生物合成。CAMs 介导细胞之间和细胞与细胞外基质之间的黏附,还可以激活调节受体酪氨酸激酶等因子,进而对细胞生存、迁移和衰老产生影响^[24]。硫酸乙酰肝素广泛存在于细胞表面,在调控凝血、脂质代谢、细胞外基质组装、生长因子信号传导、细胞黏附等许多生物学过程中发挥关键作用^[25]。鞘糖脂是一类与脂质分子连接的聚

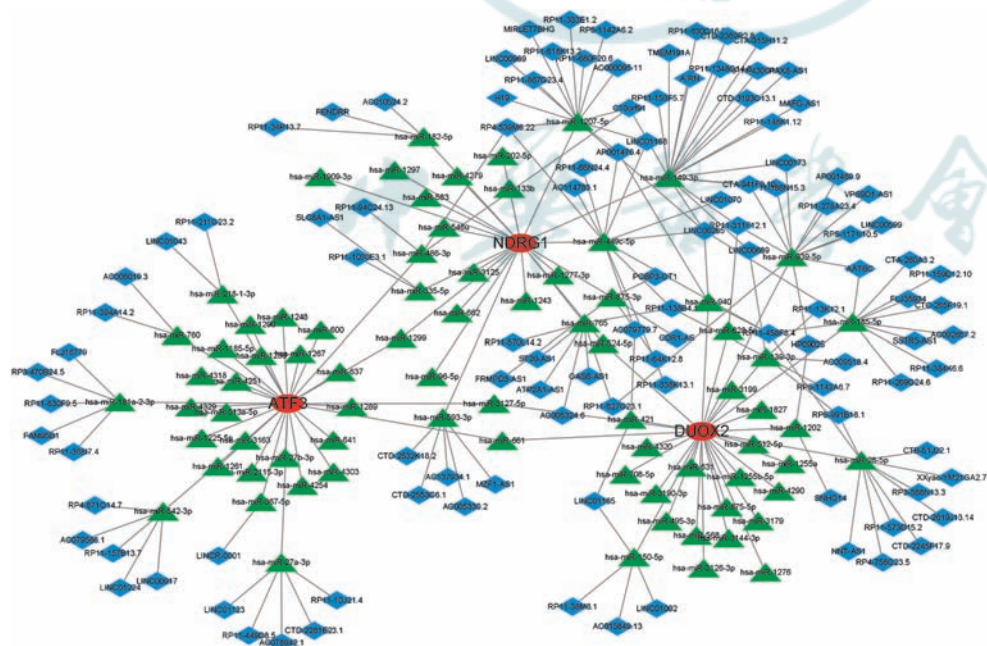


图3 枢纽基因的 ceRNA 网络 包括 81 个 miRNA 和 139 个 lncRNA。红色示 mRNA,绿色示 miRNA,蓝色示 lncRNA

Figure 3 The ceRNA network of hub genes 81 miRNA and 139 lncRNA included. Red for mRNA, green for miRNA, and blue for lncRNA



表 3 翼状胬肉组与对照组枢纽基因和铁死亡标记基因 mRNA 相对表达量比较 ($\bar{x}\pm s$)
Table 3 Comparison of relative mRNA expression levels of hub genes and ferroptosis marker genes between control group and pterygium group ($\bar{x}\pm s$)

组别	样本量	DUOX2	ATF3	NDRG1	FTH1	GPX4
对照组	9	1.062±0.205	1.002±0.078	1.002±0.074	1.009±0.166	1.007±0.166
翼状胬肉组	9	16.465±6.204	0.001±0.001	0.001±0.001	0.449±0.042	0.399±0.082
<i>t</i> 值		3.339	22.370	23.560	5.664	6.455
<i>P</i> 值		0.044	<0.001	<0.001	0.005	0.003

组别	样本量	PTGS2	SLC40A1	TFRC	HSPB1	NEFE2L2
对照组	9	1.001±0.041	1.003±0.096	1.004±0.103	1.005±0.118	1.001±0.044
翼状胬肉组	9	4.074±0.434	0.441±0.058	2.248±0.079	0.285±0.044	0.363±0.045
<i>t</i> 值		12.220	8.691	16.580	9.883	17.590
<i>P</i> 值		<0.001	0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注: (独立样本 *t* 检验)
Note: (Independent samples *t*-test)

糖,有助于膜完整性维持,并提供特异性识别位点,在细胞膜上发挥多种生理作用,并参与肿瘤的发展和转移,尤其与上皮-间充质转化相关^[26]。目前,翼状胬肉组织被认为是一种类肿瘤组织^[27],DUOX2 在肿瘤组织中产生的促进衰老,加速细胞死亡的作用可能促进了结膜上皮细胞的病理变化,最终导致了翼状胬肉的发生。

ATF3 抑制介导铁死亡的因子 SLC7A11、GPX4 等水平,被认为是铁死亡的启动标志^[28-29];但在某些条件下,ATF3 也可以作为铁死亡的抑制因子。此时 ATF3 启动子序列中含有抗氧化反应元件结合位点,Nrf2 可通过上调 ATF3 的转录增强其抗氧化损伤的功能。ATF3 过表达通过上调 GSH 水平,降低 Fe²⁺、ROS 和丙二醛水平,抑制一系列铁死亡反应基因的表达,包括 *TLR4*、*GPX4*、*PTGS2*、*FTH1*、*FANCD2* 和 *NOX1*^[30]。在本研究中,ATF3 在翼状胬肉患者组织中显著下调,这与上述 ATF3 对铁死亡的抑制作用一致。

NDRG1 是 NDRG 蛋白家族的一员,可能通过影响 GPX4 的表达来对抗铁死亡,并且在多种肿瘤中显示出抗癌和抗转移作用^[31]。敲低 *NDRG1* 可能诱导铁死亡^[32]。本研究结果显示,翼状胬肉组织中 *NDRG1* mRNA 表达降低。GSEA 分析提示 NDRG1 富集于 B 细胞受体信号通路、结直肠癌、非同源末端连接、神经节系列生物合成、PPAR 信号通路等,其中非同源末端连接和 PPAR 信号通路与 DNA 损伤及修复密切相关,同时与 NDRG1 相关的抗铁死亡系统可作用于 NRF2-GSH-GPX4 信号通路来修复 DNA 损伤,这些通路可能因 NDRG1 而激活,进而参与铁死亡的发生或者细胞对已发生铁死亡过程的应答过程。铁死亡产生的脂质

代谢物可作为 DAMPs 激活免疫应答,也可调节 T 细胞和 B 细胞免疫,介导 B 细胞分化和抗体应答^[33-34]。翼状胬肉作为一种类肿瘤组织,与癌症相关的调控通路对其也可能有潜在的调控能力。本研究结果也显示,B 细胞受体激活等参与肿瘤微环境改变通路的激活,因此这种铁死亡引起免疫反应可能对结膜微环境改变,这可能进一步加重了结膜组织的异化^[35-36]。

综上所述,本研究综合机器学习和临床样本验证,成功筛选出翼状胬肉的铁死亡相关枢纽基因 *DUOX2*、*ATF3* 和 *NDRG1*,并推测氧化应激状态、免疫反应及细胞异常增殖过程在翼状胬肉的发生和发展中发挥重要作用。但本研究主要基于生物信息学分析,实验验证部分相对有限,未来仍需要深入探索铁死亡在翼状胬肉中的具体作用机制。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突
作者贡献声明 张宇航: 酝酿和设计实验、数据处理和可视化、论文撰写及修改;孙潮动: 临床样本收集;徐素: 数据可视化、论文撰写;司玮、毛一、邵敬芝、杜珊珊: 统计分析、临床样本收集;张凤妍: 参与研究设计、对文章的知识性内容作批评性审阅及定稿

参考文献

[1] Van Acker SI, Van den Bogerd B, Haagdoorens M, et al. Pterygium-the good, the bad, and the ugly[J/OL]. Cells, 2021, 10(7): 1567[2025-02-02]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34206333>. DOI: 10.3390/cells10071567.

[2] Alpay A, Ugurbaş SH, Erdogan B. Comparing techniques for pterygium surgery[J]. Clin Ophthalmol, 2009, 3: 69-74.

[3] Ti SE, Chee SP, Dear KB, et al. Analysis of variation in success rates in conjunctival autografting for primary and recurrent pterygium[J]. Br J Ophthalmol, 2000, 84(4): 385-389. DOI: 10.1136/bjo.84.4.385.

[4] Arain MA, Yaqub MA, Ameen SS, et al. Amniotic membrane transplantation in primary pterygium compared with bare sclera technique[J]. J Coll Physicians Surg Pak, 2012, 22(7): 440-443.

[5] Liang W, Li R, Deng X. Comparison of the efficacy of pterygium resection combined with conjunctival autograft versus pterygium

- resection combined with amniotic membrane transplantation [J]. *Eye Sci*, 2012, 27(2): 102–105. DOI: 10. 3969/j. issn. 1000-4432. 2012. 02. 011.
- [6] Okoye O, Oguego NC, Chuka Okosa CM, et al. Short term results of pterygium surgery with adjunctive amniotic membrane graft [J]. *Niger J Clin Pract*, 2013, 16(3): 356–359. DOI: 10. 4103/1119-3077. 113463.
- [7] Salustiano Correa E Silva R, de Pereira Avila M, Rassi AR, et al. Intra-operative use of 5-fluorouracil in pterygium surgery: a comparative study [J]. *Semin Ophthalmol*, 2013, 28(1): 34–36. DOI: 10. 3109/08820538. 2012. 730101.
- [8] Al Fayed MF. Limbal-conjunctival vs conjunctival autograft transplant for recurrent pterygia: a prospective randomized controlled trial [J]. *JAMA Ophthalmol*, 2013, 131(1): 11–16. DOI: 10. 1001/archophthalmol. 2012. 2599.
- [9] Masters JS, Harris DJ Jr. Low recurrence rate of pterygium after excision with conjunctival limbal autograft: a retrospective study with long-term follow-up [J]. *Cornea*, 2015, 34(12): 1569–1572. DOI: 10. 1097/ICO. 0000000000000597.
- [10] Ali AM, Thariat J, Bensadoun RJ, et al. The role of radiotherapy in the treatment of pterygium: a review of the literature including more than 6000 treated lesions [J]. *Cancer Radiother*, 2011, 15(2): 140–147. DOI: 10. 1016/j. canrad. 2010. 03. 020.
- [11] Zhang N, Hao Y, Meng J, et al. The effect of conjunctival flap transplantation, pterygium excision, and scleral fixation surgery in treating pterygium combined with conjunctival laxity and its impact on postoperative complications [J]. *Altern Ther Health Med*, 2024, 30(6): 188–195.
- [12] Rasool M, Malik A, Abdul Basit Ashraf M, et al. Role of diagnostic factors associated with antioxidative status and expression of matrix metalloproteinases (MMPs) in patients with cancer therapy induced ocular disorders [J]. *Saudi J Biol Sci*, 2018, 25(8): 1724–1728. DOI: 10. 1016/j. sjbs. 2018. 08. 009.
- [13] Parra F, Kormanovski A, Guevara-Balcazar G, et al. Protective role of glutathione and nitric oxide production in the pathogenesis of pterygium [J/OL]. *J Ophthalmol*, 2020, 2020: 9638763 [2025-02-04]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32908689>. DOI: 10. 1155/2020/9638763.
- [14] Dixon SJ, Lemberg KM, Lamprecht MR, et al. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death [J]. *Cell*, 2012, 149(5): 1060–1072. DOI: 10. 1016/j. cell. 2012. 03. 042.
- [15] Li J, Cao F, Yin HL, et al. Ferroptosis: past, present and future [J/OL]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(2): 88 [2025-02-04]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32015325>. DOI: 10. 1038/s41419-020-2298-2.
- [16] Gupta M, Arya S, Agrawal P, et al. Unravelling the molecular tapestry of pterygium: insights into genes for diagnostic and therapeutic innovations [J]. *Eye (Lond)*, 2024, 38(15): 2880–2887. DOI: 10. 1038/s41433-024-03186-y.
- [17] 王文婷, 梁娜, 哈文静, 等. 免疫浸润在视网膜缺血再灌注损伤中作用的生物信息学分析 [J]. *中华实验眼科杂志*, 2024, 42(11): 997–1005. DOI: 10. 3760/cma. j. cn115989-20231026-00152. Wang WT, Liang N, Ha WJ, et al. Bioinformatics analysis of the impact of immune infiltration in retinal ischemia-reperfusion injury [J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2024, 42(11): 997–1005. DOI: 10. 3760/cma. j. cn115989-20231026-00152.
- [18] 刘丽玲, 李德玲, 曾伟婷, 等. 生物信息学方法对地塞米松致开角型青光眼潜在靶基因的确定和分析 [J]. *中华实验眼科杂志*, 2023, 41(2): 127–133. DOI: 10. 3760/cma. j. cn115989-20211214-00683. Liu LL, Li DL, Zeng WT, et al. Search for potential target genes in dexamethasone-induced open-angle glaucoma by bioinformatics [J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2023, 41(2): 127–133. DOI: 10. 3760/cma. j. cn115989-20211214-00683.
- [19] He S, Wu Z. Biomarkers in the occurrence and development of pterygium [J]. *Ophthalmic Res*, 2022, 65(5): 481–492. DOI: 10. 1159/000523878.
- [20] Tay Y, Rinn J, Pandolfi PP. The multilayered complexity of ceRNA crosstalk and competition [J]. *Nature*, 2014, 505(7483): 344–352. DOI: 10. 1038/nature12986.
- [21] Nejadi Orang F, Abdoli Shadbad M. Competing endogenous RNA networks and ferroptosis in cancer: novel therapeutic targets [J/OL]. *Cell Death Dis*, 2024, 15(5): 357 [2025-02-04]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/38778030>. DOI: 10. 1038/s41419-024-06732-4.
- [22] Bedard K, Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology [J]. *Physiol Rev*, 2007, 87(1): 245–313. DOI: 10. 1152/physrev. 00044. 2005.
- [23] Geiszt M, Witta J, Baffi J, et al. Dual oxidases represent novel hydrogen peroxide sources supporting mucosal surface host defense [J]. *FASEB J*, 2003, 17(11): 1502–1504. DOI: 10. 1096/fj. 02-1104fje.
- [24] Gibson NJ. Cell adhesion molecules in context: CAM function depends on the neighborhood [J]. *Cell Adh Migr*, 2011, 5(1): 48–51. DOI: 10. 4161/cam. 5. 1. 13639.
- [25] Gómez Toledo A, Sorrentino JT, Sandoval DR, et al. A systems view of the heparan sulfate interactome [J]. *J Histochem Cytochem*, 2021, 69(2): 105–119. DOI: 10. 1369/0022155420988661.
- [26] Cumin C, Huang YL, Everest-Dass A, et al. Deciphering the importance of glycosphingolipids on cellular and molecular mechanisms associated with epithelial-to-mesenchymal transition in cancer [J/OL]. *Biomolecules*, 2021, 11(1): 62 [2025-02-04]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33418847>. DOI: 10. 3390/biom11010062.
- [27] Haciloglu D, Erdöl H. Developments and current approaches in the treatment of pterygium [J]. *Int Ophthalmol*, 2017, 37(4): 1073–1081. DOI: 10. 1007/s10792-016-0358-5.
- [28] Shao CJ, Zhou HL, Gao XZ, et al. Downregulation of miR-221-3p promotes the ferroptosis in gastric cancer cells via upregulation of ATF3 to mediate the transcription inhibition of GPX4 and HRD1 [J/OL]. *Transl Oncol*, 2023, 32: 101649 [2025-02-04]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/36947996>. DOI: 10. 1016/j. tranon. 2023. 101649.
- [29] Lu S, Wang XZ, He C, et al. ATF3 contributes to brucine-triggered glioma cell ferroptosis via promotion of hydrogen peroxide and iron [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2021, 42(10): 1690–1702. DOI: 10. 1038/s41401-021-00700-w.
- [30] Liu S, Li Z, Lan S, et al. The dual roles of activating transcription factor 3 (ATF3) in inflammation, apoptosis, ferroptosis, and pathogen infection responses [J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(2): 824 [2025-02-04]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/38255898>. DOI: 10. 3390/ijms25020824.
- [31] Bae DH, Jansson PJ, Huang ML, et al. The role of NDRG1 in the pathology and potential treatment of human cancers [J]. *J Clin Pathol*, 2013, 66(11): 911–917. DOI: 10. 1136/jclinpath-2013-201692.
- [32] Tang B, Wang Y, Zhu J, et al. TACE responder NDRG1 acts as a guardian against ferroptosis to drive tumorigenesis and metastasis in HCC [J/OL]. *Biol Proced Online*, 2023, 25(1): 13 [2025-02-04]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/37208604>. DOI: 10. 1186/s12575-023-00199-x.
- [33] Bai YZ, Kopecky BJ, Lavine KJ, et al. Ferroptosis in the post-transplantation inflammatory response [J/OL]. *Cell Immunol*, 2023, 393–394: 104774 [2025-02-04]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/37839157>. DOI: 10. 1016/j. cellimm. 2023. 104774.
- [34] Chen Z, Jiang J, Fu N, et al. Targeting ferroptosis for blood cell-related diseases [J]. *J Drug Target*, 2022, 30(3): 244–258. DOI: 10. 1080/1061186X. 2021. 1971237.
- [35] Sui X, Zhang R, Liu S, et al. RSL3 drives ferroptosis through GPX4 inactivation and ROS production in colorectal cancer [J/OL]. *Front Pharmacol*, 2018, 9: 1371 [2025-02-04]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30524291>. DOI: 10. 3389/fphar. 2018. 01371.
- [36] Sun H, Cai H, Xu C, et al. AguIX nanoparticles enhance ionizing radiation-induced ferroptosis on tumor cells by targeting the NRF2-GPX4 signaling pathway [J/OL]. *J Nanobiotechnology*, 2022, 20(1): 449 [2025-02-04]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/36242003>. DOI: 10. 1186/s12951-022-01654-9.

(收稿日期: 2025-03-04 修回日期: 2025-06-18)

(本文编辑: 张宇 骆世平)

