

Vpr 蛋白凋亡在 HIV-1 中的数据挖掘分析

王丽娜¹(通讯作者) 方磊² 郦晶¹ 蔡莉莉¹

1.镇江市第三人民医院, 江苏 镇江 212000

2.丹阳市云阳儿童医院, 江苏 丹阳 212300

摘要: 背景: 凋亡调控是 HIV-1 感染的机制, Vpr 蛋白在凋亡调控起着重要作用机制不明。方法: 从 GEO 数据库中获取 3 例 vpr 干预的 THP1 巨噬细胞与正常细胞数据。筛选差异基因 ($|\log_2FC| \geq 1$, $FDR < 0.05$), 通过 DAVID、KEGG 及 STRING 分析功能富集、蛋白互作及共同表达网络, 构建 Vpr 相关调控网络。结果: 筛选到 363 个差异基因 (上调 174, 下调 189), 富集于 IL-17、TNF 信号通路及凋亡等过程。核心基因 NFKB1、CXCL2、JUN、FAS 等参与 Vpr-mRNA-凋亡通路调控网络, 如 Vpr-NFKB1-IL-17 信号通路。结论: 本研究揭示 Vpr 干预下的关键调控基因及通路, 为 HIV 防治提供新靶点。

关键词: HIV; Vpr; 数据挖掘; 共表达网络

0 引言

艾滋病 (Acquired Immunodeficiency Syndrome, 简称 AIDS) 是由人类免疫缺陷病毒 (human immunodeficiency virus, HIV) 感染所导致的一种病死率极高的慢性传染病。据联合国艾滋病规划署 (UNAIDS) 估计, 截止 2020 年底, 全球现存活 HIV/AIDS 患者 3770 万, 当年新发 HIV 感染者 150 万, 有 2750 万人正在接受抗病毒治疗 (Antiretroviral therapy, ART, 俗称“鸡尾酒疗法”)^[1-2]。全球范围内 HIV-1 感染者数仍呈现上升趋势, HIV-1 感染引起的获得性免疫缺陷综合征 (AIDS) 是人类面临的最严重的公共卫生问题之一^[3-4]。大量研究表明, 凋亡调控是 HIV-1 感染和致病的重要机制^[5-7]。因此, 对调控凋亡的分子进行研究在控制 HIV 感染中具有重要的意义。

Vpr 蛋白是功能重要的 HIV-1 调节蛋白, 分子量大小为 14KD, 由 96 个氨基酸形成三个 alpha 螺旋和 C 末端的碱性氨基酸区域。Vpr 蛋白在 HIV-1 复制过程中发挥多重调控作用, 如介导 HIV-1 整合前复合物的入核, 通过 LTR 激活前病毒及潜伏感染的 HIV-1 转录表达, 调节细胞周期及诱导凋亡等^[7-9]。深入探索 vpr 蛋白对于 HIV 的影响可能对于 AIDS 患者具有重要的临床意义。

本研究通过生物信息学分析, 探索 Vpr 干预下的差异基因及调控网络, 为 HIV 治疗提供新线索。

1 材料与方法

1.1 数据处理

从 GEO 数据库 (GSE211274) 获取 3 例 Vpr 干预及正常 THP1 巨噬细胞测序数据, 经 Trimmomatic 过滤后,

用 Cufflinks 计算 FPKM 值, Limma 筛选差异基因 ($|\log_2FC| \geq 1$, $FDR < 0.05$)。

1.2 功能分析

DAVID 进行 GO 和 KEGG 富集, STRING 构建 PPI 网络, WGCNA 分析共表达关系, 结合 GeneMANIA 构建 Vpr-miRNA-mRNA 及转录因子共表达网络。

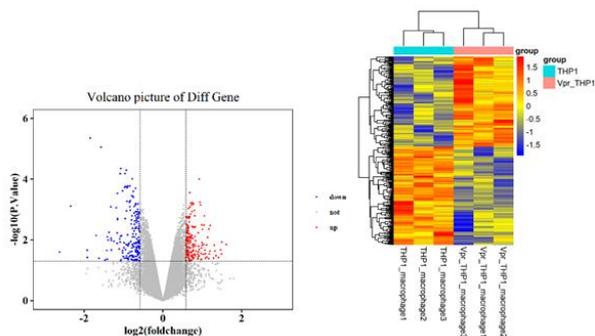
2 结果

2.1 差异基因

表 1 最显著上调和最显著下调的 DEGs。

Gene Symbol	style	P-value
SSU72P8	-2.623	0.025
LAMB3	-2.342	7.76E-04
LSMEM2	-1.921	0.022
SLC17A3	-1.921	0.038
CCL1	-1.845	4.44E-06
ENPP7	-1.693	7.24 E-03
MMP3	-1.625	0.040
CXCL10	-1.571	8.89E-06
GRPR	-1.467	0.046
PARM1	-1.424	0.022
MCOLN3	1.201	3.37 E-06
GABRQ	1.286	0.040
FHIP1B	1.302	0.015
C12orf42	1.323	0.023
KLHL10	1.349	0.033
SERPINB4	1.410	0.038
OGN	1.465	0.021
OR2B11	1.489	0.029
ADGRL4	1.495	0.012
OR6B2	1.610	0.014

筛选到 363 个差异基因, 上调基因富集于蛋白水解、炎症反应, 下调基因富集于 G 蛋白信号、凋亡通路 (图 1)。



注：(A) 差异表达基因火山图。(B) 差异表达基因热图。

图 1 差异表达基因鉴定

2.2 关键通路

IL-17、TNF 信号通路及凋亡过程显著富集, NFKB1、CXCL3、JUN 等基因参与核心调控 (图 2)。



注：(A) 上调基因和下调基因的 GO 分析。(B) 上调基因和下调基因的 KEGG 分析。

图 2 上下调基因的 GO 和 KEGG 分析。

2.3 PPI 调控网络

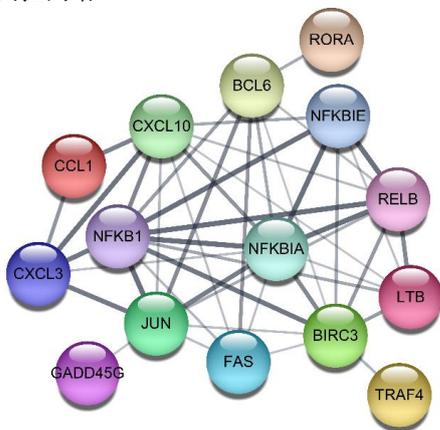


图 3 PPI 网络分析。

PPI 及 WGCNA 分析显示 RELB、JUN、NFKBIA 为核心节点, Vpr-NFKB1-IL-17 信号通路可能在巨噬细胞凋亡中起关键作用 (图 3)。

2.4 差异 mRNA 共表达调控网络

为了探讨 DEGs 在检测样本中的表达数据以及变化机制, 通过权重共表达网络分析 (WGCNA) 的方法分析差异基因之间的共表达调控关系, 并构建共表达调控网络, 寻找核心基因。如下图 4 及表 2 所示, RELB, JUN, NFKBIA, LTB, NFKBIE, RHCE, SCHIP1, STX11, SH3BP1, 和 TMEM238 与较多基因共表达, 可能与 Vpr 干预相关。

表 2 基因共表达网络

DEGs	上下调	共表达基因个数
RELB	下调	11
JUN	下调	10
NFKBIA	下调	9
LTB	下调	8
NFKBIE	下调	7
RHCE	下调	7
SCHIP1	上调	7
STX11	下调	7
SH3BP1	上调	6
TMEM238	上调	6
CXCL3	下调	5
RASD2	上调	5
RNASEH1	上调	5
RORA	下调	5
SARDH	上调	5
SLCO2B1	下调	5
ST8SIA5	下调	5
TRAF4	下调	5

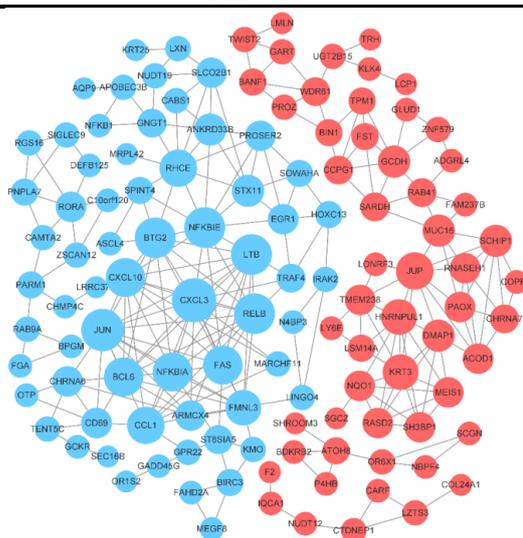


图 4 差异 mRNA 共表达调控网络。蓝色为下图基因共表达, 红色为上调基因共表达。

2.5 Vpr-mRNA-凋亡通路调控网络

根据 Vpr 干预后引起的显著性差异基因, 以及参与的凋亡相关通路, 构建 Vpr-mRNA-Pathway 调控网络, 以揭

示 Vpr 在宿主中可能的调控路径。与 vpr 相关的 DEGs 以及其参与的通路中，有较多 DEGs 参与的通路有 Cytokine-cytokine receptor interaction (n=13)，IL-17 signaling pathway (n=11)，TNF signaling pathway (n=10)，Chemokine signaling pathway (n=10)，apoptosis (n=9)，NF-kappa B signaling pathway (n=9)，Human immunodeficiency virus 1 infection (n=8)，和 Th17 cell differentiation (n=8)。

NFKB1, NFKBIA, CXCL2, CXCL3, JUN, CXCL10, CXCL6, FAS 较多地参与到了通路中。如 NFKB1 参与了 10 个通路，NFKBIA 参与了 8 个，CXCL2, CXCL3, JUN 参与了 7 个，CXCL10, CXCL6 和 FAS 参与了 5 个。由图 5 所示，显著下调基因较多地参与到调控网络中。

Vpr-mRNA-凋亡通路调控网络，如 Vpr-NFKB1-IL-17 signaling pathway, vpr-CXCL2- TNF signaling pathway, Vpr-NFKB1-apoptosis 等可能在 HIV 疾病中 vpr 干预后的 THP1 巨噬细胞中发挥重要作用。

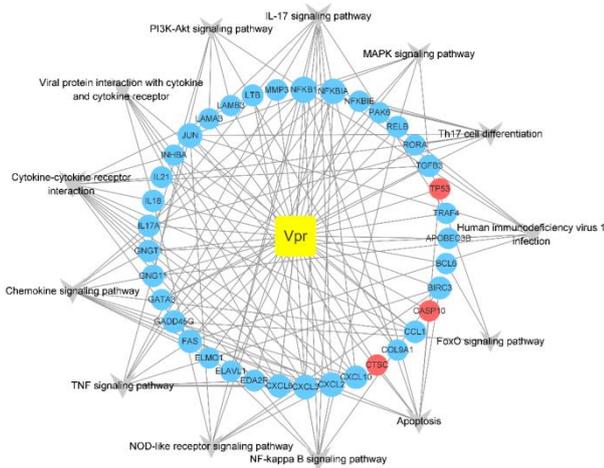


图 5 Vpr-mRNA-凋亡通路调控网络分析。三角形表示所富集的通路，蓝色为下调基因，红色为上调基因。

2.6 Vpr-宿主 miRNA-宿主 mRNA 网络

GeneMANIA 数据库也可以用于探索基因间相互作用和功能。为探索 vpr 可能介导的生物学功能，我们在 GeneMANIA 数据库中利用物理学相互作用(physical interactions)、共表达(co-expression)、预测(predicted)、共定位(co-localization)、通路(pathway)、和共享蛋白结构域(shared protein domains)等方案，结合 neutrophil migration, chemokine receptor binding, cytokine activity, response to chemokine, cellular response to chemokine, I-kappa B kinase/NF-kappaB signaling 和 regulation of I-kappaB kinase/NF-kappaB signaling 功能，共筛选到了

CXCL3, CCL1, CXCL10, BIRC3, NFKBIA, NFKBIE, NFKB1, GADD45G, RORA, FAS, TRAF4, RELB, BCL6, JUN, LTB 等 35 个与 vpr 存在相互作用的蛋白，并构建网络图。

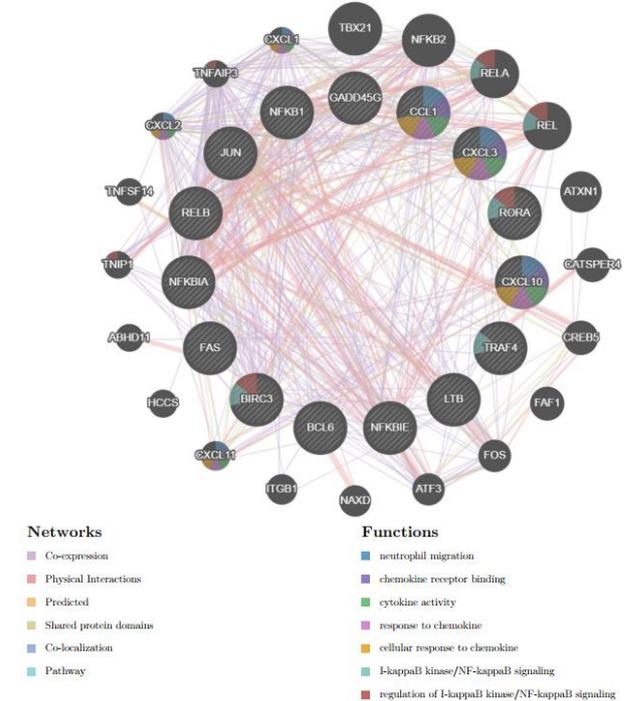


图 6 GeneMANIA 网络图。不同颜色代表了不同的网络和功能。

2.7 与转录因子共表达分析

基于如上细胞内转录因子网络与 DEGs 的相互作用，本研究深入研究了转录因子与 DEGs 的共表达网络分析。结果表明，RORA, BCL6, NFKB1, CXCL10, JUN, CCL1, NFKBIA, CXCL3, LTB, NFKBIE, RELB, GADD45G 与较多的转录因子共表达(图 7)。参与调控较多的转录因子有 RELA, TFAP2A, HNF4A, FOXL1, GATA2 等。

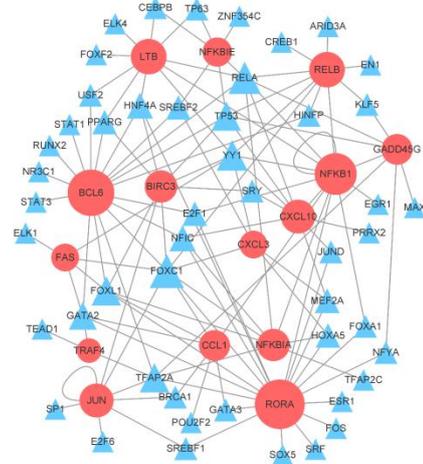


图 7 DEGs-TF Gene 共表达网络分析。红色圆形为 DEGs。蓝色三角形为转录因子。

3 讨论

Vpr 通过调控凋亡通路影响 HIV 感染与潜伏^[10-12]。HIV-1 建立感染后可以通过内源性和外源性等多种途径导致细胞凋亡(焦亡)和旁观者效应,引起非感染的 CD4+T 细胞或其他免疫细胞大量非正常死亡,从而导致机体免疫功能受损直至出现免疫系统缺陷^[13]: 如 Vpr 通过与线粒体内膜蛋白等相互作用,通过线粒体内源性途径诱导细胞凋亡; Vpr、Env、Nef、Tat 等病毒蛋白上调 Fas/FasL、TNF- α 和 TRAIL 受体 DR4、DR5 等促凋亡因子表达而诱导凋亡受体外源性细胞凋亡途径^[5-7]; 本研究发现, Vpr 干预下 NFKB1, NFKBIA, CXCL2, CXCL3, JUN, CXCL10, CXCL6, FAS 等基因差异表达, 参与 IL-17、TNF 信号通路及凋亡过程。NFKB1 作为转录因子枢纽, 其异常表达可能通过调控下游基因促进病毒存活^[14]。值得注意的是, 趋化因子 CXCL10、CCL1 的下调与 HIV 免疫逃逸相关, 提示 Vpr 可能通过抑制宿主免疫应答维持感染^[15]。

在本研究中, 通过对 Vpr 处理前后的 THP1 巨噬细胞进行生物信息学分析, 结果显示, 显著下调的差异基因主要参与细胞凋亡, 参与的通路有 IL-17 信号通路, TNF 信号通路, Th17 细胞分化, NOD 样受体信号通路, 和凋亡等。IL-17 信号通路作为促凋亡通路, 在其他疾病, 如败血症^[16], 酒精性脂肪肝^[17]和癌症^[18]。然而, 其在 AIDS 中促凋亡机制甚少研究。张春江等人^[19]的研究表明, IL-17 信号通路是自身免疫病治疗的新型靶点。结合本研究, IL-17 信号通路可能是 Vpr 介导下的 HIV 促凋亡的重要通路。

本研究首次揭示 Vpr 在 THP1 巨噬细胞中的共表达调控网络, 为靶向 Vpr 蛋白及相关通路提供依据。未来可进一步验证核心基因功能, 探索其作为 HIV 清除靶点的潜力。

参考文献:

[1]AIDS, Hepatitis C Professional Group SoID, Chinese Medical Association, Control CCdD, Prevention. Chinese guidelines for the diagnosis and treatment of HIV/AIDS (2021 edition)[J]. Infectious Diseases Immunity, 2022; 2(03): 145-67.

[2]World Health Organization. HIV/AIDS. (2021-07-17) Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hiv-aids>[J]. Accessed September 5, 2021.

[3]Safreed-Harmon K, Anderson J, Azzopardi-Muscat N, Behrens GM, Monforte AdA, Davidovich U, et al. Reorienting health systems to care for people with HIV

beyond viral suppression[J]. The Lancet HIV, 2019, 6(12): e869-e77.

[4]Ding Y, Ma Z, He J, Xu X, Qiao S, Xu L, et al. Evolving HIV epidemiology in mainland China: 2009 - 2018[J]. Current HIV/AIDS Reports, 2019; 16: 423-30.

[5]Mbita Z, Hull R, Dlamini Z. Human immunodeficiency virus-1 (HIV-1)-mediated apoptosis: new therapeutic targets[J]. Viruses, 2014, 6(8): 3181-227.

[6]Moon HS, Yang J-S. Role of HIV Vpr as a regulator of apoptosis and an effector on bystander cells[J]. Molecules Cells, 2006, 21(1).

[7]Badley AD, Sainski A, Wightman F, Lewin SR. Altering cell death pathways as an approach to cure HIV infection[J]. Cell death disease, 2013, 4(7): e718-e.

[8]Fernández Larrosa PN, Croci DO, Riva DA, Bibini M, Luzzi R, Saracco M, et al. Apoptosis resistance in HIV-1 persistently-infected cells is independent of active viral replication and involves modulation of the apoptotic mitochondrial pathway[J]. Retrovirology, 2008; 5: 1-12.

[9]Zhou H-y, Zheng Y-h, He Y, Chen Z, He B. The role of autophagy in THP-1 macrophages resistance to HIV-vpr-induced apoptosis[J]. Experimental Cell Research, 2017, 351(1): 68-73.

[10]González ME. The HIV-1 Vpr protein: a multifaceted target for therapeutic intervention[J]. International journal of molecular sciences, 2017, 18(1): 126.

[11]Fabryova H, Strebel K. Vpr and its cellular interaction partners: R we there yet[J]. Cells, 2019; 8(11): 1310.

[12]Wallet C, Rohr O, Schwartz C. Evolution of a concept: From accessory protein to key virulence factor, the case of HIV-1 Vpr[J]. Biochemical Pharmacology. 2020, 180: 114128.

[13]王芳,李明,张华. HIV-1 感染与宿主细胞免疫应答机制的研究进展[J]. 中国免疫学杂志, 2020, 36(15): 1897-1901.

[14]Li J, Lei W-T, Zhang P, Rapaport F, Seeleuthner Y, Lyu B, et al. Biochemically deleterious human NFKB1 variants underlie an autosomal dominant form of common variable immunodeficiency[J]. Journal of Experimental Medicine. 2021, 218(11): e20210566.

[15]Yang J, Sevkoplyas A, Podsvirova S, Tyshevich A, Wang M, Lee M, et al. 1982P Transcriptomic analysis and tumor microenvironment (TME) classification reveals unique

immune biology in HIV patients with Kaposi sarcoma (KS)[J].2023,34:S1057.

[16]Li L-L, Dai B, Sun Y-H, Zhang T-T. The activation of IL-17 signaling pathway promotes pyroptosis in pneumonia-induced sepsis[J]. Annals of Translational Medicine,2020;8(11).

[17]Ma H-Y, Xu J, Liu X, Zhu Y, Gao B, Karin M, et al. The Role of IL-17 Signaling in Regulation of the Liver - Brain Axis and Intestinal Permeability in Alcoholic Liver Disease[J].Current pathobiology reports,2016,4:27-35.

[18]张红健.pEGFP-N1-IL-17 通过调控 Fas/FasL 信号通路影响喉癌 Hep-2 细胞的凋亡[J].安徽医科大学学报.2019;54(11):5.

[19]张春江,杨平荣,马毅.自身免疫病治疗的新型靶点:Act1介导的 IL-17 信号通路[J].免疫学杂志.2012;28(5):4.

作者简介:王丽娜(1984-),女,本科学历,学士学位,副主任医师,从事感染病临床诊疗工作,镇江市第三人民医院。

基金项目:Vpr 蛋白凋亡基序在镇江地区 HIV-1 感染者中多态性及相关性研究,基金编号:SH2022080。