

• 临床研究 •

抗中性粒细胞胞质抗体相关性血管炎伴肾损伤中铁死亡亚型和免疫特征的综合分析



开放科学
(资源服务)
标识码(OSID)

陶密 耿明慧 黎煜研 何一晴 廖文文 吴小燕 高苹

武汉大学中南医院肾内科, 武汉 430071

通信作者: 高苹, Email: tgzy1017@163.com

【摘要】 目的 探究抗中性粒细胞胞质抗体(anti-neutrophil cytoplasmic antibodies, ANCA)相关性血管炎(anca-associated vasculitis, AAV)伴肾损伤中铁死亡亚型及在免疫微环境的作用,为开发新的免疫治疗提供基础。方法 从 GEO 数据库下载关于 AAV 的肾脏数据集。基于差异表达的结果上,共识聚类算法用于铁死亡亚型的鉴定。采用单样本基因集富集分析和基因集变异分析算法来评估亚型的免疫浸润和信号通路。进一步由 LASSO、SVM-RFE 算法筛选关键的铁死亡特征基因(ferroptosis related genes, FRGs),并由独立数据集进行验证。CIBERSORT 用于评估 FRGs 的浸润免疫细胞的丰度。最后,由 rsm 包构建 FRGs 的临床诊断性模型,使用 Nephroseq V5 数据库分析 FRGs 与肾功能之间的相关性。结果 24 个铁死亡相关基因在 AAV 伴肾损伤中显著差异表达,无监督聚类分析确定了两种不同铁死亡亚型,其在基因表达、免疫浸润、生物功能通路上存在显著差异。进一步筛选了一个由 *ALOX5*、*CD44*、*CRYAB*、*TP53* 和 *FTH1* 组成的 FRGs 集,其可有效地区分 AAV 伴肾损伤和正常对照组。趋化因子受体、巨噬细胞和 *HLA* 等与 FRGs 呈显著正相关。由 FRGs 构建的临床诊断模型的受试者工作特征曲线的曲线下面积为 0.961,而且其与肾小球滤过率均呈负相关;除了 *CRYAB*、*FTH1* 外,其他 FRGs 与血肌酐均呈正相关,表明它们可能与 AAV 的肾损伤密切相关,是预后生物标志物。结论 本研究发现 AAV 伴肾损伤中铁死亡与免疫微环境密切相关,为更好地了解铁死亡模式而开发新的 AAV 伴肾损伤的治疗方案奠定了基础。

【关键词】 抗中性粒细胞胞浆抗体相关性血管炎;肾损伤;铁死亡;免疫特征;计算生物学

基金项目:湖北省卫生健康委员会(WJ2021M165)

DOI: [10.3969/j.issn.1671-2390.2023.11.007](https://doi.org/10.3969/j.issn.1671-2390.2023.11.007)

Comprehensive analysis of ferroptosis patterns and immunologic characteristics in antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis

Tao Mi, Geng Ming-hui, Li Yu-yan, He Yi-qing, Liao Wen-wen, Wu Xiao-yan, Gao Ping

Department of Nephrology, Zhongnan Hospital, Wuhan University, Wuhan 430071, China

Corresponding author: Gao Ping, Email: tgzy1017@163.com

【Abstract】 **Objective** To lay the groundwork for formulating novel immunotherapies through understanding the regulatory role of ferroptosis and its function in immune microenvironment in ANCA-associated vasculitis (AAV) with renal injury. **Methods** Kidney data sets on AAV were downloaded from the database of Gene Expression Omnibus (GEO). Based upon the results of differential expression, consensus clustering algorithm was employed for identifying the subtypes of iron mortality. Single sample gene set enrichment analysis (ssGSEA) and gene set variation analysis (GSVA) were performed for evaluating the immune invasion and signaling pathways of subtypes. Key ferroptosis-related genes (FRGs) were further screened by LASSO and SVM-RFE algorithms and verified by independent data sets. CIBERSORT was utilized for assessing the abundance of infiltrating immune cells for FRGs. Finally a clinical diagnostic model of FRGs was constructed by rsm package. And the correlation between FRGs and renal function was examined by Nephroseq V5 database. **Results** Twenty-four ferroptosis related genes were

significantly differentially expressed in AAV with kidney injury. Unsupervised cluster analysis revealed the regulatory patterns of two different ferroptosis subtypes with significant differences in gene expression, immune infiltration and biological functional pathways. A set of FRGs composed of ALOX5, CD44, CRYAB, TP53, and FTH1 was selected by two machine learning algorithms. It could effectively distinguish AAV with kidney injury from normal control group. CCR, macrophage and HLA were correlated positively with FRGs. Area under ROC curve of clinical diagnostic model constructed by FRGs was 0.961. FRGs were correlated negatively with glomerular filtration rate (GFR). However, except for CRYAB and FTH1, other FRGs were correlated positively with serum creatinine (Scr). It implicated their potential relevance to renal injury in ANCA-associated vasculitis (AAV) and their potential as prognostic biomarkers. **Conclusions** Ferroptosis in AAV with kidney injury is correlated closely with immune microenvironment. It provides rationales for devising new treatments for AAV with kidney injury through a better understanding the pattern of ferroptosis.

【Key words】 Anti-neutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis; Kidney injury; Ferroptosis; Immune characteristics; Computational biology

Fund program: Health Commission of Hubei Province (WJ2021M165)

DOI: 10.3969/j.issn.1671-2390.2023.11.007

抗中性粒细胞胞质抗体(anti-neutrophil cytoplasmic antibodies, ANCA)相关性血管炎(ANCA-associated vasculitis, AAV)是一种小血管炎,包括肉芽肿性多血管炎、显微镜下多血管炎和嗜酸性肉芽肿性多血管炎^[1]。75%以上 AAV 患者存在肾脏受累,急性肾损伤(acute kidney injury, AKI)是 AAV 的严重并发症,其可导致终末期肾病,甚至死亡^[2]。尽管糖皮质激素和其他免疫抑制药物可以提高 AAV 患者的生存率,但免疫抑制治疗的不良反应现在仍然是 AAV 患者早期死亡的主要原因^[3]。而且 AAV 的肾脏预后仍然不理想,20%~25%的患者会出现肾衰竭^[4],因此探究新的 AAV 伴肾损伤的治疗方法是一个重要的方向。

铁死亡是一种新发现的程序性细胞死亡形式,其特征是铁依赖性脂质过氧化氢累积至致死水平。最近,有研究发现铁死亡参与了 AKI 的各种病理模型,体内和体外实验表明,铁死亡抑制剂对肾损伤有效^[5-6]。GPX4 缺失的小鼠可自发发展 AKI^[7],而谷胱甘肽过氧化物酶 4 上调可防止 AKI 的发生^[8]。同时,Zhang 等^[8]发现在白细胞介素 1 受体基因缺失的 KPKD1 小鼠中,一种特异性铁死亡抑制剂 Nec-1 对铁死亡的抑制导致肾脏重量增加和囊肿形成加速。铁死亡诱导剂与肿瘤也密切相关,有研究发现肾透明细胞癌对铁死亡诱导剂特别敏感,其可能通过上调抗铁死亡途径来逃避高过氧化氢负荷所致的损伤^[9]。综上所述,铁死亡与肾脏疾病联系紧密,而且参与了 AKI 的发生发展,而 AKI 是 AAV 伴肾损伤主要的并发症之一。因此,铁死

亡可能成 AAV 伴肾损伤的一种新的治疗方向。鉴于以往没有关于铁死亡在 AAV 伴肾损伤中作用的研究,本研究探讨了 AAV 伴肾损伤中铁死亡调控模式及在免疫微环境中的作用,为开发新的免疫治疗提供基础。

在本研究中,通过 GEO 数据库下载 AAV 伴肾损伤中铁死亡的数据。首先对差异表达的铁死亡基因进行富集分析,并通过共识聚类算法鉴定不同铁死亡亚型,并探讨其在基因表达、免疫微环境、生物功能通路上的差异。进一步由 LASSO 回归和 SVM-RFE 算法鉴定关键铁死亡特征基因,为明确其临床决策能力,构建了临床诊断模型。最后,探索关键铁死亡特征基因与肾功能的相关性,明确其预后价值。

对象与方法

一、数据来源及预处理

从 GEO 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)和 Array Express 数据库(<https://www.ebi.ac.uk/bios-tudies/arrayexpress>)中下载 AAV 伴肾损伤的患者和健康供体的基因表达数据,主要包含了四个数据集(GSE104954、GSE108112、GSE104948、E-MTAB-1944)。GSE104954 包含 42 个肾小管间质样本,包括 21 个 AAV 样本,21 个活体健康供体样本^[10];GSE108112 包含 62 个肾小管间质样本,包括 57 个 AAV 样本,5 个活体健康供体样本^[10];GSE104948 包含 43 个肾小球样本,21 个活体健康供体样本和 22 个 AAV 样本^[10];E-MTAB-1944 包含 42 个全肾

组织样本,包括 30 个 AAV 样本和 12 个活体健康供体样本^[11]。首先,将 GSE108112 和 GSE104954 合并为一个数据集以作为训练集,GSE104948、EMTAB-1944 作为独立验证数据集。通过“Combat”算法消除批次效应^[12]。从 FerrDb 数据库(<http://www.zhounan.org/ferrdb/current/>)中下载了 259 个铁死亡基因,包括 108 个驱动基因,69 个抑制基因和 111 个基因标志物。

二、差异表达分析

使用 R 中的 limma 包进行差异表达分析,选取阈值 $FDR < 0.01$ 。筛选出差异表达的铁死亡基因(differentially expressed ferroptosis genes, DE-FGs),并用 ggplot2 包绘制火山图。

三、DE-FGs 功能富集分析

使用 R 的“clusterProfiler”和“enrichment plot”包对 DE-FGs 进行 GO 分析、KEGG 分析。

四、铁死亡亚型的鉴定和生物学功能分析

根据 DE-FGs 的表达矩阵,R 包“Consensu Cluster Plus”被用来进行无监督聚类分析以识别不同的铁死亡亚型^[13]。通过主成分分析(principal component analysis, PCA)以进一步验证在不同亚型下的表达模式。HALLMARKS 通路被用来反映生物变化。通过 GSVA 算法将表达矩阵转换为通路激活评分矩阵,并通过 R 包“limma”比较两组之间的通路激活评分^[14]。从 MSigDB 数据库下载“h.all.v7.0.symbols”基因集用于 GSVA 分析。

五、铁死亡特征基因的鉴定和验证

关键 FRGs 由 LASSO 回归^[15]和 SVM-RFE^[16]两种机器学习算法来鉴定,通过独立的数据集 EMTAB-1944 及 GSE104948 进行验证其差异表达,受试者工作特征曲线(receiver operating characteristic curve, ROC)曲线下面积用于评估其诊断效能。

六、免疫特征的相关性分析

单样本基因集富集分析用于估计特定浸润免疫细胞的数量和特定免疫反应的活性^[17]。浸润的免疫细胞基因集来自之前的研究^[18]。

七、临床诊断性模型的构建和临床肾功能的相关性分析

将 GSE108112 和 GSE104954 合并后的数据集作为模型构建样本,使用“rms”包构建列线图。通过 ROC 曲线来评估模型的鉴别能力。利用校准曲线和决策曲线分析评价模型的临床价值。通过下载 FRGs 的表达数据,结合 Nephroseq V5 数据库中肾功能的数据,FRGs 与肾小球滤过率(glomerular

filtration rate, GFR)、血肌酐(serum creatinine, Scr)之间的相关性被进一步分析,由“ggplot2”绘制散点图。

八、统计分析

所有分析均在 R 4.1.2 中进行。两组或多组间分别采用 Wilcoxon 或 Kruskal-Wallis 检验进行比较。当数据为非正态分布时,采用 Mann-Whitney 检验。FRGs 与免疫细胞分数和临床肾功能之间的相关性,采用 Spearman 相关分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、DE-FGs 的鉴定

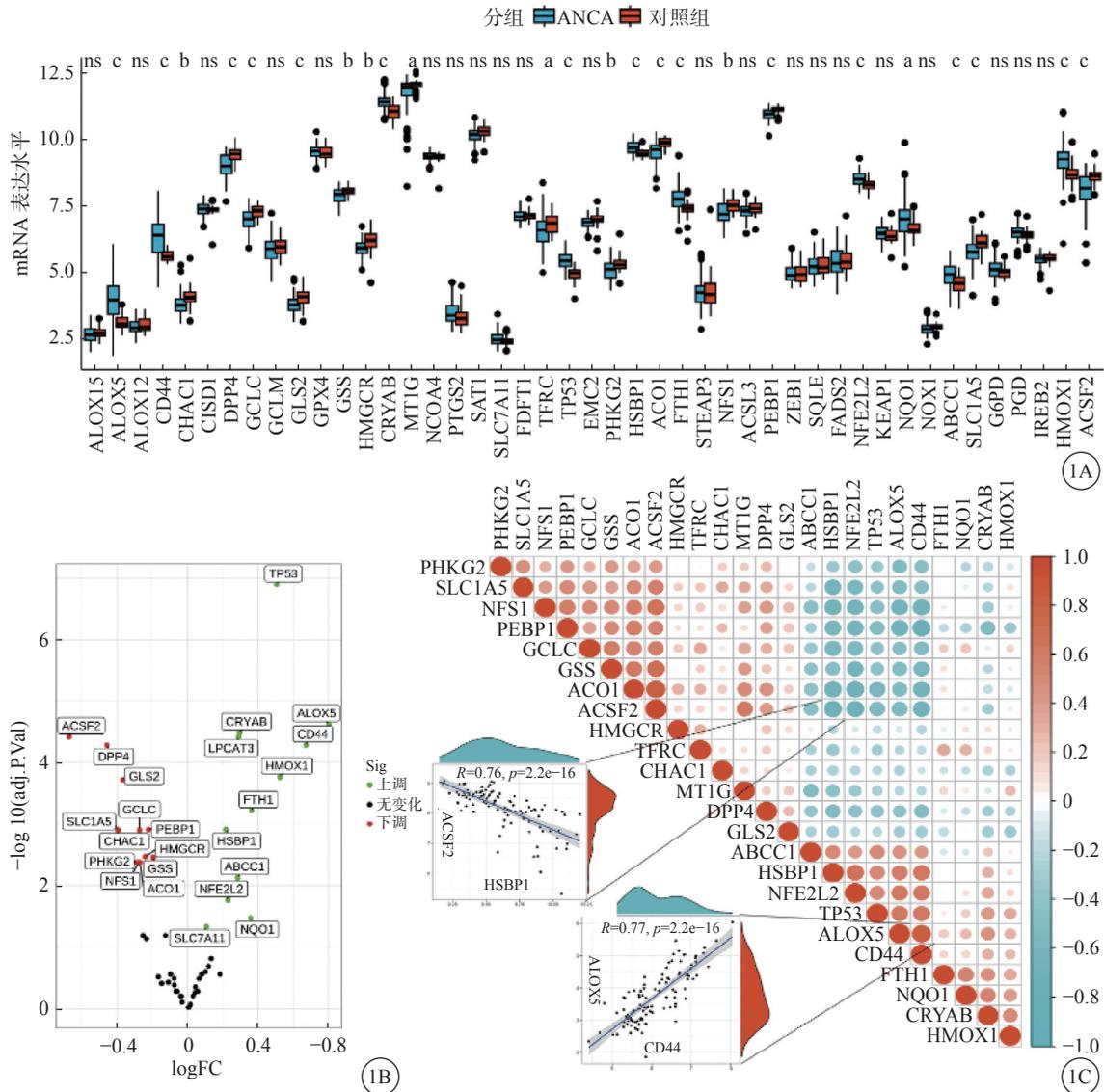
本研究共纳入铁死亡基因有 259 个,24 个铁死亡基因在正常样本与 AAV 伴肾损伤样本中显著差异表达(图 1A)。由火山图可见,24 个差异表达的铁死亡基因(DE-FGs)中有 12 个上调基因,12 个下调基因,其中 *ALOX5* 具有最大的 logFC,而 *TP53* 变化较大(图 1B)。我们注意到 DE-FGs 之间的联系非常密切,*CD44* 与 *ALOX5* 呈正相关($R=0.77$, $P<0.05$);*HSBP1* 和 *ACSF2* 呈负相关($R=-0.76$, $P<0.05$),它们是相关性最高的两对 FRGs。表明它们可能一起发挥作用(图 1C)。

二、DE-FGs 的功能分析

为了阐明与 DE-FGs 的相关的生物学功能,进行了 GO 和 KEGG 富集分析。其中 GO 富集分析表明,在生物过程中,DE-FGs 与“对氧化应激的反应”“细胞衰老”“对金属离子的反应”相关;在分子功能方面,与“病毒受体活性”“外源性蛋白的结合”和“连接酶的活性”相关;而在细胞组成中,与“细胞基底膜”“细胞基膜”和“板状伪足膜”相关(图 2A)。KEGG 富集分析表明,DE-FGs 主要在“铁死亡”“流体剪切应力和动脉粥样硬化”“谷胱甘肽代谢”“矿物质的吸收和辅助因子的生物合成”得到了富集(图 2B)。这些证据表明,DE-FGs 可能通过铁死亡、流体剪切应力、谷胱甘肽代谢、氧化应激等在 AAV 伴肾损伤中发挥作用。

三、铁死亡亚型的鉴定

为了探究 AAV 伴肾损伤中铁死亡亚型,我们基于 24 个 DE-FGs 的表达量对 AAV 伴肾损伤样本进行了无监督共识聚类分析。结合累积分布函数和共识聚类矩阵热图, $k=2$ 是一个充分的选择,两种不同的 AAV 伴肾损伤铁死亡亚型被鉴定(图 3A~C)。在 PCA 中,两种铁死亡亚型有显著



注: AVV 是抗中性粒细胞胞质抗体相关性血管炎; a 代表 $P < 0.05$, b 代表 $P < 0.01$, c 代表 $P < 0.001$ 。NS 代表数据间差异无统计学意义。

图 1 DE-FGs 的鉴定 1A.箱线图显示 AAV 伴肾损伤组与正常对照组之间 DE-FGs; 1B.火山图显示 AAV 伴肾损伤组与正常对照组之间的 DE-FGs; 1C. 相关性热图显示 DE-FGs 之间的相关性

不同的人群(图 3D)。除 *CHAC1*、*CRYAB*、*NQO1*、*HMOX1* 外, 其他所有基因在两种铁死亡亚型之间的表达差异有统计学意义(图 3E~F), 验证了 AAV 伴肾损伤中存在多样性铁死亡调控模式。

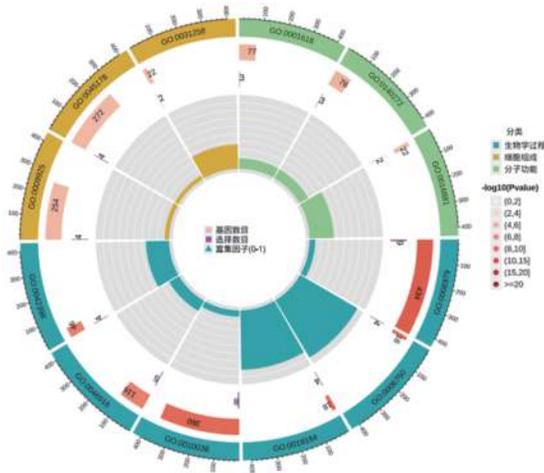
四、不同铁死亡亚型的免疫特征和生物学功能

为了进一步确定两种铁死亡亚型的免疫特征, 我们比较了两种不同铁死亡亚型之间的浸润免疫细胞的丰度。与亚型 B 相比, 亚型 A 具有较高的浸润免疫细胞。有趣的是, 除了 CD56dim 自然杀伤细胞、未成熟的树突状细胞和 17 型辅助 T 细胞外, 所有的免疫浸润细胞在两种铁死亡亚型中显著差异表达, 而且在亚型 A 中均具有更高水平(图 4A)。表明铁死亡亚型 A 可能在 AAV 伴肾损伤中免疫

组。为了研究不同铁死亡亚型潜在的生物功能, 我们进行了 GSVA 来评估富集的生物通路, 图 4B 显示了两亚型之间 HALLMARKS 通路的富集差异。上皮间充质转变、干扰素 γ 反应、炎症反应、IL-6-JAK-STAT3 信号通路、通过 NF- κ B 介导 TNF- α 信号通路及 KRAS 信号通路均在亚型 A 中更富集, 而外源化合物代谢、胆汁酸代谢和氧化磷酸化等在亚型 B 中更富集。应该指出的是, 亚型 B 高度富集在物质代谢相关通路, 而亚型 A 主要富集在免疫相关通路。上述结果再次证明铁死亡对 AAV 伴肾损伤的不同免疫微环境的塑造具有重要的调控作用。

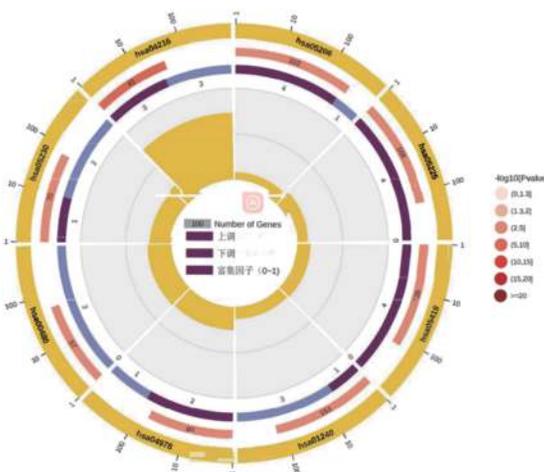
五、铁死亡特征基因的鉴定和验证

为了明确在 AAV 伴肾损伤中的铁死亡特征



项目	名称
生物学过程	对氧化应激的反应
生物学过程	衰老
生物学过程	对金属离子的反应
生物学过程	细胞过渡金属离子稳态
生物学过程	非糖体肽生物合成过程
生物学过程	谷胱甘肽生物合成过程
细胞组成	细胞基部
细胞组成	基质膜
细胞组成	片状伪足膜
分子功能	病毒受体活性
分子功能	外源蛋白结合
分子功能	氨基酸连接酶活性

2A



项目	名称
KEGG	铁死亡
KEGG	流体剪切应力与动脉粥样硬化
KEGG	谷胱甘肽代谢
KEGG	矿物质吸收
KEGG	辅助因子的生物合成
KEGG	肿瘤中的中心碳代谢
KEGG	肝癌
KEGG	肿瘤中的 MicroRNAs

2B

注: 青色代表生物过程; 黄色代表细胞组成; 绿色代表分子功能; 深紫色代表上调基因; 浅紫色代表下调基因。

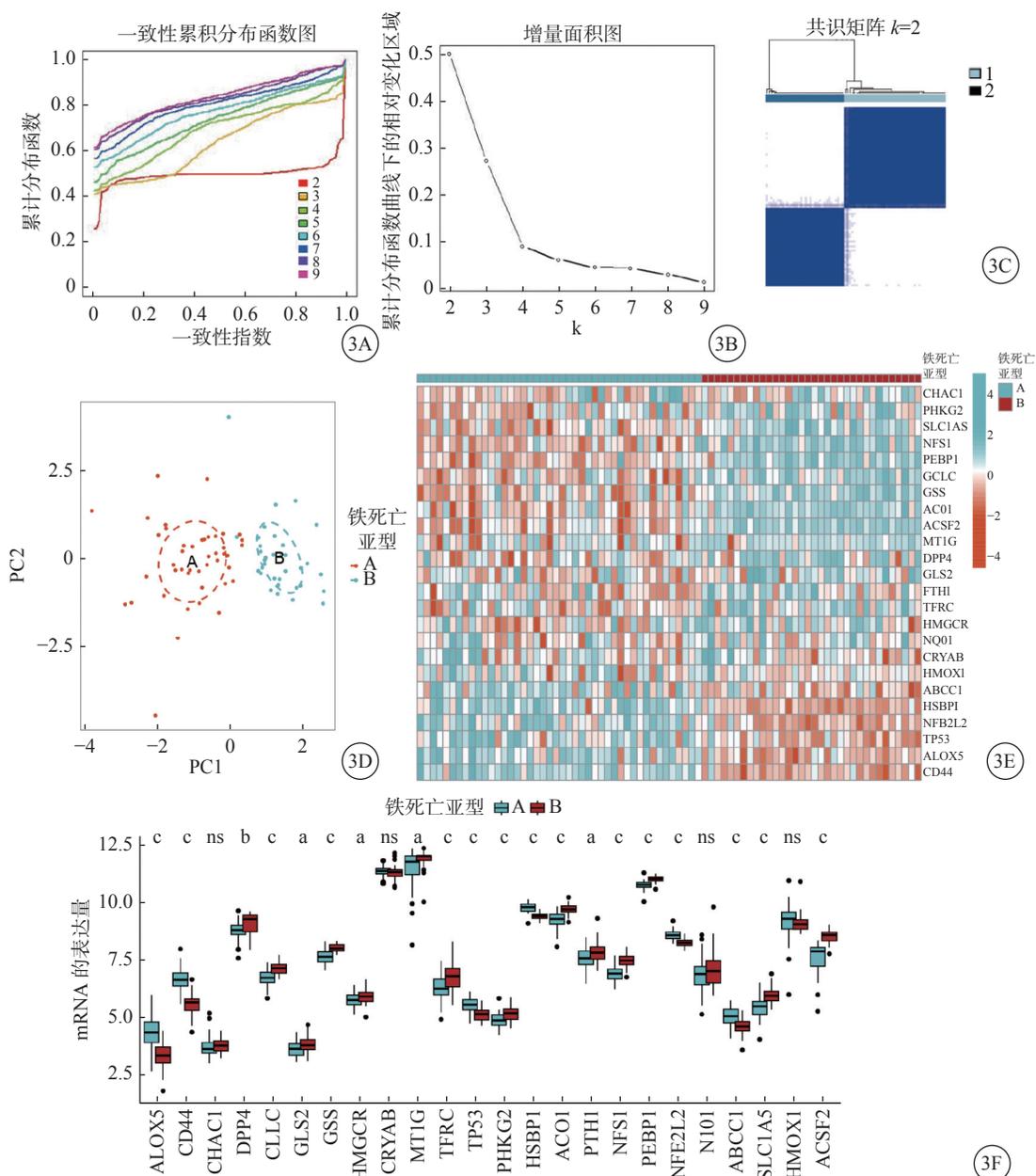
图 2 DE-FGs 的 GO 和 KEGG 分析 2A. DE-FGs 的 GO 富集分析; 2B. DE-FGs 的 KEGG 富集分析; 由外向内的圆环表示富集条目、基因组中的基因数量、上调基因与下调基因的比例; 每个 GO 项的富集因子/每个 KEGG 项的富集因子。

基因, 采用两种机器学习算法, LASSO 回归用于进行特征选择和降维, 以便排除不重要的调节因子。在差异分析的基础上, 我们将 24 个 DE-FGs 通过 LASSO 回归筛选得到 14 个重要的铁死亡基因 (图 5A~B)。同时将 24 个 DE-FGs 进行 SVM-RFE 算法筛选, 以识别 AAV 伴肾损伤的特征基因 (图 5C), 我们发现 6 个重要的铁死亡基因。最终, 从 LASSO 和 SVM-RFE 算法中获得的重要基因进行交叉, 确定了 5 个铁死亡特征基因 (*ALOX5*、*CD44*、*CRYAB*、*TP53*、*FTH1*) 用于后续分析 (图 5D)。通过独立验证集 GSE104948 验证 5 个 FRGs 的诊断效能, 我们发现 *TP53*、*CD44*、*ALOX5* 的曲线下面积均大于 0.9 (图 5E), 表明其在区分健康和 AAV 伴肾损伤样本方面表现良好。同时 E-MTAB-1944 数据集验证了 5 个 FRGs 均在 AAV 伴肾损伤

中显著差异表达 (图 5F)。因此, FRGs 可能在 AAV 伴肾伤中发挥重要作用。

六、铁死亡特征基因与免疫细胞浸润相关性分析

为了进一步阐明在 AAV 伴肾损伤和正常对照组之间免疫浸润的差异。通过 CIBERSORT 算法, 我们发现抗原递呈细胞的协同刺激、趋化因子受体、免疫检查点、细胞杀伤活性、HLA、巨噬细胞、I 类主要组织相容性复合体、中性粒细胞、副炎症等在 AAV 伴肾损伤和正常对照组之间存在显著差异, 而且均高于正常对照组 (图 6A)。值得注意的是, 通过进一步分析 5 个 FRGs 与免疫浸润的相关性时, 得到一致的结果。抗原递呈细胞的协同刺激、趋化因子受体、免疫检查点、细胞杀伤活性、HLA、巨噬细胞、I 类主要组织相容性复合体、中



注: a 代表 $P < 0.05$, b 代表 $P < 0.01$, c 代表 $P < 0.001$; NS 代表数据间差异无统计学意义。

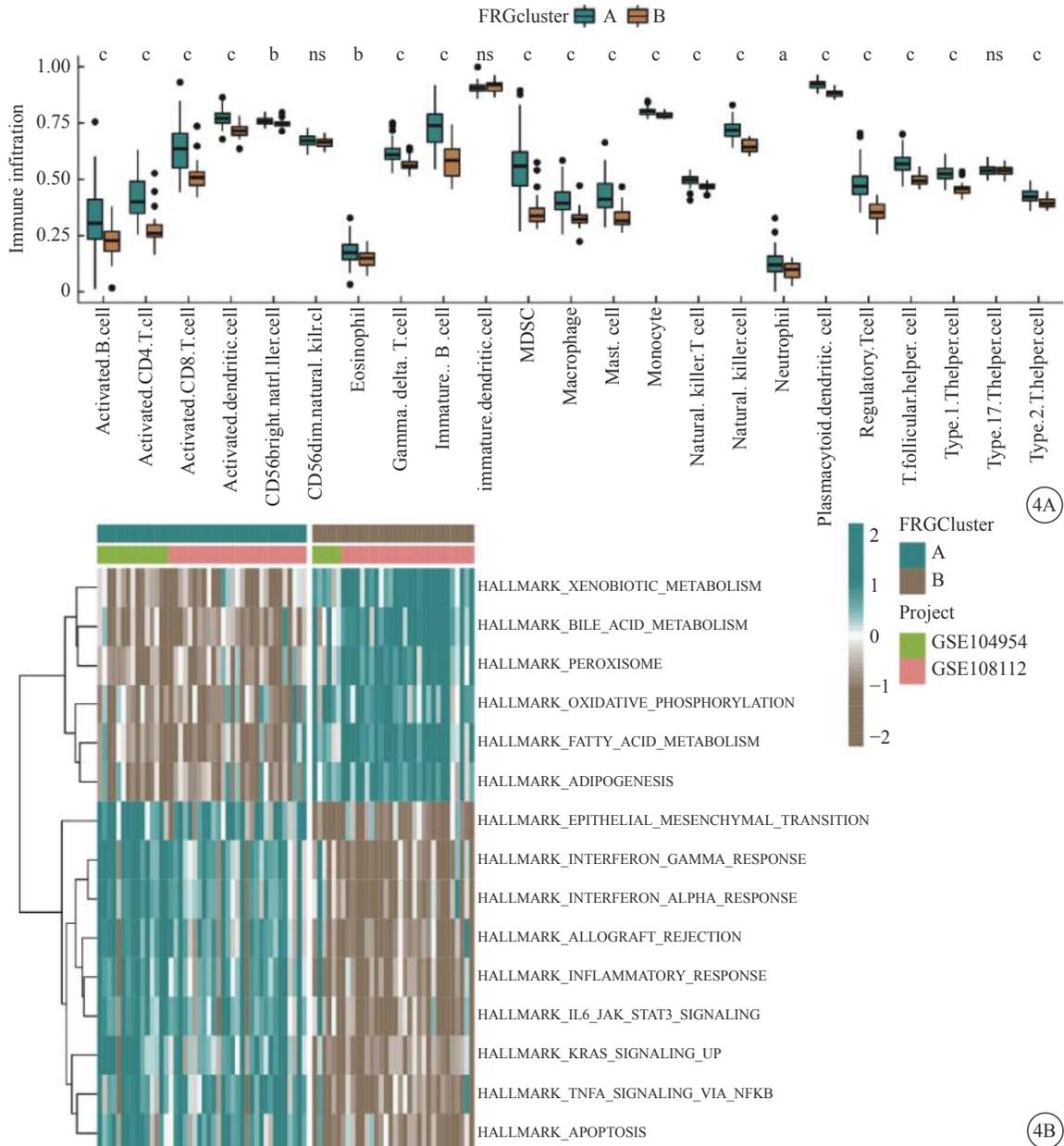
图 3 铁死亡亚型的鉴定 3A. 累积分布函数(cumulative distribution function, CDF)图显示了每个聚类的一致分布(k); 3B. Delta area 图反映了 CDF 曲线下面积的相对变化; 3C. k=2 的共识聚类矩阵图; 3D. 两种铁死亡亚型的 PCA; 3E、3F. 两种铁死亡亚型的基因表达热图和箱形图

性粒细胞、副炎症均与 *CD44*、*ALOX5*、*TP53* 呈显著正相关, 而与 *FTH1* 和 *CRYAB* 相关性不强。其中 *CRYAB* 与抗体-药物偶联物呈显著负相关(图 6B)。表明 FRGs 与免疫浸润密切相关。

七、临床诊断性模型的构建和临床肾功能的相关性分析

将 GSE108112 和 GSE104954 合并后的 104 例患者作为模型样本。由 5 个 FRGs(*CD44*、*FTH1*、*CRYAB*、*ALOX5*、*TP53*)参与临床诊断模型的构建

(图 7A)。使用校准曲线评估模型的校准能力, 该校准曲线显示实际的 AAV 伴肾损伤风险与预测风险之间的差异较小(图 7B)。采用临床决策曲线分析评估患者的临床决策效益。DCA 曲线上 0 到 1 的高风险阈值显示橙色线高于灰色线, 高于每个单独 FRGs, 这表明该模型可以从临床决策中受益(图 7C)。采用 ROC 曲线测量模型的鉴别能力, 模型的曲线下面积约为 0.961, 高于任何一个 FRGs, 表明模型具有较高的诊断效能(图 7D)。为了进一



注: a 代表 $P < 0.05$, b 代表 $P < 0.01$, c 代表 $P < 0.001$; NS 代表数据间差异无统计学意义。

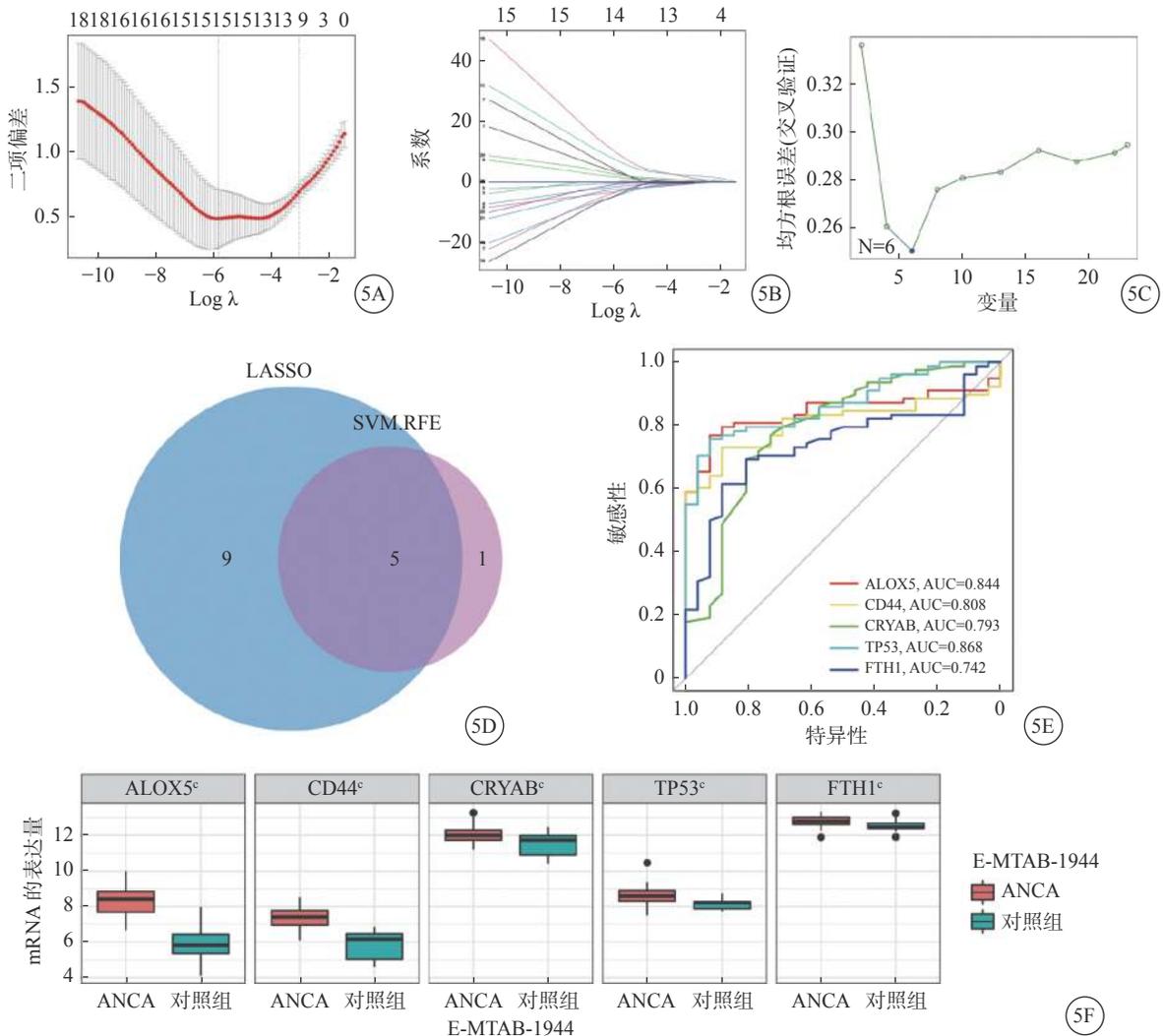
图 4 铁死亡亚型的免疫和生物学特征 4A.两种铁死亡亚型中 23 种浸润免疫细胞丰度的差异;4B.两种铁死亡亚型之间 HALLMARKS 通路富集差异

步探究 FRGs 与肾功能的关系,通过 Nephroseq 数据库提取 FRGs 的相对表达量、GFR 和 Scr 水平。由于 Nephroseq V5 数据库缺乏 *FTH1*、*CRYAB* 的表达量与 Scr 水平的数据,因此探究了 *ALOX5*、*CD44*、*TP53* 与 Scr 之间的相关性。Spearman 相关性分析发现(图 7E~I),5 个 FRGs 均与 GFR 呈负相关,*ALOX5*、*CD44*、*TP53* 与 Scr 均呈正相关(图 7J~L),提示这些基因与 AAV 患者的肾功能密切相关,是 AAV 伴肾损伤潜在的预后生物标志物。

讨 论

AAV 是一组以肉芽肿性和中性粒细胞组织炎症为特征的小血管炎,通常与 ANCA 的产生有关。AAV 常累及全身多个脏器,以肾脏和肺的累及最为突出,也最为凶险。许多研究已经证实,铁死亡在疾病,尤其是恶性肿瘤的发展中发挥着关键作用^[19]。然而,关于 AAV 伴肾损伤中铁死亡的研究很少。本研究探究了铁死亡在 AAV 伴肾损伤中的作用,并揭示了铁死亡与免疫特征的关联。

在本研究中,基于差异表达的铁死亡基因表达



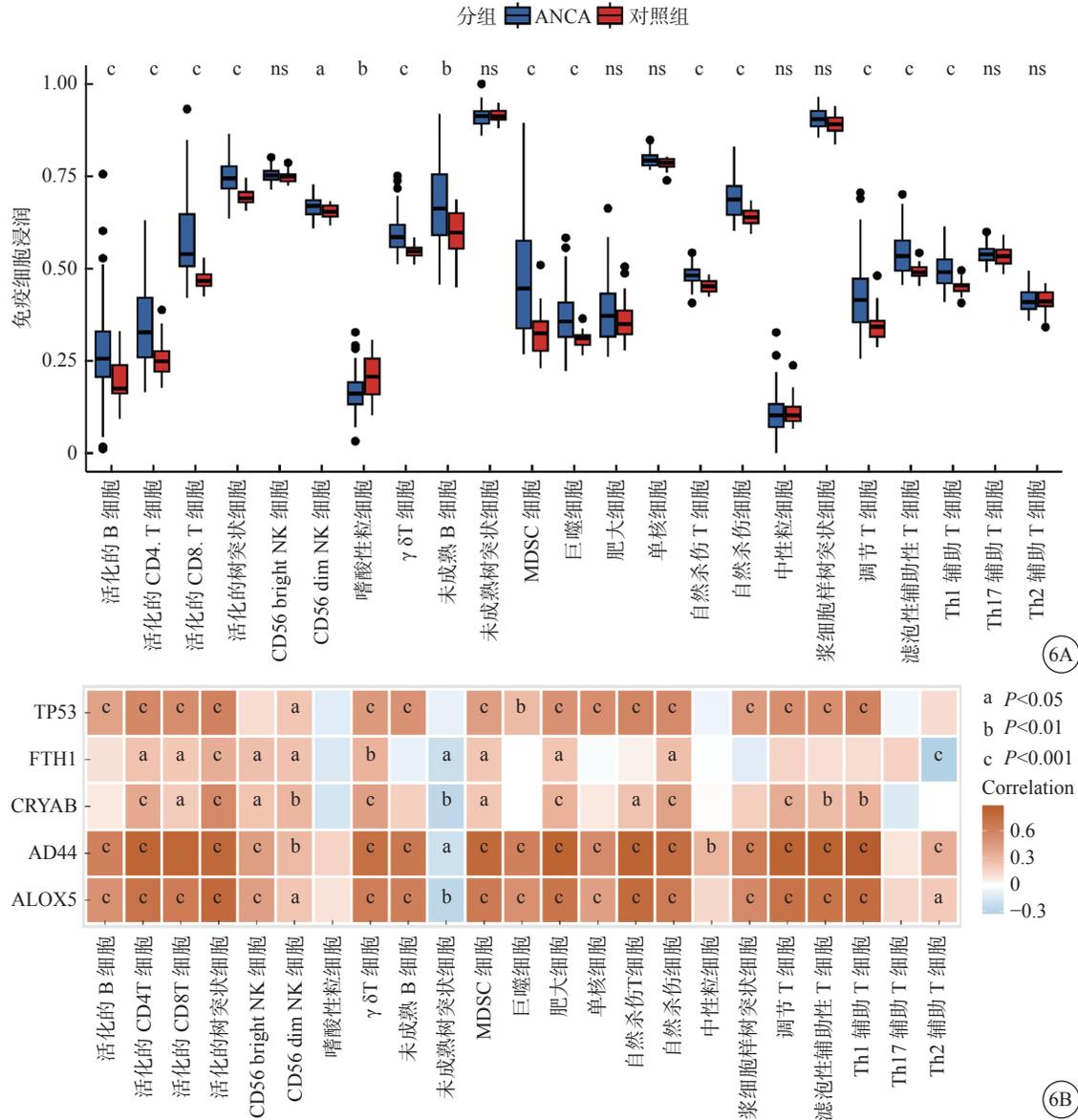
注: a 代表 $P < 0.05$, b 代表 $P < 0.01$, c 代表 $P < 0.001$; NS 代表数据间差异无统计学意义。

图 5 铁死亡特征基因的鉴定和验证 5A、5B.LASSO 回归鉴定出 14 个特征基因; 5C.SVM-RFE 算法筛选 6 个特征基因; 5D. LASSO 回归和 SVM-RFE 算法共同鉴定 5 个 FRGs; 5E.独立数据集 GSE104948 中 5 个 FRGs 的 ROC 曲线; 5F. 5 个 FRG 在独立验证集 E-MTAB-1944 中基因表达的箱线图

谱,使用无监督聚类法鉴定了两种不同的铁死亡亚型。在免疫浸润中,大部分免疫细胞显示出明显的差异。相对于亚型 B 而言,亚型 A 有更高丰度的免疫细胞浸润。亚型 A 可能是 AAV 伴肾损伤中的免疫组,而亚型 B 为非免疫组。有趣的是,在功能通路上发现相同的结果,亚型 A 在干扰素 γ 反应、IL-6-JAK-STAT3 信号通路、通过 NF- κ B 介导 TNF- α 信号通路等中更富集,而外源化合物代谢、胆汁酸代谢和氧化磷酸化等在亚型 B 中更加富集。有研究发现,肾小管间质中 CD56 自然杀伤细胞产生干扰素 γ 促进肾纤维化和慢性肾病进展^[20],提示干扰素 γ 可能通过 CD56 细胞加重 AAV 伴肾损伤的进程。一项回归性研究发现 IL-6 在活动性血管炎部位表达和产生增加,通过托珠单抗治疗能够使

严重多系统 MPA 患者的疾病完全和持续缓解,并使 IL-6 相关的细胞因子和趋化因子的循环水平正常化^[21]。既往的研究发现 TNF- α 可能在中性粒细胞启动中起作用,导致内皮细胞黏附分子和 ANCA 抗原在细胞表面的表达,从而促进 AAV 的发生发展,与本研究结果一致^[22]。以上结果表明亚型 A 中的免疫相关的信号通路可能在 AAV 伴肾损伤中发挥重要作用。

通过两种机器学习算法筛选出 5 个铁死亡特征基因,包括 CD44、CRYAB、FTH1、TP53 和 ALOX5。其中 CD44 主要编码的蛋白质是一种细胞表面糖蛋白,参与细胞间相互作用、细胞黏附和迁移^[23]。Kato 等^[24]发现抑制 T 细胞上的黏附分子 CD44,可抑制 T 细胞活性和细胞浸润。有研究发



注: AVV 是抗中性粒细胞胞质抗体相关性血管炎; ANCN 为抗中性粒细胞胞质抗体; a 代表 $P < 0.05$, b 代表 $P < 0.01$, c 代表 $P < 0.001$; NS 代表数据间差异无统计学意义。

图 6 铁死亡特征基因与免疫浸润的相关性 6A. AAV 伴肾损伤和正常对照组之间免疫细胞浸润的箱线图; 6B. 5 个 FRGs 与免疫细胞浸润的相关性热图

现去分化脂肪细胞的植入可降低了 AAV 小鼠肾脏中 CD44 mRNA 的表达, 其可能通过抑制 T 细胞的活性和侵袭来调节免疫活性^[25]。与本研究结果一致, 表明 CD44 可能通过 T 细胞在 AAV 伴肾损伤中发挥重要作用。CRYAB 是哺乳动物晶状体蛋白, 是小热休克蛋白家族的成员。Justin 等^[26]报道 CRYAB 抑制肾脏炎症并保护易患狼疮的 NZB/W F1 小鼠免受肾损伤。说明 CRYAB 可能与 AAV 的肾脏炎症反应密切相关。FTH1 主要编码铁蛋白的重链亚基。有研究发现通过敲除 FTH1 来补充肾脏巨噬细胞中的不稳定铁池, 可减轻肾脏的氧化

应激和纤维化^[27]。TP53 主要编码包含转录激活、DNA 结合和寡聚化结构域的肿瘤抑制蛋白。在肾透明细胞癌中, TP53 与增加的细胞周期和合成代谢密切相关^[28]。ALOX5 主要为编码脂肪氧化酶基因家族的一个成员, 并在花生四烯酸合成白三烯中发挥作用。在肾透明细胞癌的患者中, ALOX5 的表达升高预示着患者的存活率降低, 并且与健康组织样本相比, 始终发现肿瘤样本中的 ALOX5 表达上调^[29]。目前的研究支持 TP53 和 ALOX5 与肾脏肿瘤密切相关。本研究发现 TP53 和 ALOX5 不仅与趋化因子受体、巨噬细胞和 HLA 等呈显著正相

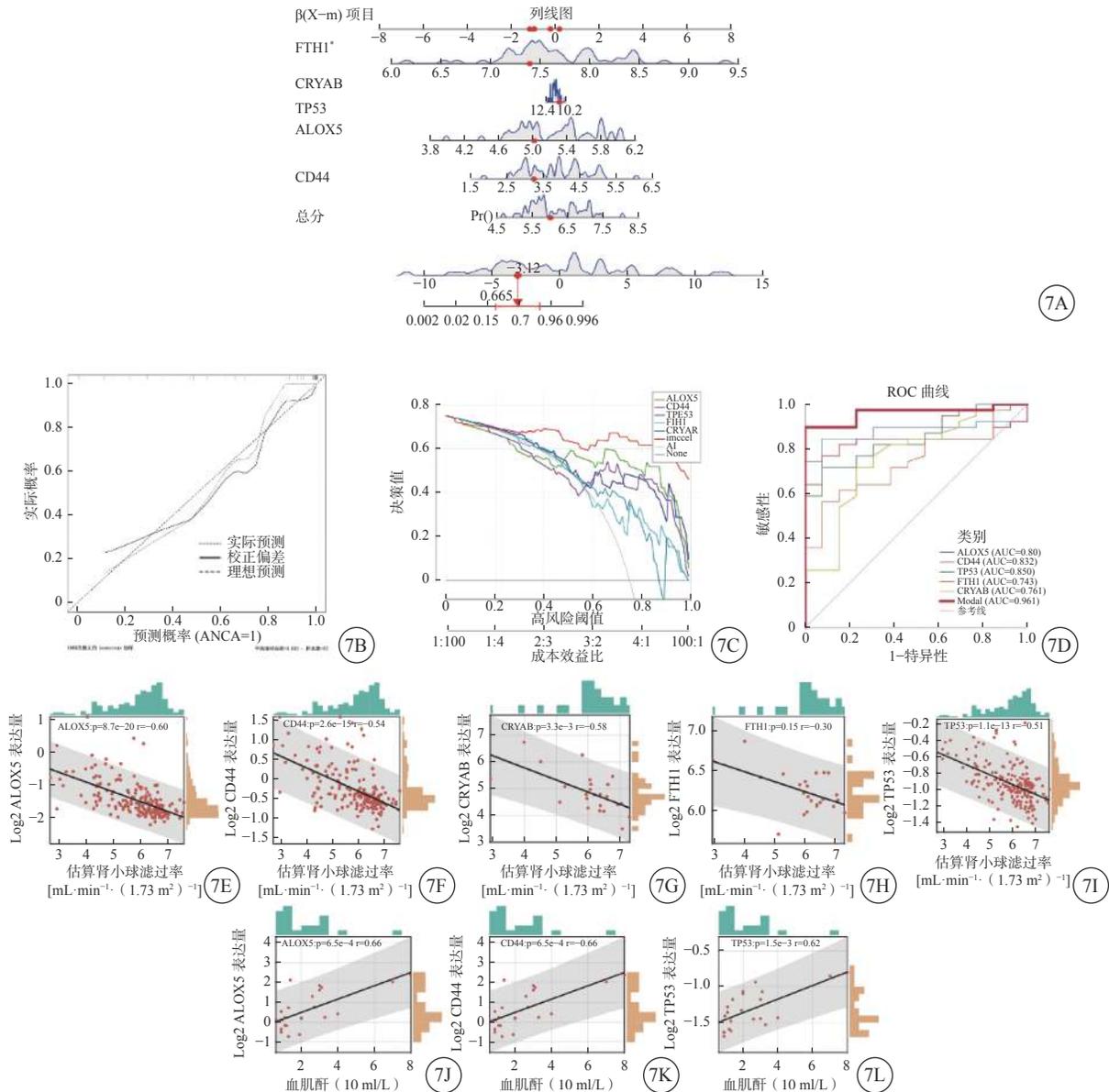


图 7 临床诊断性模型的构建和临床肾功能的相关性分析 7A.预测 AAV 伴肾损伤的发生的列线图; 7B 校准曲线评价模型的校准度; 7C.决策曲线分析评估模型的临床决策效益; 7D.ROC 曲线评价模型的鉴别能力; 7E~7I.FRGs 与 GFR 之间的相关性散点图; 7J~7L.FRGs 与 Scr 之间的相关性散点图

关,而且与 GFR 均呈显著负相关,其可能通过巨噬相关免疫反应参与 AAV 的肾损伤过程。然而,关于 TP53 和 ALOX5 如何在 AAV 伴肾损害发生发展中作用仍有待进一步研究。总之,这些发现表明 FRGs 在 AAV 伴肾损害的发生发展中起重要作用,并且有助于阐明 AAV 伴肾损伤的发病机制和开发用于诊断和靶向治疗的新生物标志物。

该研究有一定的局限性。首先,由于缺乏每位患者的临床信息,如性别、年龄、治疗方案、临床分型、肾功能、预后等,无法对所有样本的铁死亡模式、临床分型和其他临床特征进行相关分析。其次,尽管该研究合并多中心的数据,但样本量仍

不够,未来仍需要更大样本量的研究。此外,基于 AAV 伴肾损伤和健康样本的研究,主要通过生物信息学分析获得,这需要进一步的基础实验验证。

总之,本研究通过观察到健康个体和 AAV 伴肾损害患者之间大多数铁死亡基因的表达存在显著差异。由无监督聚类法鉴定出两种生物学功能不同的铁死亡亚型,其中亚型 A 与免疫密切相关。通过两种机器学习算法确定了五个铁死亡特征基因,它们不仅与免疫细胞浸润和临床肾功能密切相关,同时以其构建的临床诊断模型可为临床决策提供参考。

利益冲突 所有作者均声明没有利益冲突

参 考 文 献

- [1] Jennette JC, Falk RJ, Bacon PA, et al. 2012 revised international chapel hill consensus conference nomenclature of vasculitides[J]. *Arthritis Rheum*, 2013, 65(1): 1-11. DOI: 10.1002/art.37715.
- [2] Hruskova Z, Stel VS, Jayne D, et al. Characteristics and outcomes of granulomatosis with polyangiitis (wegener) and microscopic polyangiitis requiring renal replacement therapy: results from the European renal association–european dialysis and transplant association registry[J]. *Am J Kidney Dis*, 2015, 66(4): 613-620. DOI: 10.1053/j.ajkd.2015.03.025.
- [3] Geetha D, Jefferson JA. ANCA-associated vasculitis: core curriculum 2020[J]. *Am J Kidney Dis*, 2020, 75(1): 124-137. DOI: 10.1053/j.ajkd.2019.04.031.
- [4] Lionaki S, Hogan SL, Jennette CE, et al. The clinical course of ANCA small-vessel vasculitis on chronic dialysis.[J]. *Kidney international*, 2009, 76(6): 644-51. DOI: 10.1038/ki.2009.218.
- [5] Martin-Sanchez D, Ruiz-Andres O, Poveda J, et al. Ferroptosis, but Not Necroptosis, Is Important in Nephrotoxic Folic Acid-Induced AKI[J]. *Journal of the American Society of Nephrology:JASN*, 2017, 28(1): 218-29. DOI: 10.1681/ASN.2015121376.
- [6] Ma DL, Li C, Jiang PL, et al. Inhibition of ferroptosis attenuates acute kidney injury in rats with severe acute pancreatitis[J]. *Dig Dis Sci*, 2021, 66(2): 483-492. DOI: 10.1007/s10620-020-06225-2.
- [7] Angeli JPF, Schneider M, Proneth B, et al. Inactivation of the ferroptosis regulator Gpx4 triggers acute renal failure in mice[J]. *Nat Cell Biol*, 2014, 16(12): 1180-1191. DOI: 10.1038/ncb3064.
- [8] Zhang J, Bi JB, Ren YF, et al. Involvement of GPX4 in irisin's protection against ischemia reperfusion-induced acute kidney injury[J]. *J Cell Physiol*, 2021, 236(2): 931-945. DOI: 10.1002/jcp.29903.
- [9] Reznik E, Jiang H, Hakimi AA. Chemerin Tips the Scales in ccRCC to Evade Ferroptosis.[J]. *Cancer discovery*, 2021, 11(8): 1879-80. DOI: 10.1158/2159-8290.
- [10] Grayson PC, Eddy S, Taroni JN, et al. Metabolic pathways and immunometabolism in rare kidney diseases[J]. *Ann Rheum Dis*, 2018; annrheumdis-2017. DOI: 10.1136/annrheumdis-2017-212935.
- [11] Brix SR, Stege G, Disteldorf E, et al. CC chemokine ligand 18 in ANCA-associated crescentic GN[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2015, 26(9): 2105-2117. DOI: 10.1681/ASN.2014040407.
- [12] Leek JT, Johnson WE, Parker HS, et al. The sva package for removing batch effects and other unwanted variation in high-throughput experiments[J]. *Bioinformatics*, 2012, 28(6): 882-883. DOI: 10.1093/bioinformatics/bts034.
- [13] Wilkerson MD, Hayes DN. ConsensusClusterPlus: a class discovery tool with confidence assessments and item tracking[J]. *Bioinformatics*, 2010, 26(12): 1572-1573. DOI: 10.1093/bioinformatics/btq170.
- [14] Lambrechts D, Wauters E, Boeckx B, et al. Phenotype molding of stromal cells in the lung tumor microenvironment[J]. *Nat Med*, 2018, 24(8): 1277-1289. DOI: 10.1038/s41591-018-0096-5.
- [15] Friedman J, Hastie T, Tibshirani R. Regularization paths for generalized linear models via coordinate descent[J]. *J Stat Softw*, 2010, 33(1): 1-22.
- [16] Sanz H, Valim C, Vegas E, et al. SVM-RFE: selection and visualization of the most relevant features through non-linear kernels[J]. *BMC Bioinformatics*, 2018, 19(1): 432. DOI: 10.1186/s12859-018-2451-4.
- [17] Shen SP, Wang GR, Zhang RY, et al. Development and validation of an immune gene-set based Prognostic signature in ovarian cancer[J]. *EBioMedicine*, 2019, 40: 318-326. DOI: 10.1016/j.ebiom.2018.12.054.
- [18] Zhang B, Wu Q, Li B, et al. m⁶A regulator-mediated methylation modification patterns and tumor microenvironment infiltration characterization in gastric cancer[J]. *Mol Cancer*, 2020, 19(1): 53. DOI: 10.1186/s12943-020-01170-0.
- [19] Jiang XJ, Stockwell BR, Conrad M. Ferroptosis: mechanisms, biology and role in disease[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2021, 22(4): 266-282. DOI: 10.1038/s41580-020-00324-8.
- [20] Law BMP, Wilkinson R, Wang XJ, et al. Interferon- γ production by tubulointerstitial human CD56^{bright} natural killer cells contributes to renal fibrosis and chronic kidney disease progression[J]. *Kidney Int*, 2017, 92(1): 79-88. DOI: 10.1016/j.kint.2017.02.006.
- [21] Berti A, Cavalli G, Campochiaro C, et al. Interleukin-6 in ANCA-associated vasculitis: rationale for successful treatment with tocilizumab[J]. *Semin Arthritis Rheum*, 2015, 45(1): 48-54. DOI: 10.1016/j.semarthrit.2015.02.002.
- [22] Kallenberg CGM. Pathogenesis of ANCA-associated vasculitides[J]. *Ann Rheum Dis*, 2011, 70(Suppl 1): i59-i63. DOI: 10.1136/ard.2010.138024.
- [23] Krolkoski M, Monslow J, Puré E. The CD44-HA axis and inflammation in atherosclerosis: a temporal perspective[J]. *Matrix Biol*, 2019, 78/79: 201-218. DOI: 10.1016/j.matbio.2018.05.007.
- [24] Kato T, Okumi M, Kakuta Y, et al. Adipose tissue-derived stem cells suppress acute cellular rejection via TSG-6 and CD44 interaction in rat kidney transplantation[J]. *Transplantation*, 2014, 98: 336. DOI: 10.1097/00007890-201407151-01081.
- [25] Kei U, Takashi M, Satoshi S, et al. Implantation of dedifferentiated fat cells ameliorated antineutrophil cytoplasmic antibody glomerulonephritis by immunosuppression and increases in tumor necrosis factor-stimulated gene-6[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2022, 13(1): 319. DOI: 10.1186/s13287-022-03014-8.
- [26] Justin K, Marsela B, Thomas BSI, et al. HSPB₅ suppresses renal inflammation and protects lupus-prone NZB/W F1 mice from severe renal damage[J]. *Arthritis Res Ther*, 2022, 24(1): 267. DOI: 10.1186/s13075-022-02958-9.
- [27] Patino E, Bhatia D, Vance SZ, et al. Iron therapy mitigates chronic kidney disease progression by regulating intracellular iron status of kidney macrophages[J]. *JCI Insight*, 2023, 8(1). DOI: 10.1172/jci.insight.159235.
- [28] Motzer RJ, Banachereau R, Hamidi H, et al. Molecular subsets in renal cancer determine outcome to checkpoint and angiogenesis blockade[J]. *Cancer Cell*, 2020, 38(6): 803-817.e4. DOI: 10.1016/j.ccell.2020.10.011.
- [29] Kuczler MD, Zieren RC, Dong L, et al. Advancements in the identification of EV derived mRNA biomarkers for liquid biopsy of clear cell renal cell carcinomas[J]. *Urology*, 2022, 160: 87-93. DOI: 10.1016/j.urology.2021.11.002.

(收稿日期: 2023-01-04)