

生信分析初步探索血小板因子 4 在阿尔茨海默病中的潜在作用机制

The potential mechanism of platelet factor 4 in Alzheimer's disease explored by bioinformatics analysis

牛 镜^{1,2}, 李龙图¹, 王佳佳^{1,2},
向 倩^{1,2}, 刘志艳¹

(1. 北京大学 第一医院 临床药理研究所, 北京 100034; 2. 徐州医科大学 药学院, 江苏 徐州 221004)

NIU Jing^{1,2}, LI Long-tu¹,
WANG Jia-jia^{1,2}, Xiang Qian^{1,2},
LIU Zhi-yan¹

(1. Institute of Clinical Pharmacology, Peking University First Hospital, Beijing 100034, China; 2. School of Pharmacy, Xuzhou Medical University, Xuzhou 221004, Jiangsu Province, China)

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82404749); 中央高水平医院临床科研业务费资助项目[北京大学第一医院跨学科交叉研究专项 (2024IR28); 北京大学第一医院科研“希望之星”专项 (2023XW06)]

作者简介: 牛镜 (2000 -), 女, 硕士研究生, 主要从事临床药学方面的工作和研究

通信作者: 刘志艳, 副主任药师

MP: (010) 82802548

E-mail: liuzhiyan09@163.com

摘要: **目的** 应用网络药理学和生信分析技术探讨血小板因子 4 (PF4) 在阿尔茨海默病 (AD) 中的潜在作用。 **方法** 应用 PubChem 和 SwissTargetPrediction 数据库收集 PF4 的相关靶点、GeneCards 和 DisGeNET 数据库收集 AD 靶点; 用 STRING 数据库获取共同基因的蛋白质间相互作用关系, 构建蛋白-蛋白相互作用 (PPI) 网络; 利用 DAVID 数据库对共有靶点进行基因本体 (GO) 功能及京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路富集分析; 利用 VascularSingleCells 数据库查询 PF4 在小鼠脑血管相关细胞内表达情况, 通过 AlzData 数据库分析 PF4 在已知 AD 患者数据集中的验证。 **结果** 统计分析后共整理得到 PF4 相关靶点 102 个, AD 相关靶点 2 403 个, 2 者共同靶点 51 个。富集分析发现共同靶点主要参与癌症中的通路、中性粒细胞胞外诱捕网形成、白细胞介素-17 (IL-17) 信号通路、血小板活化和松弛素信号通路等; 脑血管单细胞数据中分析得到 PF4 仅在小胶质细胞中表达。HPA 数据库分析结果表明 PF4 在人脑中 RNA 表达主要在大脑皮质区, 少部分在杏仁核中表达。 **结论** PF4 可能是通过中性粒细胞胞外诱捕网形成、IL-17 信号通路改善神经元活力、氧化应激和减轻炎症反应, 从而影响 AD 进展。

关键词: 血小板因子 4; 阿尔茨海默病; 网络药理学; 生信分析

DOI: 10.13699/j.cnki.1001-6821.2025.17.021

中图分类号: R96 **文献标志码:** B

文章编号: 1001-6821 (2025) 17-2521-05

Abstract: Objective To explore the potential role of platelet factor 4 (PF4) in Alzheimer's disease (AD) by network pharmacology and bioinformatics analysis. **Methods** PubChem and SwissTargetPrediction databases were used to collect PF4 related targets, GeneCards and DisGeNET databases were used to collect AD targets; the protein-protein interaction (PPI) network was constructed by using STRING database to obtain the protein-protein interaction of common genes. Gene ontology (GO) function and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) pathway enrichment analysis of common targets were performed using DAVID database. The VascularSingleCells database was used to query the expression of PF4 in mouse cerebrovascular-related cells, and the AlzData database was used to analyze the verification of PF4 in the data set of known AD patients. **Results** A total of 102 PF4-related targets, 2 403 AD targets and 51 common targets were obtained. Enrichment analysis showed that the common targets were mainly involved in cancer pathways, neutrophil

extracellular trap formation, Interleukin - 17 (IL - 17) signaling pathway, platelet activation and relaxin signaling pathway. Analysis of cerebrovascular single cell data showed that PF4 was only expressed in microglia. The results of HPA database analysis showed that PF4 was mainly expressed in the cerebral cortex, and a small part was expressed in the amygdala. **Conclusion** PF4 may interfere with AD by improving neuronal viability, oxidative stress and reducing inflammatory response through neutrophil extracellular trapping network formation, IL - 17 signaling and other pathways.

Key words: platelet factor 4; Alzheimer's disease; network pharmacology; biographical analysis

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是一种与年龄相关的中枢神经系统退行性疾病,表现为进行性记忆减退和认知能力障碍^[1]。随着我国人口预期寿命的增加和老龄化的速度逐渐加快,患AD人数的不断增加给社会和家庭带来巨大负担。据国际AD协会估计,目前全球有超过5 000万的患者,预计2050年人数将增加2倍^[2],AD将成为威胁全人类健康的重要疾病。目前临床上治疗AD的药物有胆碱酯酶抑制剂、兴奋性氨基酸受体拮抗剂、脑蛋白水解物及其他缓解AD症状的药物^[3],但这些药物只能缓解疾病,不能逆转疾病进展。综上,AD有效治疗药物的研发仍是当前临床诊疗的难点与痛点问题。

血小板因子4(platelet factor 4, PF4),也称为趋化因子受体4(C-X-C chemokine receptor type 4),是一种从血小板释放的趋化因子,参与凝血和免疫调节功能^[4]。最新研究表明,血液中PF4有望是逆转大脑衰老的关键^[5]。研究表明,注射PF4可以显著减轻老年小鼠的认知功能障碍,而PF4水平下降会以年龄依赖性方式加速认知功能下降;PF4能够改善老年小鼠海马体神经炎症,表现出与突触可塑性相关的分子变化^[6]。炎症增加与年龄相关的AD之间的关系密切相关,PF4的有益作用可能更广泛地扩展到AD中,但其具体机制暂不清楚。因此本研究利用网络药理学和生信分析技术探索PF4对AD的影响,预测其分子信号机制,为PF4治疗AD提供生物信息学基础。

资料与方法

1 PF4靶点的获取

在化源网(<https://www.chemsrc.com/>)中检索“PF4”,获取其化学文摘社(chemical abstracts service, CAS)编号,再通过PubChem数据库(<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)检索CAS号^[7],获得表示其化学成分结构的简化分子线性输入规范形式(canonical simplified molecular input line entry system,

Canonical SMILES)序列及2D结构,保存为“sdf”格式。将获取的Canonical SMILES序列及2D结构导入SwissTargetPrediction数据库(<http://www.swisstargetprediction.ch/>)进行靶点预测,设置物种为“Homo sapiens”,以 $P > 0.05$ 为筛选条件,遴选得到PF4相关靶点。

2 AD相关靶点的获取

以“Alzheimer's disease”为关键词,分别在DisGeNET数据库(<http://www.disgenet.org/>)、Gene Cards数据库(<http://www.genecards.org/>)中检索得到AD相关的潜在靶点^[8]。在GeneCards数据库及DisGeNET数据库中,score值越高则代表该靶点与疾病联系密切,设定score值>中位数的目标靶点为AD相关的潜在靶点,合并2个疾病数据库获得的靶点后,删除重复靶点,得到AD相关靶点。

3 PF4-AD共有靶点蛋白质-蛋白质相互作用(protein-protein interaction, PPI)网络构建及核心靶点的筛选

为探究PF4与AD靶点间的相互作用,利用Venny 2.1.1软件分析2者靶点取交集并绘制韦恩图,最终获得PF4治疗AD的潜在作用靶点。将获得的两者共有靶点输入STRING数据库(<https://string-db.org/>),设定物种为“Homo sapiens”,最小互相作用阈值设定为“medium confidence”(0.4),其余均为默认设置,构建共有靶点PPI网络图^[9]。将PPI网络导入Cytoscape软件中,使用Cytoscape软件中的cytoHubba插件,选取度值最高的10个基因作为核心靶点。

4 基因本体(gene ontology, GO)功能富集分析与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

将交集靶点导入David数据库中进行GO和KEGG富集分析($P < 0.05$,设定为物种为“Homo sapiens”),并对结果进行可视化分析,从分子功能(molecular function, MF)、细胞组分(cellular component, CC)、生物过程(biological process, BP)3个角度

得出关键靶点涉及的生物功能和信号通路。

5 PF4 在小鼠脑血管相关细胞内表达情况

以 PF4 为关键词在小鼠脑和肺血管及血管相关细胞类型数据库 VascularSingleCells (<http://betsholtzlab.org/VascularSingleCells/database.html>) 进行搜索, 该数据库包含脑的 3 436 个单细胞转录组以及小鼠肺的 1 504 个单细胞转录组结果。通过检索, 获得 PF4 在小鼠脑血管相关细胞内表达情况。

6 PF4 人脑中 RNA 表达情况

Human Protein Atlas (HPA, <https://www.proteinatlas.org/>) 数据库是利用转录组学和蛋白质组学技术, 是一个从 RNA 和蛋白水平研究人类不同组织、细胞和器官中蛋白表达情况的数据库, 在 HPA 数据库内以 PF4 为关键词进行搜索, 观察 PF4 人脑中 RNA 表达情况, 为实验验证提供支撑。

7 PF4 在已知 AD 患者数据集中的验证

AlzData 是一个基于多个 AD 数据集建立的公开使用的数据库 (<http://www.alzdata.org/index.html>)。5 个海马数据集被整合, 包括 GSE28146、GSE29378、GSE36980、GSE48350、GSE5281。所有样品中的差异基因根据年龄和性别进行调整, 将 PF4 在此数据库中进行进一步验证。关键基因表达改变以 log2 形式展现, P 值为调整后的 P 值。

结 果

1 PF4 潜在靶点的筛选结果

Swiss Target Prediction 数据库查询得到的所有 PF4 潜在靶点, 删除重复, 整合得到 102 个作用靶点。所得的靶点输入 Uniprot 数据库中, 使用 Uniprot KB 查询出靶蛋白对应靶基因的规范名称。

2 AD 相关靶点的筛选结果

在 DisGeNET 数据库检索结果中, 设定 score ≥ 0.1 , 筛选后得到 673 个靶点; 在 Gene Cards 数据库检索结果中, 设定 Score ≥ 10 , 筛选后得到 2 052 个靶点; 2 个数据库靶点合并、删除重复靶点后, 最终得到 2 403 个 AD 相关靶点。

3 PF4-AD 共有靶点 PPI 网络构建及核心基因的筛选

将筛选的 PF4 靶点与 AD 靶点取交集, 得到 PF4 与 AD 共同靶点 51 个。将 149 个共有靶点提交至 STRNG 11.0 平台, 隐藏不与其他靶点有联系的靶点后, 得到共有靶点 PPI 网络, 该网络共包括 51 个节点、271 条边, 平均度值为 10.6。说明每个靶点平均有

10.6 个靶点与之相连, 且网络中各个靶点之间的关联性较强。使用 Cytoscape 软件中的 cyto Hubba 插件, 根据度值筛选出了 10 个连接度最高的基因, 可视化结果见表 1。以上结果表明这些基因可能是 PF4 治疗阿尔茨海默病的核心靶点, 核心靶点中度值排名前 3 的基因为信号传导及转录激活因子 3 (signal transducers and activators of transcription 3, *STAT3*)、原癌基因酪氨酸蛋白激酶 (proto-oncogene tyrosine-protein kinase, *SRC*)、基质金属蛋白酶-9 (matrix metalloproteinase-9, *MMP-9*)。

4 GO 功能与 KEGG 通路富集分析

将交集靶点导入 David 数据库进行 GO 功能分析与 KEGG 通路富集分析。交集靶点涉及的生物过程包括胶原分解代谢过程、蛋白水解、对 β 淀粉样蛋白 (β -amyloid protein, $A\beta$) 的反应、 β -淀粉样蛋白代谢过程等。相关的细胞成分包括质膜外侧、细胞外基质、细胞表面、膜筏、细胞外分泌体等。涉及的分子功能包括内肽酶活性、酶结合、丝氨酸型内肽酶活性、锌离子结合等。参与的通路主要涉及癌症中的通路、中性粒细胞胞外诱捕网形成、IL-17 信号通路、血小板活化和松弛素信号通路等。表明 PF4 的作用靶点分布于不同的代谢通路, 它们可能是 PF4 改善 AD 的作用机制。

5 PF4 在小鼠脑和肺血管及血管相关细胞内表达结果

通过 VascularSingleCells 数据库分析, 结果表明, 在脑血管单细胞数据中 PF4 仅在 MG (microglia, MG) 小胶质细胞表达, 在其他脑血管细胞中几乎无表达。

6 PF4 人脑中 RNA 表达结果

通过 HPA 数据库分析, 结果表明 PF4 在人脑中

表 1 核心靶点度值排序表

Table 1 Ranking table of degree values of core targets

Rank	Name	Degree Score
1	<i>STAT3</i>	54
2	<i>SRC</i>	52
2	<i>MMP9</i>	52
4	<i>MMP2</i>	48
4	<i>PTGS2</i>	48
6	<i>CXCR4</i>	40
7	<i>SIRT1</i>	38
7	<i>CTSB</i>	38
9	<i>ACE</i>	36
10	<i>MMP3</i>	32

RNA 表达主要在大脑皮质区,少部分在杏仁核中表达。

7 PF4 在已知 AD 患者数据集中的验证结果

将 PF4 已知公共的 AD 患者数据库中进行验证,在已知 AD 患者数据库海马体样本中(数据集: GSE29378),与正常对照组相比 PF4 基因的表达水平明显升高,见图 1。AD 患者不同脑区特征基因的表达景观,与正常对照组相比,AD 患者海马和颞叶皮层中 PF4 的表达显著升高,见图 2。

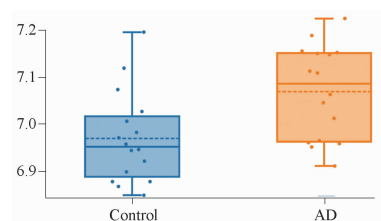


图 1 阿尔茨海默病(AD)患者海马体中血小板因子 4(PF4) 表达水平

Figure 1 Platelet factor 4 (PF4) expression levels in the hippocampus of Alzheimer's disease (AD) patients

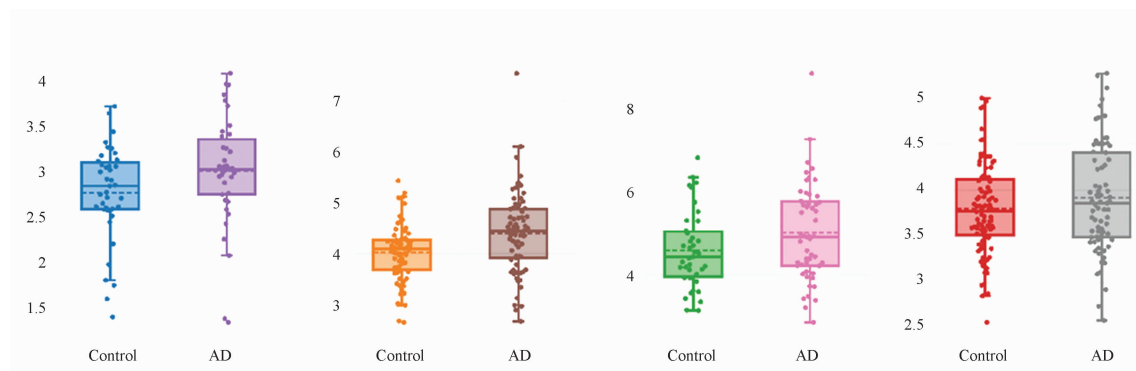


图 2 AD 患者不同脑区 PF4 的表达情况

Figure 2 PF4 expression in different brain regions of AD patients

讨 论

AD 发病复杂,发病机制尚不明确,现已知的机制假说包括 A β 异常堆积、Tau 蛋白过度磷酸化、氧化应激、神经炎症反应等^[10]。本研究通过网络药理学和分子对接的方法预测了 PF4 干预 AD 相关的关键靶点及通路。

本研究发现,PF4 在脑血管单细胞中主要在 MG 小胶质细胞表达,在人脑中 RNA 表达主要在大脑皮质区;AD 患者海马和颞叶皮层中 PF4 的表达较正常组显著升高。小胶质细胞是中枢神经系统的先天免疫细胞,在神经炎症的调节中发挥着关键作用。神经炎症与许多中枢神经系统疾病有关,包括 AD 和帕金森病^[11]。本研究提示,PF4 可能是通过 *STAT3*、*SRC*、*MMP9* 等核心靶点发挥作用。炎症反应在 AD 早期阶段病理过程中发挥着重要作用,颅内神经炎症是 AD 的关键驱动因素^[12]。*STAT3* 是一种转录因子,是炎症信号的重要调节因子^[13];AD 模型病理过程和 AD 患者脑中也检测到了活化形式的 *STAT3* 上调^[14]。此外,在星形胶质细胞中通过小干扰 RNA 干扰 *STAT3* 的表达可减少炎症因子白细胞介素-1 β 和肿瘤坏死

因子- α ,抑制星形胶质细胞激活并部分缓解神经元损伤^[15]。*SRC* 是一种非受体酪氨酸激酶基因^[16],对小胶质细胞的吞噬、黏附、激活、炎症因子的产生等多个过程都有重要的作用^[17]。KEGG 富集结果主要涉及癌症中的通路、中性粒细胞胞外诱捕网形成、IL-17 信号通路、血小板活化和松弛素信号通路等。中性粒细胞胞外陷阱的形成是中性粒细胞用来捕获和有效限制各种微生物靶标造成的损伤的一种防御机制^[18],中性粒细胞运输可能导致慢性血脑屏障损伤和炎症^[19]。IL-17 是一种主要的促炎细胞因子,介导对病原体或组织损伤的反应^[20];研究表明解毒益智方及其活性成分 β -谷甾醇通过抑制海马组织中 IL-17-p53 信号通路,减轻了神经炎症并抑制了细胞凋亡,进而改善 AD 模型小鼠的认知功能^[21]。

综上,基于网络药理学方法对 PF4 影响 AD 的潜在靶点进行了预测,并对潜在靶点进行了蛋白互作研究与通路富集分析,为 AD 疾病机制的探索提供了理论基础。同时本研究也具有一定的局限性,所得结论建立于数据库及网络药理学技术,缺乏相关实验的验证。后期可在药效学和细胞水平层面进行论证,以期进一步明确 PF4 影响 AD 的物质基础与作用机制,为其进一步深入研究提供思路和参考。

参考文献:

- [1] KHAN S, BARVE K H, KUMAR M S. Recent Advancements in Pathogenesis, Diagnostics and Treatment of Alzheimer's Disease [J]. *Curr Neuroparmacol*, 2020,18(11):1106—1125.
- [2] SCHELTENS P, DE STROOPER B, KIVIPILTO M, *et al*. Alzheimer's disease [J]. *Lancet*, 2021, 397 (10284): 1577—1590.
- [3] 张小林, 曾嘉伟, 陈孝, 等. 阿尔茨海默病药物治疗的中英指南对比及解析[J]. *中国全科医学*, 2021,24(12):1454—1458.
- [4] WARKENTIN T E. Platelet – activating anti – PF4 disorders: An overview[J]. *Semin Hematol*, 2022,59(2):59—71.
- [5] IZQUIERDO J M. Blood platelet factor 4: The elixir of brain rejuvenation[J]. *Mol Neurodegener*, 2024,19(1):3.
- [6] SCHROER A B, VENTURA P B, SUCHAROV J, *et al*. Platelet factors attenuate inflammation and rescue cognition in ageing[J]. *Nature*, 2023,620(7976):1071—1079.
- [7] KIN S, CHEN J, CHENG T, *et al*. PubChem in 2021: New data content and improved web interfaces[J]. *Nucleic Acids Res*, 2021, 49(D1):D1388—D1395.
- [8] PINERO J, RAMIREZ – ANGUIA J M, SAUCH – PITARCH J, *et al*. The DisGeNET knowledge platform for disease genomics: 2019 update[J]. *Nucleic Acids Res*, 2020,48(D1):D845—D855.
- [9] MEHRYARY F, NASTOU K, OHA T, *et al*. STRING – ing together protein complexes: Corpus and methods for extracting physical protein interactions from the biomedical literature [J]. *Bioinformatics*, 2024,40(9):btae552.
- [10] 贾建平, 王舒衡. 阿尔茨海默病发病机制及治疗进展[J]. *中风与神经疾病杂志*, 2023,40(5):387—390.
- [11] BOYD A, BYME S, MIDDLETON R J, *et al*. Control of Neuroinflammation through radiation – induced microglial changes [J]. *Cells*, 2021,10(9):2381.
- [12] LENG F, EDISON P. Neuroinflammation and microglial activation in Alzheimer disease: Where do we go from here [J]. *Nat Rev Neurol*, 2021,17(3):157—172.
- [13] XU Z C, XUE T, ZHANG Z X, *et al*. Role of signal transducer and activator of transcription – 3 in up – regul ation of GFAP after epilepsy[J]. *Neurochem Res*, 2011, 36(12):2208—2215.
- [14] REICHENBACH N, DELEKATE A, PLESCHER M, *et al*. Inhibition of Stat3 – mediated astrogliosis ameliorates pathology in an Alzheimer's disease model [J]. *EMBO Mol Med*, 2019, 11(2): e9665. 2019 – 01 – 07 [2024 – 06 – 02]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30617153/>.
- [15] CHEN E, XU D S, LAN X Q, *et al*. A novel role of the STAT3 pathway in brain inflammation – induced human neural progenitor cell differentiation [J]. *Curr Mol Med*, 2013, 13 (9): 1474—1484.
- [16] RITZERFELD J, REMMELE S, WANG T, *et al*. Phenotypic profiling of the human genome reveals gene products involved in plasma membrane targeting of SRC kinases[J]. *Genome Res*, 2011, 21(11):1955—1968.
- [17] SOCODATO R, PORTUGAL C C, DOMITH I, *et al*. c – Src function is necessary and sufficien for triggering microglial cell activation[J]. *Glia*, 2015, 63 (3):497—511.
- [18] KOLACZKOWSKA E, KUBES P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation[J]. *Nat Rev Immunol*, 2013, 13(3):159—75.
- [19] ZENARO E, PIETRONIGRO E, DELLA BIANCA V, *et al*. Neutrophils promote Alzheimer's disease – like pathology and cognitive decline via LFA – 1 integrin [J]. *Nat Med*, 2015, 21 (8):880—886.
- [20] CHEN E, XU D S, LAN X Q, *et al*. A novel role of the STAT3 pathway in brain inflammation – induced human neural progenitor cell differentiation[J]. *Curr Mol Med*, 2013,13(9):1474—1484.
- [21] 王星烨. 解毒益智方通过 IL – 17 – p53 通路抑制神经炎症对阿尔茨海默病小鼠认知功能的改善作用[D]. 吉林 长春:长春中医药大学,2024.

(收稿日期 2024 – 06 – 03)