

FKTN

陈 成, 苏丹艳, 覃素元, 黄钰钦, 叶冰冰, 黄滢云, 庞玉生

(广西医科大学第一附属医院儿科, 广西 南宁 530021)

摘要:目的 探讨 FKTN 基因突变在扩张型心肌病的致病机制。方法 在 Gene Expression Omnibus 数据库下载与 FKTN 相关的 GSE138280 基因表达谱, 对该表达谱 FKTN 基因突变心肌组织及正常心肌组织的表达进行差异分析, 并使用热图 R 包来呈现 FKTN 基因突变心肌组织的差异表达基因, 进一步通过差异表达基因的富集分析来寻找富集通路, 在富集通路上利用蛋白互作网络分析, 寻找 FKTN 基因突变心肌组织的关键通路蛋白, 寻找其致病机制及治疗靶点。结果 FKTN 基因生物信息学分析中, 与健康对照组相比, FKTN 突变组鉴定出 5636 个差异表达基因, 其中 2630 个上调, 3006 个下调。在上调基因中, GO 分析发现主要集中在炎症反应、细胞外基质胶原纤维增殖方面, KEGG 通路分析发现主要富集在细胞因子-细胞因子受体的相互作用、白介素 17 信号通路、肿瘤坏死因子信号通路、趋化因子信号通路、P53 信号通路及细胞外基质受体相互作用, 蛋白质互作网络分析发现关键的节点基因有 Fn1、CD44、Kif18a、CXC、Saa3; 在下调基因中, GO 分析发现主要集中在钙的转运、心肌收缩、内质网、肌小节、微管、蛋白糖基化, KEGG 通路分析发现主要富集在心肌收缩、扩张型心肌病、钙信号通路, 蛋白质互作网络分析发现关键的节点基因有 Asb15、Efcab2。结论 FKTN 突变 DCM 小鼠的发病机制可能与心肌细胞内钙稳态、心肌细胞炎症、微管异常、细胞外基质增生有关。

关键词: 扩张型心肌病; 基因检测; FKTN; 生物信息学

中图分类号: R542.2

文献标识码: A

DOI: 10.3969/j.issn.1006-1959.2025.09.002

文章编号: 1006-1959(2025)09-0008-06

Bioinformatics Analysis of FKTN Mutant Dilated Cardiomyopathy Related Genes

CHEN Cheng, SU Danyan, QIN Suyuan, HUANG Yuqin, YE Bingbing, HUANG Yanyun, PANG Yusheng

(Department of Pediatrics, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi, China)

Abstract: **Objective** To investigate the pathogenic mechanism of FKTN gene mutation in dilated cardiomyopathy. **Methods** The GSE138280 gene expression profile related to FKTN was downloaded from the Gene Expression Omnibus database, and the differential expression of FKTN gene mutation myocardial tissue and normal myocardial tissue was analyzed. The heatmap R package was used to display the differentially expressed genes in the FKTN gene mutant myocardial tissue, and further enrichment analysis of the differentially expressed genes was performed to find the enrichment pathways. Protein interaction network analysis was used to find the key pathway proteins in the FKTN gene mutant myocardial tissue, and to find its pathogenic mechanism and therapeutic targets. **Results** Bioinformatics analysis of FKTN gene showed that compared with the healthy control group, 5636 differentially expressed genes were identified in the FKTN mutation group, of which 2630 were up-regulated and 3006 were down-regulated. Among the up-regulated genes, GO analysis found that it was mainly concentrated in inflammatory response and extracellular matrix collagen fiber proliferation. KEGG pathway analysis found that they were mainly enriched in the interaction of cytokine-cytokine receptor, interleukin-17 signaling pathway, tumor necrosis factor signaling pathway, chemokine signaling pathway, P53 signaling pathway and extracellular matrix receptor interaction. Protein interaction network analysis found that the key node genes were Fn1, CD44, Kif18a, CXC, Saa3; among the down-regulated genes, GO analysis found that they were mainly concentrated in calcium transport, myocardial contraction, endoplasmic reticulum, sarcomere, microtubule and protein glycosylation. KEGG pathway analysis found that they were mainly concentrated in myocardial contraction, dilated cardiomyopathy and calcium signaling pathway. Protein interaction network analysis found that the key node genes were Asb15 and Efcab2. **Conclusion** The pathogenesis of mice with FKTN mutation-related DCM may be related to intracardiac calcium homeostasis, cardiomyocyte inflammation, microtubule abnormalities, and extracellular matrix hyperplasia.

Key words: Dilated cardiomyopathy; Genetic testing; FKTN; Bioinformatics

扩张型心肌病(dilated cardiomyopathy, DCM)是 18 岁以下儿童最常见的心肌病, 主要特点是左心室

或双心室扩大并伴有心脏收缩、舒张功能障碍, 1 年死亡率为 20%, 4 年死亡率为 56%, 是心力衰竭及心脏移植最常见的原因, 严重危害患儿的身心健康^[1-3]。DCM 病因主要分为两大类, 即原发性及继发性。原发性扩张型心肌病是最常见的类型, 无有效治疗方法, 只能给予对症治疗延缓病情发展, 其病因跟基因突变有关^[4]。基因突变与 DCM 预后的严重程度相关^[5-7], 通过研究基因突变所致扩张型心肌病的机制^[8], 帮助

基金项目: 广西卫健委自筹课题(编号: Z20210993)

作者简介: 陈成(1987.6-), 男, 广西博白人, 博士, 主治医师, 主要从事儿科心血管及微创介入治疗工作

通讯作者: 庞玉生(1964.11-), 男, 广西博白人, 博士, 主任医师, 主要从事儿科心血管及微创介入治疗工作

寻找 DCM 基因治疗的靶点。最近有一项系统分析^[9]显示,扩张型心肌病患者基因型阳性表型阴性亲属存在亚临床心脏收缩功能障碍,为将来的遗传咨询及基因治疗奠定基础。

FKTN 基因是原发性心肌病致病基因之一,其编码 Fukutin 蛋白是一种活跃于高尔基复合体中的糖基转移酶,即核糖醇 5 磷酸(Rbo5P)转移酶,该酶的作用是把 Rbo5P 串联到抗肌萎缩相关糖蛋白 α 亚基(α -DG)的糖链上,当 FKTN 基因突变时,Fukutin 蛋白缺乏或减少,导致 α -DG 糖基化障碍。目前有实验证明,当 Fukutin 蛋白缺乏或减少时,骨骼肌、心肌、神经的 α -DG 糖基化受损 α -DG 不能连接到细胞外骨架,使其从肌纤维的细胞外表面膜上降解或洗脱下来,导致一系列的临床表征^[10,11]。随着研究进展,临床上 FKTN 基因突变引扩张型心肌病有心力衰竭及恶性心律失常,有猝死风险^[12,13]。FKTN 突变扩张型心肌病相关基因的生物信息学分析可以帮助寻找基因的致病机制。因此,本研究通过分析 FKTN 基因芯片 GSE138280,研究 FKTN 基因突变中的差异表达基因、GO 术语或通路的富集和蛋白-蛋白相互作用,预测潜在的靶点和药物,更好地治疗该疾病。

1 资料与方法

1.1 微阵列基因表达 基于 GPL21810 平台的 GSE138280 基因表达谱,来自 Gene Expression Omnibus 数据库,在平台中选取 3 例 FKTN 突变 DCM 小鼠和 4 例健康对照组小鼠的资料。GSE138280 的实验小鼠通过组织切片来证明 FKTN 突变小鼠左心室质量、壁厚的减少和心室的扩张。

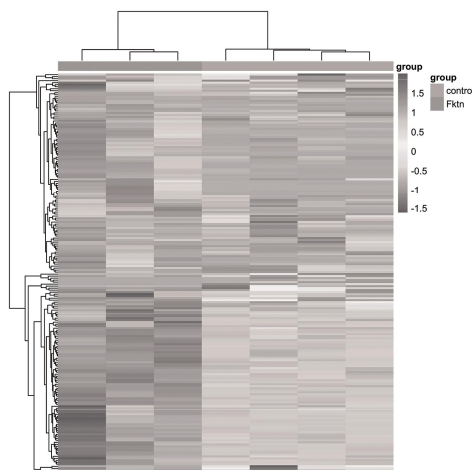
1.2 基因差异表达分析 采用 Limma R 包^[14]筛选 FK-TN 相关 DCM 与正常心脏组织样本之间的差异表达基因(设置: $P < 0.05$, $\log_2FC \geq 1$),层次聚类和可视化通过热图 R 包来实现。

1.3 差异表达基因的富集分析 运用富集分析 R 包^[15]提供基因注释和功能富集分析并可可视化的分析。将差异表达基因导入到富集分析 R 包,使用基因本体论(GO)富集功能分析^[16]对基因进行功能注释并富集,将差异表达基因的功能分为生物过程、细胞成分和分子功能,并通过基因组百科全书(KEGG)通路分析^[17]得出富集通路,富集的通道以条形图来可视化,从而帮助研究人员探索 FKTN 基因突变相关 DCM 的分子机制。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

1.4 蛋白质互作网络分析 相互作用基因/蛋白质检索工具(String)数据库(<https://string-db.org/>)存储了所有公开的蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)信息来源^[18]。因此,将差异表达基因列表上传到 STRING 数据库,建立以最低交互得分为中等标准置信度(大于 0.5)的蛋白质互作网络。随后,将相互作用网络导入 Cytoscape(<http://apps.cytoscape.org/>),利用 Cytoscape 对蛋白质互作网络进行可视化,利用 MCODE 插件对网络的重要模块进行筛选并选择最大团中心度拓扑算法排序前 10 位的枢纽节点。

2 结果

2.1 差异表达基因的确定 分层聚类显示出组内的高度同质性和组间的明显分离,与健康对照组相比,FKTN 突变组鉴定出 5636 个差异表达基因,其中 2630 个上调,3006 个下调,分层聚类热图见图 1。

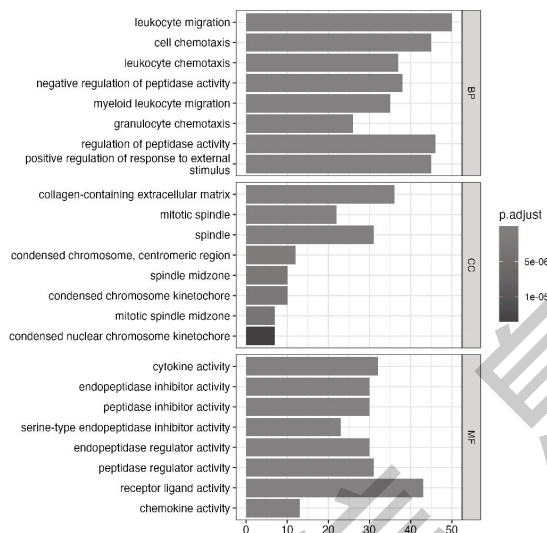


注:纵坐标为基因名,横坐标为样本名;Fktn 代表有 Fktn 基因突变 DCM 组的样本,control 代表健康对照组的样本;Fktn 组中,上半部分为高表达,下半部分为低表达。

图 1 差异基因的分层聚类热图

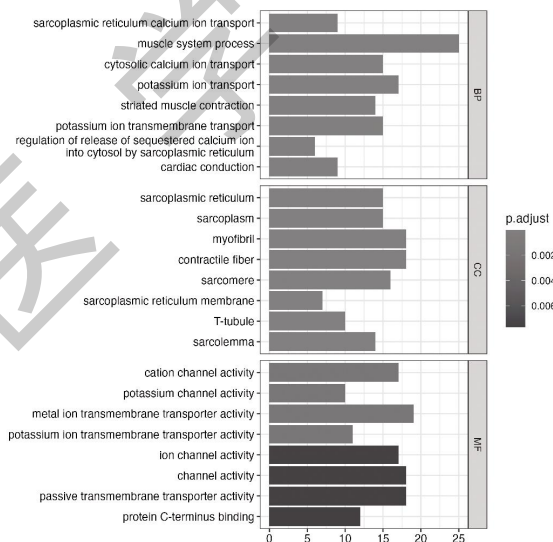
2.2 功能富集分析结果 通过 GO 功能富集分析发现,在上调基因相关的显著功能富集方面,与生物过程(biological process, BP)有关的是白细胞迁移、趋化及对外界刺激的过度反应,与细胞组分(cellular component, CC)有关的是细胞外基质胶原纤维增殖和纺锤体增生,与分子功能(molecular function, MF)

有关的是细胞因子活动、趋化因子活动、肽酶抑制活动,见图 2。在下调基因相关的显著功能富集方面,与生物过程有关的是肌浆网钙的转运、钾离子的转运及心肌收缩转导,与细胞组分有关的是内质网、肌小节、微管,与分子功能有关的是离子转运、蛋白糖基化,见图 3。



注:BP 代表生物过程,CC 代表细胞组分,MF 代表分子功能。

图 2 上调的差异表达基因 GO 分析结果



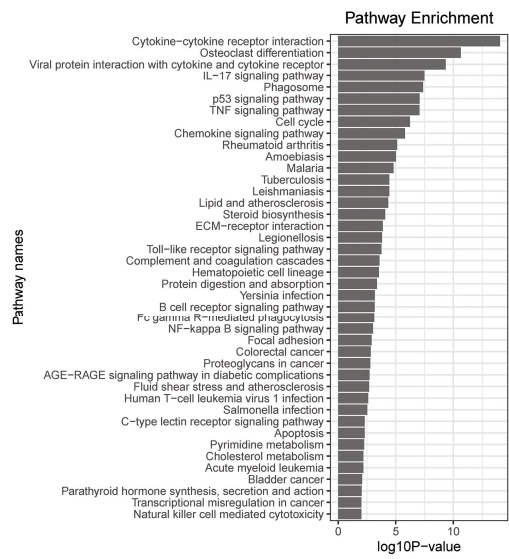
注:BP 代表生物过程,CC 代表细胞组分,MF 代表分子功能。

图 3 下调的差异表达基因 GO 分析结果

通过 KEGG 通路富集分析发现,在上调基因显著富集的通路有细胞因子-细胞因子受体的相互作用、白介素 17 信号通路、肿瘤坏死因子信号通路、趋化因子信号通路、P53 信号通路及细胞外基质受体相互作用,见图 4;在下调基因显著富集的通路有心肌收缩、扩张型心肌病、钙信号通路,见图 5。

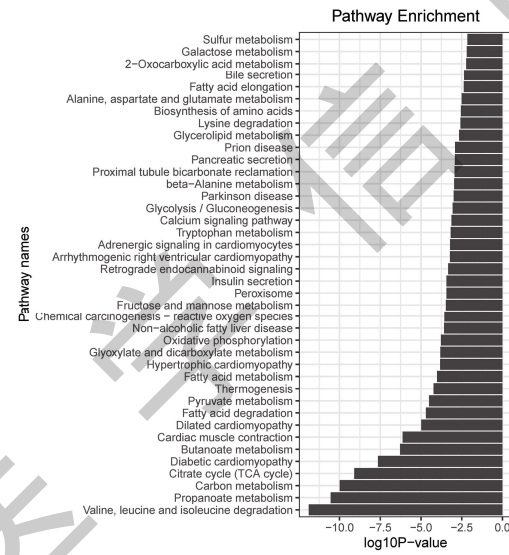
2.3 蛋白互作网络及模块分析结果 通过构建蛋白

互作网络,可以将差异表达基因编码的蛋白与隐藏网络中未连接节点之间的关系可视化。在上调基因蛋白互作网络中有 3 个显著的模块,关键的节点基因有 Fn1、CXC、Kif18a、CD44、Saa3,见图 6;在下调基因蛋白互作网络中有 2 个显著的模块,关键的节点基因有 Asb15、Efcab2,见图 7。



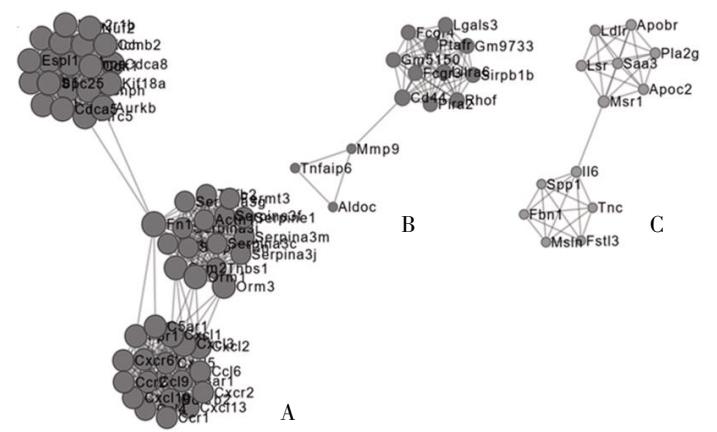
注:纵坐标为通路名,横坐标代表富集程度,柱子越长,富集程度越高。

图 4 上调的差异表达基因 KEGG 通路富集分析结果



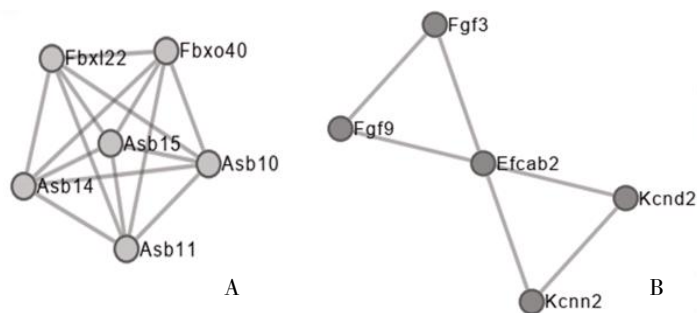
注:纵坐标为通路名,横坐标代表富集程度,柱子越长,富集程度越高。

图 5 下调的差异表达基因 KEGG 通路富集分析结果



注:A 模块的关键节点基因为 Fn1、CXC、Kif18a;B 模块的关键节点基因为 CD44;C 模块的关键节点基因为 Saa3。

图 6 上调的差异表达基因蛋白交互网络及节点分析结果



注:A 模块的关键节点基因是 Asb15;B 模块的关键节点基因是 Efcab2。

图 7 下调的差异表达基因蛋白互作网络及节点分析结果

3 讨论

目前越来越多的证据表明^[1],DCM 可能起源于各种致病因素,例如基因突变、环境影响和其他未知因素。FKTN 基因突变已明确被报告可引起 DCM^[13]。在这些病例中,FKTN 突变 DCM 患者经常出现心力衰竭和心律失常。临床上,FKTN 突变 DCM 的机制尚不清楚,也没有发现与 FKTN 突变 DCM 的相关生物标志物。有研究通过使用 FKTN 突变的小鼠,发现 FKTN 在维持心脏收缩力、钙稳态、高尔基体完整性和线粒体抗应激、细胞微管骨架方面至关重要,由于上述功能的异常,导致心肌细胞的坏死及细胞外基质的增生,被认为可能是导致 DCM 的原因^[19]。因此,通过对小鼠模型中 FKTN 突变 DCM 相关基因的生物信息学分析,可能会为 DCM 患者的致病机制、风险评估、治疗方法提供一些新的见解。

本研究通过 GEO 数据库获取 FKTN 突变 DCM 小鼠的基因表达谱 GSE138280。通过 GSE138280 鉴定了 5636 个差异表达基因,并对它们进行了功能富集和蛋白互作网络分析,确定可能在 FKTN 突变 DCM 病理生理中发挥关键调控作用的分子功能、信号通路及节点基因。

GO 和 KEGG 富集分析显示,FKTN 突变 DCM 中有几个可能富集的功能和通路。在上调基因的 GO 分析中,生物学过程、细胞组分及分子功能在白细胞趋化、细胞因子激活等炎症反应及细胞外基质增生明显上调;在上调基因的 KEGG 通路分析中,在细胞因子-细胞因子受体的相互作用、白介素 17 信号通路、肿瘤坏死因子信号通路、趋化因子信号通路等炎症通路明显富集,考虑 FKTN 突变 DCM 存在高炎症状态,而细胞外基质受体相互作用通路上调,最终导致心肌组织的纤维化。在 FKTN 突变的小鼠骨骼肌病变研究中,观察到骨骼肌炎症反应增强,导致纤维化和凋亡,使用雷帕霉素抗炎症反应后小鼠的

预后改善^[20]。本研究患者的肌肉组织病理提示炎症细胞浸润及肌细胞坏死。另一方面,在下调基因的 GO 分析中,生物学过程、细胞组分及分子功能方面在离子转运、心肌收缩、微管功能、蛋白糖基化等方面显著下调;在下调基因的 KEGG 通路分析中,心肌收缩、扩张型心肌病、钙信号通路等相关基因显著下调。这说明 FKTN 突变导致 α 亚基糖基化异常,同时引起细胞内微管骨架、钙稳态的异常,导致心肌收缩力下降及心室扩张。

蛋白互作网络显示蛋白质及其功能相互作用,有助于了解生物过程和许多疾病的发展。在分析上调基因的蛋白互作网络时,识别出了 5 个节点基因,即 Fn1、CXC、Kif18a、CD44、Saa3。Fn1 基因编码细胞外基质的纤连蛋白,CD44 基因编码细胞表面糖蛋白,该蛋白可与纤连蛋白互相作用,Fn1 及 CD44 过度上调可能会导致心肌组织的纤维化。有研究显示^[21],通过给自发性高血压的老鼠使用卡托普利等血管紧张素转换酶抑制剂,可以下调 Fn1 表达,减轻心脏纤维化,证明了卡托普利在 DCM 的治疗作用。Kif18a 基因与微管形成相关,在 FKTN 致 DCM 的机制研究中,存在有微管异常积聚,使用秋水仙碱抑制微管积聚,可以改善心肌收缩。CXC、Saa3 基因与炎症反应相关,糖皮质激素通过控制炎症,在肌营养不良合并 DCM 治疗方面起到改善的效果^[22]。分析下调基因蛋白互作网络时,有 2 个关键的节点基因: Asb15、Efcab2。Asb15 基因编码的蛋白能抑制过度泛素化,预防 DCM 的发生^[23];Efcab2 基因编码钙离子结合蛋白,与钙离子转运相关,而钙稳态失调是 DCM 的病因之一。基于这些生物信息学的发现,FKTN 相关 DCM 可能存在一些新的机制有待探索。

综上所述,本研究通过下载 GEO 数据库有关 FKTN 突变 DCM 的基因表达芯片,利用综合的生物信息学分析,找出 FKTN 突变 DCM 的心肌组织与正

常心肌组织的差异表达基因,并通过基因富集分析,揭示了 FKTN 突变 DCM 可能的机制有炎症反应激活、细胞外基质增生、钙稳态失调、微管异常相关,并使用蛋白互作网络分析,在上调基因找到 5 个关键的节点基因:Fn1、CXC、Kif18a、CD44、Saa3,在下调基因找到 2 个关键的节点基因:Asb15、Efcab2,这为 FKTN 突变 DCM 的机制、生物标志物及治疗提供了新的见解。然而,还需要进一步的实验探索来揭示 FKTN 突变 DCM 的机制。

参考文献:

- [1]Lipshultz SE, Law YM, Asante-Korang A, et al. Cardiomyopathy in Children: Classification and Diagnosis: A Scientific Statement From the American Heart Association [J]. *Circulation*, 2019, 140(1):e9-e68.
- [2]Jammal Addin MB, Young D, McCarrison S, et al. Dilated cardiomyopathy in a national paediatric population [J]. *Eur J Pediatr*, 2019, 178(8):1229-1235.
- [3]Kaski JP, Norrish G, Gimeno Blanes JR, et al. Cardiomyopathies in children and adolescents: aetiology, management, and outcomes in the European Society of Cardiology EURObservational Research Programme Cardiomyopathy and Myocarditis Registry [J]. *Eur Heart J*, 2024, 45(16):1443-1454.
- [4]Eldemire R, Mestroni L, Taylor MRG. Genetics of Dilated Cardiomyopathy [J]. *Annu Rev Med*, 2024, 75:417-426.
- [5]Smith ED, Lakdawala NK, Papoutsidakis N, et al. Desmoplakin Cardiomyopathy, a Fibrotic and Inflammatory Form of Cardiomyopathy Distinct From Typical Dilated or Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy [J]. *Circulation*, 2020, 141(23):1872-1884.
- [6]Hasselberg NE, Haland TF, Saberniak J, et al. Lamin A/C cardiomyopathy: young onset, high penetrance, and frequent need for heart transplantation [J]. *Eur Heart J*, 2018, 39(10):853-860.
- [7]Ben-Haim Y, Bird M, Johnson D, et al. RYR2 Variant and Sudden Death in Patients With Dilated Cardiomyopathy [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2024, 83(11):1105-1107.
- [8]Lee J, Termglinchan V, Diecke S, et al. Activation of PDGF pathway links LMNA mutation to dilated cardiomyopathy [J]. *Nature*, 2019, 572(7769):335-340.
- [9]Faggiano A, Gherbesi E, Gnan E, et al. Subclinical systolic dysfunction in genotype-positive phenotype-negative relatives of dilated cardiomyopathy patients: A systematic review and meta-analysis [J]. *Eur J Heart Fail*, 2024, 26(4):1097-1099.
- [10]Taniguchi-Ikeda M, Morioka I, Iijima K, et al. Mechanistic aspects of the formation of α -dystroglycan and therapeutic research for the treatment of α -dystroglycanopathy: A review [J]. *Mol Aspects Med*, 2016, 51:115-124.
- [11]Beedle AM, Turner AJ, Saito Y, et al. Mouse fukutin deletion impairs dystroglycan processing and recapitulates muscular dystrophy [J]. *J Clin Invest*, 2012, 122(9):3330-3342.
- [12]Gaertner A, Burr L, Klauke B, et al. Compound Heterozygous FKTN Variants in a Patient with Dilated Cardiomyopathy Led to an Aberrant α -Dystroglycan Pattern [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(12):6685.
- [13]Larrañaga-Moreira JM, Blanco-Arias P, San Millán-Tejado B, et al. Dilated cardiomyopathy and mild limb girdle muscular dystrophy caused by the p.Gly424Ser genetic variant in the fukutin gene [J]. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)*, 2021, 74(11):987-989.
- [14]Ritchie ME, Phipson B, Wu D, et al. limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies [J]. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43(7):e47.
- [15]Wu T, Hu E, Xu S, et al. clusterProfiler 4.0: A universal enrichment tool for interpreting omics data [J]. *Innovation (Camb)*, 2021, 2(3):100141.
- [16]The Gene Ontology Consortium. The Gene Ontology Resource: 20 years and still GOing strong [J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(D1):D330-D338.
- [17]Kanehisa M, Furumichi M, Tanabe M, et al. KEGG: new perspectives on genomes, pathways, diseases and drugs [J]. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45(D1):D353-D361.
- [18]Szkarczyk D, Gable AL, Lyon D, et al. STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets [J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(D1):D607-D613.
- [19]Ujihara Y, Kanagawa M, Mohri S, et al. Elimination of fukutin reveals cellular and molecular pathomechanisms in muscular dystrophy-associated heart failure [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1):5754.
- [20]Foltz SJ, Luan J, Call JA, et al. Four-week rapamycin treatment improves muscular dystrophy in a fukutin-deficient mouse model of dystroglycanopathy [J]. *Skelet Muscle*, 2016, 6:20.
- [21]Garvin AM, De Both MD, Talboom JS, et al. Transient ACE (Angiotensin-Converting Enzyme) Inhibition Suppresses Future Fibrogenic Capacity and Heterogeneity of Cardiac Fibroblast Subpopulations [J]. *Hypertension*, 2021, 77(3):904-918.
- [22]Matthews E, Brassington R, Kuntzer T, et al. Corticosteroids for the treatment of Duchenne muscular dystrophy [J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2016, 2016(5):CD003725.
- [23]Zhu Q, Combs ME, Bowles DE, et al. GRAF1 Acts as a Downstream Mediator of Parkin to Regulate Mitophagy in Cardiomyocytes [J]. *Cells*, 2024, 13(5):448.

收稿日期:2024-04-16; 修回日期:2024-05-23

编辑/王萌