

《通过 WGCNA 发掘在肺动脉高压疾病过程中的生物标志以及候选基因》实验设计

1 研究的目的意义

肺动脉高压是以肺血管持续收缩，肺血管重塑为主要病理特征的肺血管疾病。全世界约有 1% 的发病率。肺动脉高压病人由于肺循环障碍，机体长期处于渐进性的缺氧状态。不能被治愈，预后极差。目前全世界共有 14 种靶向肺血管的药物，但适用范围窄。肺动脉高压的发生发展机制尚未完全明了，通过生物信息学对临床数据的发掘，可以探索和筛选在肺动脉高压中起着核心作用的蛋白质分子，对疾病的诊断预后和药物开发，以及理解疾病发生发展过程都有重要意义。

2 研究内容

在 GEO 数据库中，我们针对 I 类肺动脉高压中特发性肺动脉高压病人的全肺组织和肺血管平滑肌进行转录组下游分析，具体通过 limma R package, GSEA R package, WGCNA R package 找到候选基因。利用低氧处理人肺血管平滑肌细胞和野百合碱诱导的肺动脉高压大鼠全肺组织做验证。

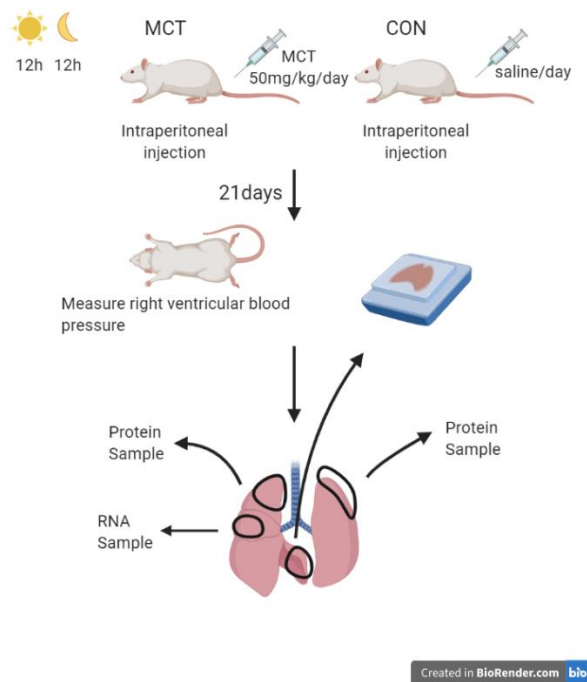
3 实验方案

3.1 动物模型的建立

选取实验室自繁殖的 SPF 大鼠 (Sprague-Dawley) 16 只，4 到 6 周龄。使用随机数法随机分配到实验组 (MCT) 和对照组 (对照组) 各八只。将野百合碱性结晶配成 2% 溶液。实验组大鼠每天接受 MCT (monocrotaline) 腹腔注射 (50mg/kg)，对照组大鼠进行等量的生理盐水腹腔注射。实验组和对照组大鼠分笼饲养，每笼每日给予总体重十分之一重量的灭菌鼠粮。腹腔注射 21 天。大鼠饲养在 12h 光照和 12h 黑暗恒温恒湿的环境中。

3.2 动物模型的评估

在第 22 天时，通过 RWD 小动物呼吸麻醉机，测量大鼠肺动脉的压力。肺动脉收缩压与舒张压高于 40mmHg 认为模型建立成功。剪破肾动脉放血处死大鼠，打开胸腔选取心脏背侧的心叶甲醛固定 24h。制作石蜡切片，进行 HE 染色。观察肺血管的重塑状态。对于建模成功的大鼠，选取大鼠左肺肺边，整个右前叶，存为用于蛋白质检测的样品。右中叶存为用于提取 RNA 的样品。整个动物模型建立的过程如图一所示。



图表 1

3.3 平滑肌低氧模型的建立

将正常培养的平滑肌细胞消化传代到新培养皿中，共传代四皿平滑肌细胞。12h 后观察是否贴壁，将其中两个已经贴壁的培养皿放置于低氧箱中。低氧处理 48 小时。其余两个放置常氧箱培养。

3.4 平滑肌低氧模型的评估

取其中一皿将细胞裂解，提取蛋白质。利用 Western Blot 检测平滑肌中 HIF-1 α 和 HIF-2 α 的表达含量，若与常氧培养平滑肌对比，HIF 的表达量明显升高，且有统计学意义，则认为模型建立成功。将建立成功的另一皿平滑肌细胞裂解，提取 RNA。

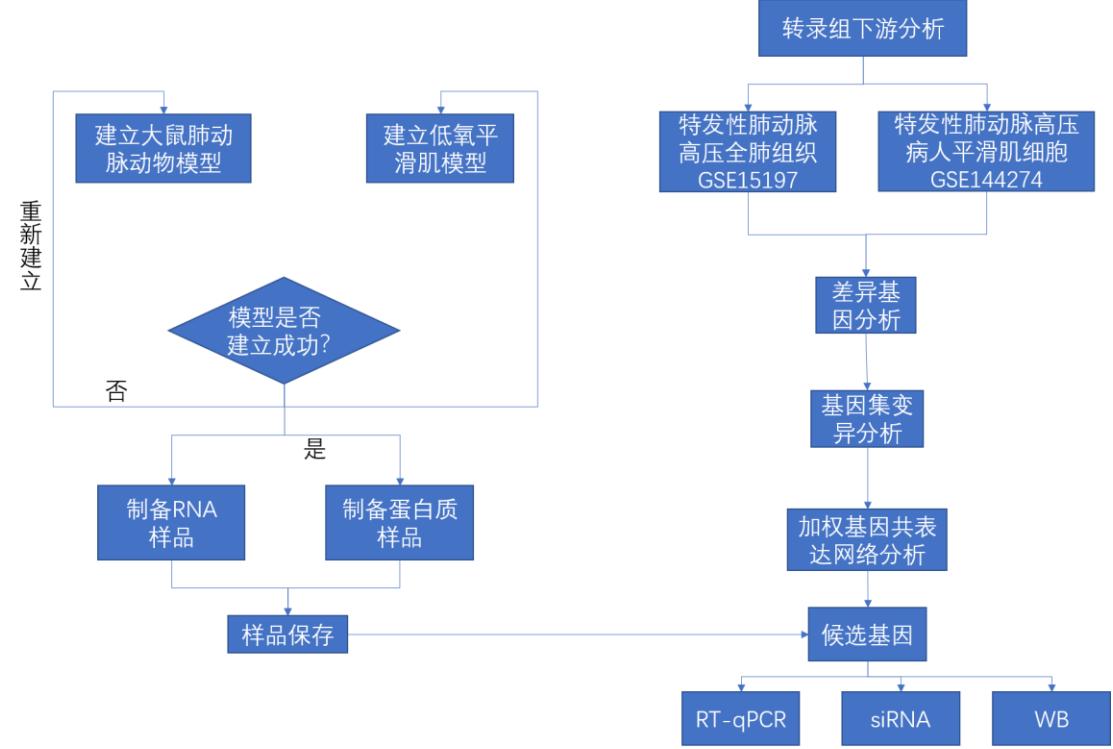
3.5 转录组下游分析

下载特发性肺动脉高压病人的全肺组织芯片数据 (GSE15197) 和特发性肺动脉高压病人的肺血管平滑肌芯片数据 (GSE144274)。利用 Rstudio 和 R (4.0.3) 处理芯片数据。简单来说，利用一般线性模型分别分析两个芯片的差异基因，以 $P < 0.05$ 和 $\log_2 \text{Expression}$ 作为筛选条件，再对差异基因求交集。第二部选取我们感兴趣的基因集 (糖酵解调控，炎症，TP53，缺氧) 进行基因集富集分析，得到富集分数。第三部对两个芯片分别进行加权基因共表达网络分析，并与 GSVA 得到的富集分数相关联。选取每个模块中高度相关的核心基因，并与第一步分析得到的差异基因取交集，生成我们的候选基因库。

3.6 候选基因的验证

前期进行 RT-qPCR 的验证。简而言之，首选从 GeneBank 中找到候选基因的 CDS 区，利用 primer5 设计引物。对细胞和肺组织的 RNA 进行反转录，得到 cDNA 后，做普通 PCR 将产物凝胶电泳在紫外线成像仪总判断目的条带大小是否和设计一致。同时一部分扩增产物送公司测序。验证引物之后，对细胞和肺组织的 cDNA 做 RT-qPCR 定量分析 mRNA 的含量。将此实验至少重复三次。若 RNA 验证差异显著，我们对差异显著的基因合成 siRNA 转染进细胞中。在正常培养条件下测定细胞表型。同时，购买差异基因的抗体，利用 WB 测定蛋白质的含量是否差异显著。

4 技术路线



图表 2

5 研究记录

转录组下游分析记录表					
实验名字		时间		日期	
代码：R scrip					
可视化结果					

问题与分析

6 预期成果

- 6.1 成功建立大鼠肺动脉高压模型和低氧诱导平滑肌模型
- 6.2 通过分析可以得到候选基因库以及利用 R 包做可视化处理
- 6.3 获得 RNA 样品验证的结果
- 6.4 撰写一篇高水平的生物信息学论文