

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2022.05.004

View this article at: <https://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2022.05.004>

应用基因共表达网络分析在系统性红斑狼疮中鉴定中性粒细胞浸润相关生物标志物

李慧娟, 马向波, 袁立平, 徐雪阳, 刘德林, 项丹丹, 刘小红, 王俊霞

(邯郸市第一医院风湿免疫科, 河北 邯郸 056000)

[摘要] 目的: 系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus, SLE)是一种临床表现多样、累及多个器官的自身免疫性疾病。本研究试图识别中性粒细胞相关的SLE生物标志物, 为SLE的治疗和管理提供潜在的理论依据。方法: 使用加权基因共表达网络分析来自基因表达汇编(Gene Expression Omnibus, GEO)数据库的SLE表达数据, 并识别与中性粒细胞相关的模块。结果: 鉴定出*FPR1*、*SLC2A3*、*TLR2*、*TLR4*、*CXCR1*、*MMP25*、*MGAM*和*KLHL2*共8个关键基因。8个关键基因与中性粒细胞高度相关, 并且在SLE中的表达显著上调。结论: 通过各种分析和验证, 8个关键基因是SLE中与中性粒细胞浸润相关的潜在生物标志物, 这为SLE免疫治疗提供了潜在的靶点。

[关键词] 系统性红斑狼疮; 基因共表达网络分析; 中性粒细胞浸润; 生物标志物

Identification of biomarkers related to neutrophils infiltration with gene co-expression network in systemic lupus erythematosus

LI Huijuan, MA Xiangbo, YUAN Liping, XU Xueyang, LIU Delin, XIANG Dandan, LIU Xiaohong, WANG Junxia

(Department of Rheumatology and Immunology, Handan First Hospital, Handan Hebei 056000, China)

Abstract **Objective:** Systemic lupus erythematosus (SLE) is an autoimmune disease with a large variety of clinical manifestations and involving many organs. The purpose of this study was to attempt to identify neutrophil-related SLE biomarkers to provide a potential rationale for the treatment and management of SLE. **Methods:** Weighted gene co-expression network analysis was used to analyze SLE expression data from the Gene Expression Omnibus (GEO) database, and identify modules related to Neutrophils. **Results:** Eight key genes (*FPR1*, *SLC2A3*, *TLR2*, *TLR4*, *CXCR1*, *MMP25*, *MGAM* and *KLHL2*) were identified. Furthermore, 8 key genes were highly correlated with neutrophils and were significantly upregulated in SLE. **Conclusion:** Through various analyses and confirmations, 8 key genes are potential biomarkers associated with Neutrophils infiltration in SLE. It also provides a potential target for SLE immunotherapy.

Keywords systemic lupus erythematosus; gene co-expression network analysis; neutrophils infiltration; biomarkers

收稿日期 (Date of reception): 2021-12-14

通信作者 (Corresponding author): 李慧娟, Email: lihuijuanhd@163.com

系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus, SLE)是一种免疫系统攻击全身健康组织的疾病^[1-2]。SLE以多种不同的自身抗体增加、免疫复合物沉积、免疫系统浸润及受损器官炎症为特征^[3]。尽管SLE的治疗取得了较大进展,但其仍然与过早死亡相关^[4-5]。SLE的发展是由于对无处不在的核自身抗原失去自我耐受。在系统水平上,免疫系统的适应性和固有分支有助于SLE的发展^[6-7]。SLE的临床表现广泛,发病机制复杂。到目前为止,SLE表型变异的原因尚不清楚。随着基因检测方法的广泛应用,研究者^[8-9]对SLE进行了高通量测序和大量的微阵列数据分析研究,识别出多种差异表达基因(differentially expressed genes, DEGs)和信号通路。了解SLE表型发病机制背后的分子机制将有助于开发更有效的治疗和预防策略。

研究^[10-12]发现免疫细胞在SLE进展中起重要作用。SLE的发生和发病机制与树突细胞稳态和功能的异常调节有关^[10]。调节性T细胞也参与SLE的发病机制^[11]。此外,SLE中性粒细胞的表型不同于健康个体的中性粒细胞,SLE中的中性粒细胞被激活并易于聚集^[12]。然而,SLE的具体免疫机制尚不清楚。因此,探索与免疫细胞相关的基因有助于SLE的免疫治疗和识别特异性免疫机制。随着生物信息学技术的发展,人们可以使用多种工具来识别生物标志物。例如机器学习^[13]和加权基因共表达网络分析(weighted gene co-expression network analysis, WGCNA)^[14]已被广泛应用于生物标志物的识别。为了探索免疫细胞的作用,识别SLE潜在的生物标志物,本研究利用SLE基因表达数据进行WGCNA分析。WGCNA用于描述微阵列样本中基因之间的相关性模式,有助于探索各种疾病的潜在生物标志物和治疗靶点^[14-15]。随后,使用CIBERSORT算法计算样本中免疫细胞的组成,确定与中性粒细胞水平相关的重要模块和基因,并通过数据库分析验证了这些基因的免疫和临床特征。这是WGCNA首次被用来鉴定中性粒细胞相关的红斑狼疮生物标志物。

1 资料与方法

1.1 微阵列数据的选择和预处理

为鉴定SLE候选基因,从基因表达汇编(Gene Expression Omnibus, GEO)数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)下载GSE39088、GSE50772、GSE61635和GSE121239数据集。纳入

标准:1)SLE患者与正常对照组的全基因组基因表达谱阵列或高通量下一代测序数据;2)全血或外周血单核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC);3)样品数量不少于20个;4)处理后的数据或原始数据可以重新分析;5)物种来源为智人。最终得到4组数据集。其中,将GSE39088、GSE50772、GSE61635设置为训练集,将GSE121239设置为验证集。原始数据从GEO数据库下载并标准化。然后,通过Bioconductor(<http://www.bioconductor.org>)中的affy包(版本1.58.0)进行数据标准化和背景校正。最后将探针数据转化为基因表达值。所有分析均在R软件(3.6.3版)中进行。

1.2 免疫浸润细胞的评估

CIBERSORT是一种基于归一化基因表达谱的反褶积算法,已经通过荧光激活细胞分选(fluorescence-activated cell sorting, FACS)进行了验证,它可以用来表征复杂样本的22种免疫细胞浸润评分。采用CIBERSORT方法,利用LM22签名和500种排列对22种免疫浸润细胞组成的复杂样本进行量化。将处理后的基因表达矩阵上传到CIBERSORT(<https://cibersort.stanford.edu/>)网页工具,然后,选择每个样品中的免疫细胞百分比作为WGCNA的性状数据^[16]。

1.3 共表达网络建设

使用WGCNA R软件包(版本1.67)对180例SLE样本的基因表达矩阵变异系数前25%的基因进行WGCNA分析^[14]。首先,基于配对基因之间的Pearson相关值,将单个转录本的表达水平转换为相似度矩阵。接下来,将相似矩阵转换为邻接矩阵。当 β 值为9时,邻接矩阵然后转换为拓扑重叠矩阵。为了将具有相似表达模式的基因分类到不同的模块中,采用动态混合切割方法,最小模块尺寸截止值为30^[17-18]。

1.4 构造模块特征关系

使用模块特征基因对每个模块进行成分分析。通过Pearson检验计算出模块特征基因与免疫浸润细胞之间的相关性来确定模块的显著性。将共表达模块的cut-off值设为 $P < 0.05$ 。然后进一步计算和可视化模块特征基因的不同之处,为模块树状图选择了一条切割线并合并了一些模块。本研究选择感兴趣的免疫细胞和相关性最高的模块,并将其定义为中枢模块。

1.5 富集分析

为了进一步探索中枢模块中基因的生物学术功能, 使用在线工具David 6.8(<https://david.ncifcrf.gov/>)进行基因本体论(Gene Ontology, GO)分析和京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)途径富集分析。

1.6 关键基因的鉴定

根据中枢模块中每个基因的模块连通性和临床性状关系选择候选关键基因。模块连通性定义为基因间Pearson相关的绝对值(module membership, MM)。临床性状关系定义为各基因与性状之间的Pearson相关性的绝对值(gene significance, GS)。选择中枢模块中 $MM > 0.8$, $GS > 0.6$ 的基因作为候选关键基因。同时选择中枢模块中的所有基因并利用string数据库(<https://string-db.org/>), 置信度设置为0.7, 构建蛋白互作(protein-protein interaction, PPI)网络。并使用Cytoscape(3.7.2版)对网络进行可视化。Degree >10 的基因被认为是中心节点。使用在线工具对候选关键基因和PPI网络中的中心节点进行了Venn分析(<http://www.bioinformatics.com.cn/>), 交集基因被认为是关键基因。

1.7 免疫细胞及关键基因的验证

我们使用GSE121239数据集来验证免疫细胞的浸润情况及关键基因与免疫细胞之间的相关性。首先, 使用CIBERSORT评估了GSE121239数据集中每个SLE样本和对照样本中中性粒细胞

的含量, wilcox.test比较两组中性粒细胞含量的百分比。然后在SLE样本中计算了关键基因与中性粒免疫细胞之间的Spearman相关性, 并使用R包“ggplot2”(版本3.1.1)对结果进行可视化。随后, 使用wilcox.test比较了关键基因在疾病组和正常对照组中的表达。且找到GSE17755数据集对关键基因的表达做进一步的验证。此外, 为了为SLE的诊断治疗和研究提供新视角, 本研究基于DGIdb数据库(<https://dgidb.org/>), 对筛选出的关键基因进行相关药物分析。

2 结果

2.1 免疫浸润细胞的评价

为更好地了解SLE免疫浸润微环境, 本研究使用CIBERSORT计算SLE患者样本及对照样本中免疫细胞浸润的情况。与对照样本相比, SLE样本中中性粒细胞比例明显增加, 初始CD4 T细胞、未活化的CD4记忆性T细胞、未活化的自然杀伤细胞的比例明显下降(图1)。表明SLE的发生发展与免疫细胞密切相关。

2.2 SLE基因共表达网络

将5 047个基因的表达值用于构建共表达网络。180个样本的树状图和特征热图(图2A)。选择 $\beta=9$ 作为软阈值来构建无标度网络(图2B)。采用动态混合切割方法构建层次聚类树(图2C)。采用动态树木切割的方法, 对相异度 $<25\%$ 的模块进行合并, 最终确定14个模块(图2D)。

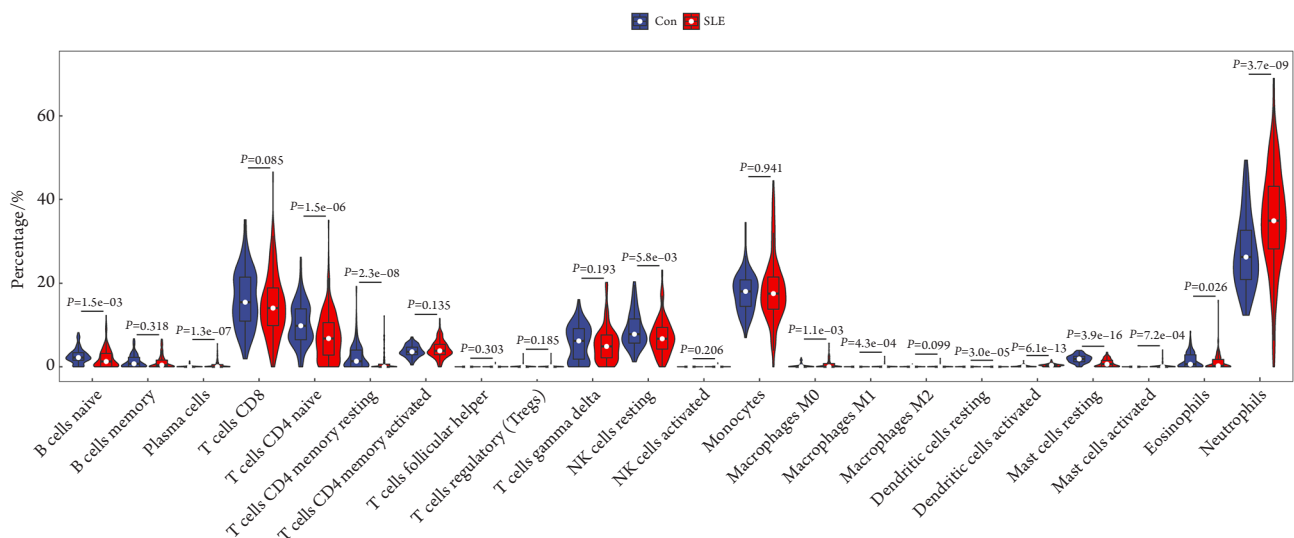


图1 TCGA中对照组与SLE组22种免疫细胞组分比较的小提琴图

Figure 1 Violin plot for comparing the fractions of 22 types of immune cells between control and SLE groups in TCGA

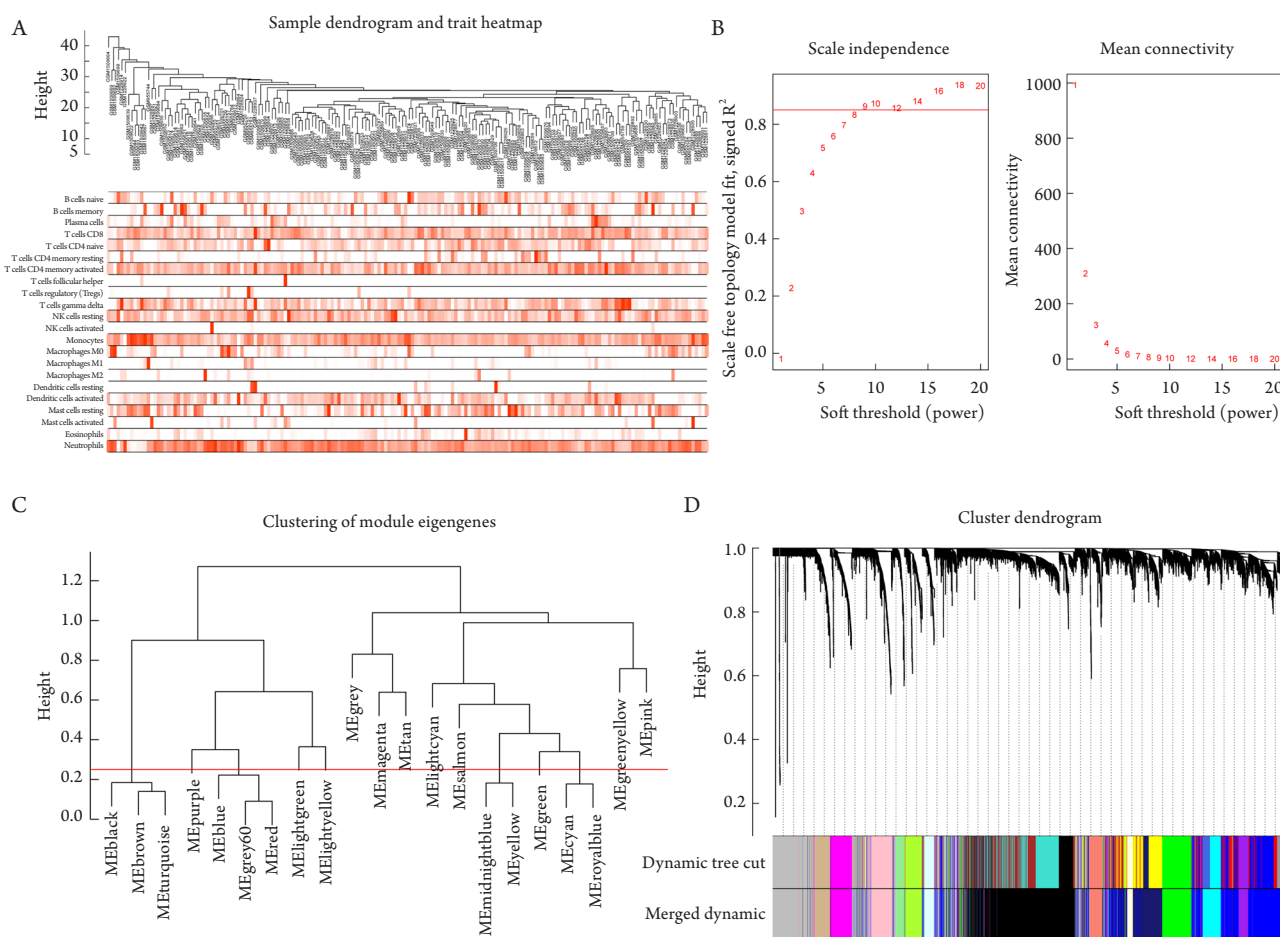


图2 WGCNA的构建

Figure 2 Construction of WGCNA

(A) 样本聚类：样本树状图和性状指标，热图中颜色越深表示22种免疫细胞的浸润程度越高；(B) 分析1~20软阈值功率的无标度匹配指数和1~20软阈值功率的平均连通性；(C) 水平线定义模块合并阈值；(D) 基因通过分层聚类分为不同的模块，不同的颜色代表不同的模块。

(A) Sample clustering: sample dendrogram and trait indicator, the darker the color, the higher the degree of infiltration of the 22 kinds of immune cells in the heat map; (B) Analyze the scale-free fit index of the 1–20 soft threshold power and the mean connectivity of 1–20 soft threshold power; (C) Horizontal lines define module merge thresholds; (D) Genes are grouped into various modules by hierarchical clustering, and different colors represent different modules.

2.3 中枢模块的识别和富集分析

14个模块中，浅蓝色模块($R^2=0.72$, $P=1e-30$)与初始B细胞高度相关，黄绿色模块($R^2=0.71$, $P=4e-29$)与浆细胞高度相关，浅橙色模块($R^2=0.68$, $P=4e-26$)与CD8 T细胞相关，浅黄色模块($R^2=0.67$, $P=6e-25$)与M0巨噬细胞相关，蓝色模块($R^2=0.9$, $P=1e-66$)与中性粒细胞相关(图3A)。重点关注显示与中性粒细胞相关的蓝色模块，并将其认为是中枢模块。接下来，使用在线工具David 6.8(<https://david.ncifcrf.gov/>)分析了蓝色模块中包含的853个基因，进行GO和KEGG富集分析(图3B)。GO富集分析结果显示：中枢模块内的基

因大部分分布在细胞膜表面，参与免疫反应、炎症反应。而KEGG富集分析结果显示，中枢模块内的基因显著富集在SLE、细胞因子-受体相互作用、MAPK、趋化因子等信号通路。

2.4 关键基因的鉴定

根据 $MM>0.8$ 和 $GS>0.6$ ，我们在蓝色模块中选择111个基因作为候选关键基因。在PPI网络中，以度为10的节点为中心节点。蓝色模块的PPI网络中有60个中心节点(图4A)。候选关键基因与中心节点的交叉基因被认为是真正关键基因(图4B、4C)。

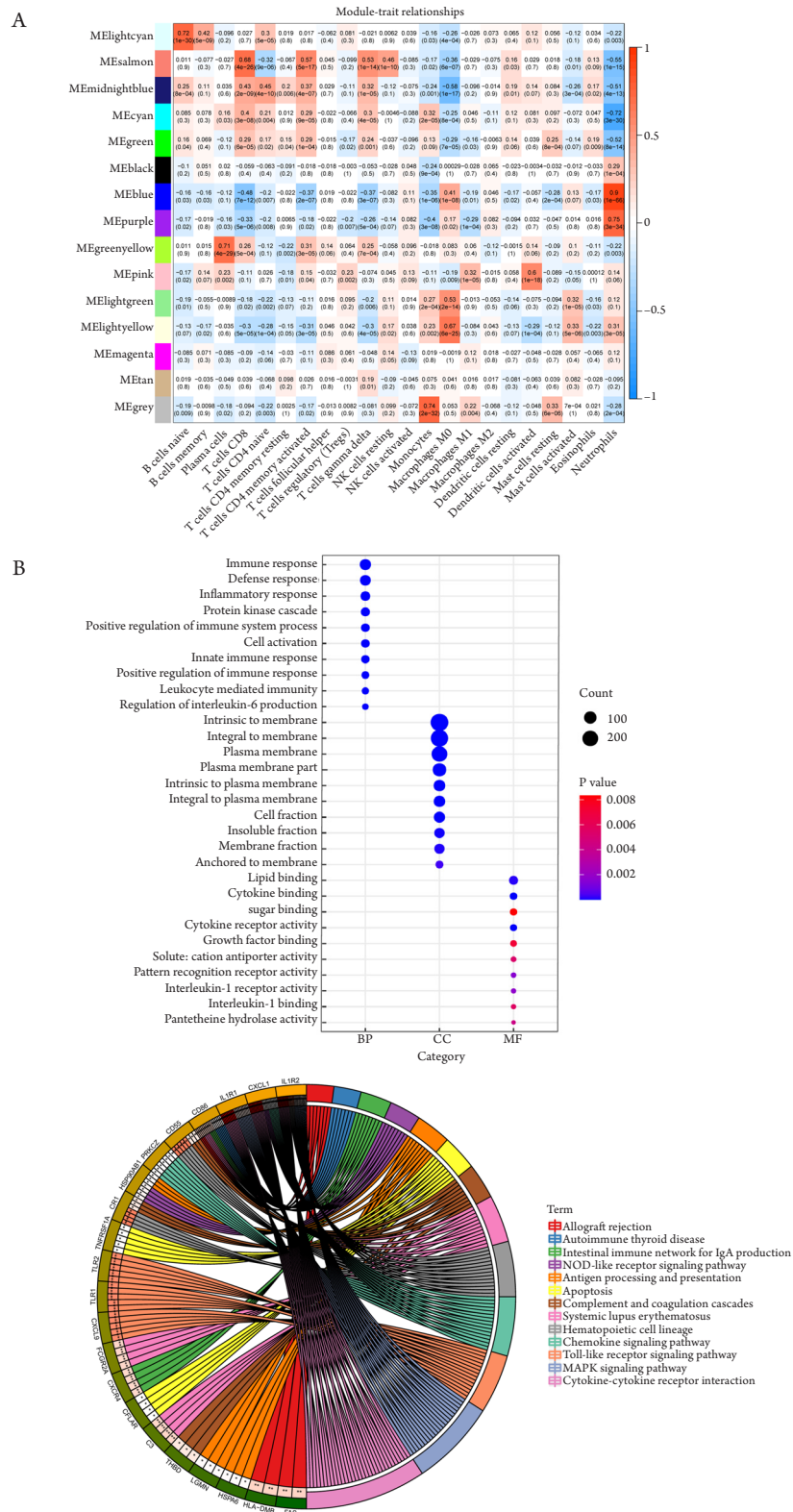


图3 关键模块和功能说明

Figure 3 Key modules and feature notes

(A) Heatmap显示模块特征基因与免疫细胞浸润的相关性; (B) 前30个富集的氧化石墨烯在左边以气泡图的形式显示, KEGG 富集分析在右边以圈图形式显示。

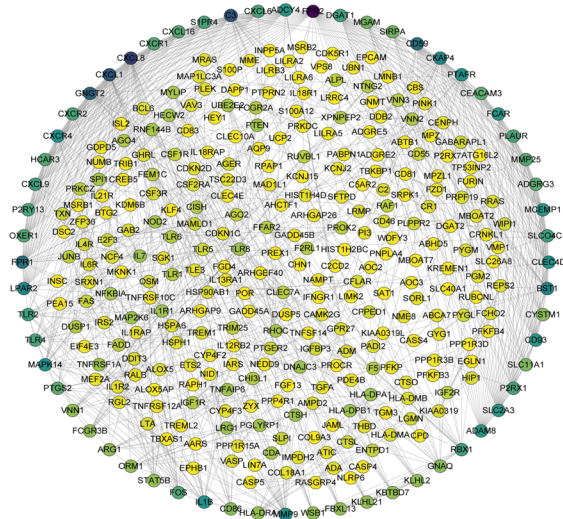
(A) Heatmap shows correlations of module eigengenes with immune cell infiltration; (B) The first 30 enriched GO terms are shown as a bubble diagram on the left, KEGG enrichment analysis was shown as a circled graph on the right.

2.5 关键基因和免疫细胞的验证

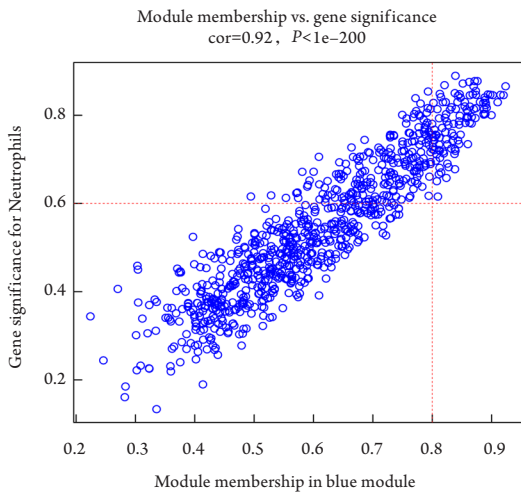
利用GSE121239数据集验证免疫细胞百分比。结果显示：中性粒细胞百分比在对照组和SLE组之间有显著差异。在SLE患者中，中性粒细胞百分比明显增加，这与我们之前的分析结果一致(图5A)。结果显示：8个基因的表达值与中性粒细胞呈正相关(所有基因的相关系数均在0.6以上，图5B)。图5C示MGAM表达和中性粒细胞水平的散点图。关键基因在GSE121239数

据集中表达(*FPR1*、*SLC2A3*、*TLR2*、*TLR4*、*CXCR1*、*MMP25*、*MGAM*和*KLHL2*)的箱线图如图6A所示。为进一步验证8个关键基因的表达，在GSE17755数据集中验证(图6B)。结果显示疾病组和对照组*FPR1*、*CXCR1*、*TLR2*和*MGAM*的表达显著不同，并且与GSE121239数据集中的表达一致。随后，在DGIdb数据库中筛选出和关键基因相关的药物(图7)。除了*KLHL2*外，其他7个关键基因均发现相关药物。

A



B



C

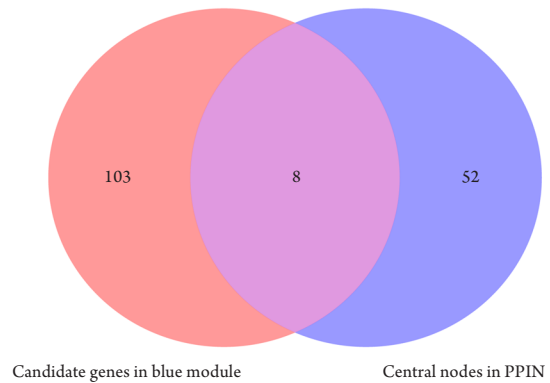


图4 关键基因的识别

Figure 4 Identification of key genes

(A)蓝色模块基因的PPI网络；(B)蓝色模块的基因显著性(GS)与模块连通性(MM)相关性散点图。顶部标注相关系数和P值；(C)基于PPIN和WGCNA的重叠部分选择关键基因。

(A) PPI network of genes in the blue module; (B) Scatter plot for correlation between the gene significance (GS) and module membership (MM) in the blue module. Correlation coefficients and P value is labeled at the top; (C) Key genes were selected based on the overlap between PPIN and WGCNA.

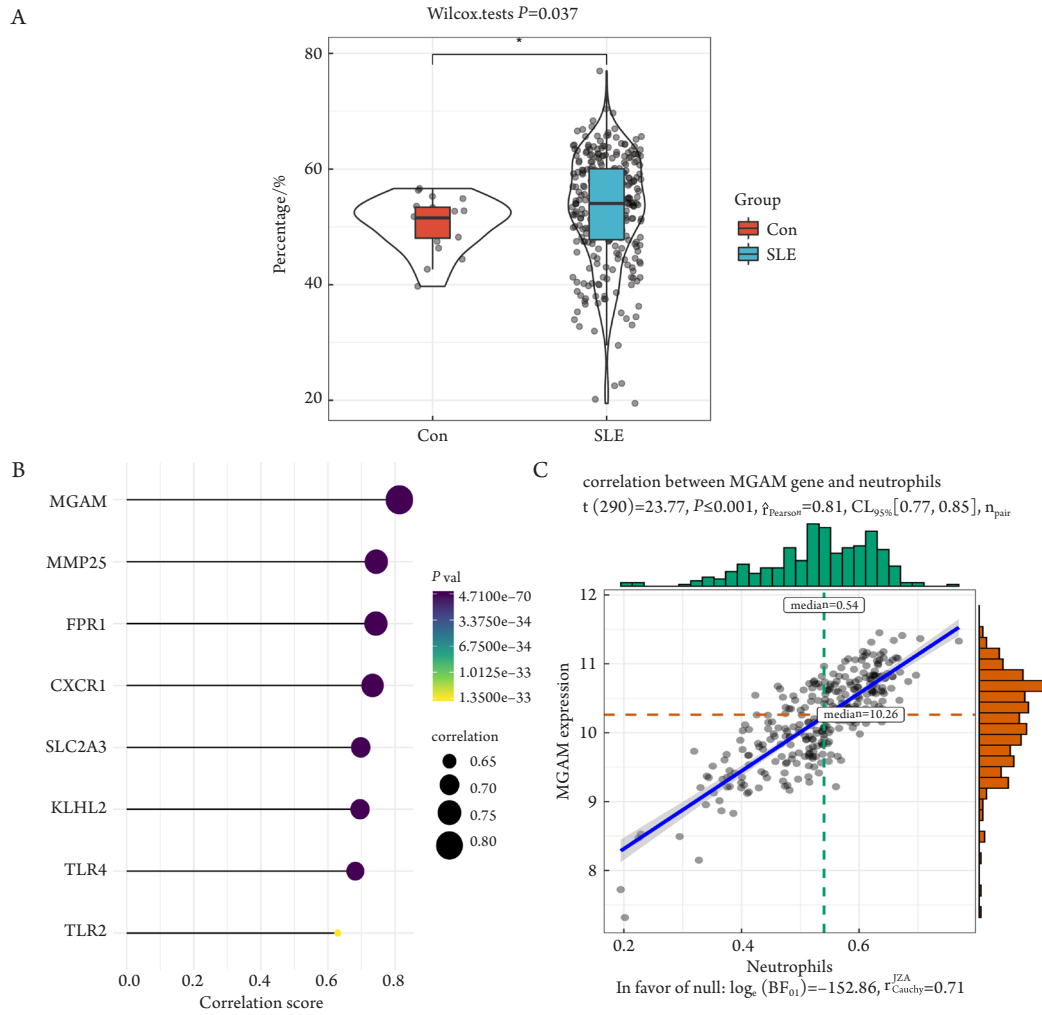


图5 关键基因的验证

Figure 5 Validation of key genes

(A) GSE121239数据集中中性粒细胞百分比(* $P<0.05$); (B)数据集GSE121239中关键基因与中性粒细胞的相关性; (C)MGAM基因与中性粒细胞的相关性。

(A) Percentage of Neutrophils in dataset GSE121239 (* $P<0.05$); (B) Correlation between key genes and Neutrophils in data set GSE121239; (C) Correlation between MGAM gene and Neutrophils.

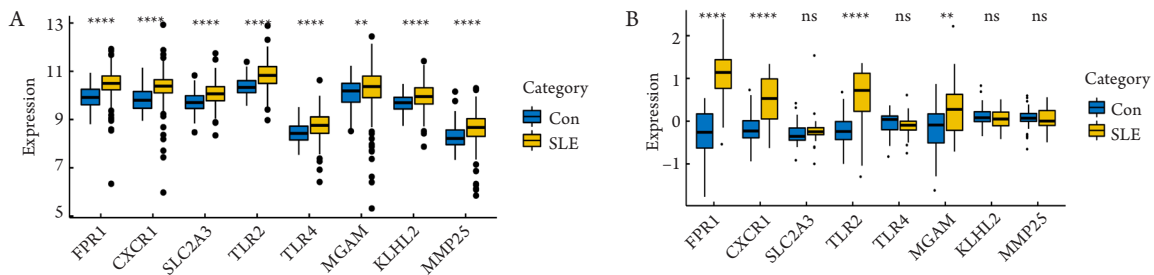


图6 8个关键基因(FPR1、SLC2A3、TLR2、TLR4、CXCR1、MMP25、MGAM和KLHL2)的电子验证

Figure 6 Electronic validation of 8 key genes (FPR1, SLC2A3, TLR2, TLR4, CXCR1, MMP25, MGAM and KLHL2)

(A)关键基因在GSE121239数据集中表达的箱式图; (B)关键基因在GSE17755数据集中表达的箱式图。** $P<0.01$, **** $P<0.0001$, ns为差异无统计学意义。

(A) Box plot of key genes expressed in GSE121239 dataset; (B) Box plot of key genes expressed in GSE17755 dataset. ** $P<0.01$, **** $P<0.0001$, ns represents no statistical significance.

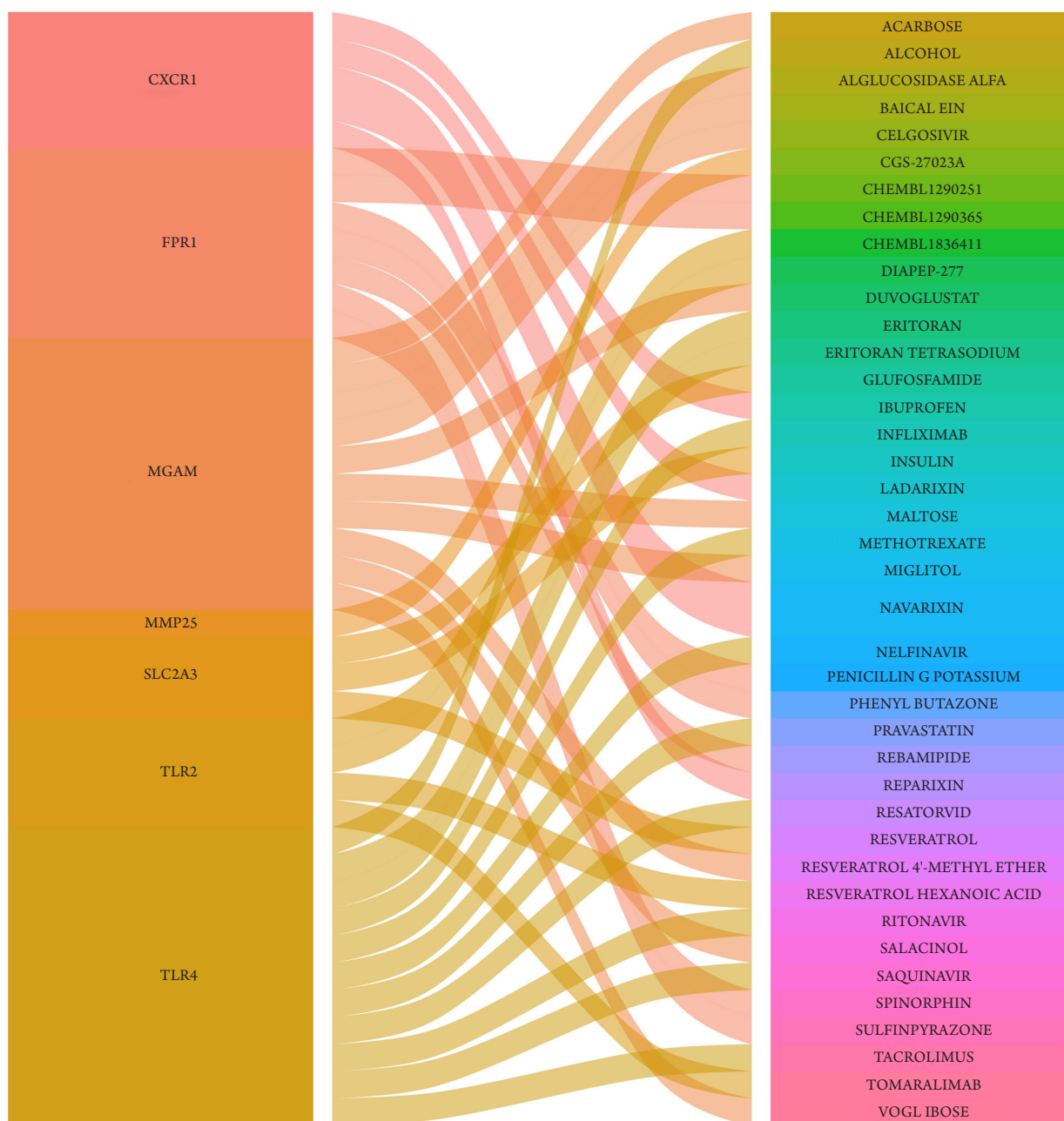


图7 在DGIdb数据库中筛选出和关键基因相关的药物

Figure 7 Screening of drugs related to key genes in the DGIdb database

3 讨论

中性粒细胞是白细胞中数量最多的一类细胞,在免疫系统调控中发挥重要作用。长期以来,中性粒细胞一直被认为是一种非特异性细胞。它们处于对抗感染的第一线,在这一过程中往往会造成组织损伤。现在越来越多的人认识到中性粒细胞在自身免疫中参与复杂的调节过程^[12]。来自微阵列和基因表达谱的数据使我们能够更深入地了解生

物系统复杂机制的内部分子途径。因此,通过检测SLE患者和健康对照的外周血转录组来确定差异调控基因及其靶通路。我们目前的研究是从GEO数据库(GSE39088、GSE50772和GSE61635)中提取了180名SLE患者和96名健康对照者的DEGs。使用WGCNA鉴定与SLE中性粒细胞相关的生物标志物。最终确定了FPR1、SLC2A3、TLR2、TLR4、CXCR1、MMP25、MGAM和KLHL2为关键基因。

CXCR1是G蛋白偶联受体家族成员,也是IL-8

受体。CXCR1与IL-8高亲和力结合,通过G蛋白激活的二级信使系统转导信号^[19-20]。研究^[21-22]表明:刺激CXCR1中性粒细胞表面可导致中性粒细胞趋化和激活,抑制CXCR1可减少中性粒细胞向肿瘤区域的迁移。此外,肿瘤学研究表明:阻断CXCR1可抑制乳腺癌干细胞的分化,CXCR1在恶性黑色素瘤的发展过程中过表达,参与细胞生长和血管生成^[23]。Yin等^[24]报道SLE患者V δ 2 T细胞中CXCR1的表达明显高于健康对照组。CXCR1在感染反应中起着重要的中性粒细胞转运和活化作用,与肺损伤加重有关^[25]。中性粒细胞表面CXCR1和/或CXCR2表达下调可减少中性粒细胞迁移^[25]。TLR2基因编码的蛋白质是Toll样受体家族的成员,在病原体入侵时影响中性粒细胞的趋化、吞噬和细胞因子释放^[26]。TLR2能够增加中性粒细胞的功能寿命。而且,TLR2的缺失导致中性粒细胞对感染部位的趋化性降低^[27]。TLR2通过NF- κ B和MAPK信号通路调节过敏性气道炎症^[28]。SLE患者外周血单个核细胞中TLR2 mRNA水平显著升高^[29]。TLR4基因编码的蛋白质是Toll样受体家族的成员,其表达水平上调是SLE的致病因素^[30]。TLR4信号通路失活,抑制狼疮肾炎(SLE最严重的表现)诱导的肾组织增生和系膜细胞增殖^[31]。TLR4通过加速炎症中性粒细胞的消除,在非感染性肺部炎症中发挥了新的稳态作用^[32]。TLR4的定位和激活促进中性粒细胞胞外陷阱炎症的发生^[33]。本研究中CXCR1、TLR2和TLR4与中性粒细胞高度相关。因此,这进一步说明了CXCR1、TLR2和TLR4在SLE中是通过介导中性粒细胞发挥调控作用。

MMP25是基质金属蛋白酶家族成员,在白细胞和一些癌组织中高表达^[34]。MMP25能够调节中性粒细胞的趋化性,并可能通过波形蛋白裂解时产生的“eat-me”信号增加中性粒细胞的吞噬作用以解决炎症反应^[35]。MMP25在头颈部肿瘤中的表达水平与预后及免疫浸润水平相关,尤其是CD4记忆T细胞活化水平^[36]。此外,MMP25的表达与多种肿瘤相关通路的调控显著相关,如p53信号通路,PI3K/AKT/mTOR信号通路和JAK/STAT信号通路^[36]。FPR1编码吞噬细胞的G蛋白偶联受体,在炎症条件下,FPR1介导吞噬白细胞趋化和响应细菌甲酰化趋化肽的激活。FPR1也参与信号传递,调节中性粒细胞对炎症部位的浸润^[37]。SLC2A3又被称为GLUT3,在自身免疫性疾病中具有重要的调控作用。SLC2A3缺失变异可能通过限制葡萄糖摄取来抑制类风湿关节炎中病理细胞

的增殖^[38]。SLC2A3在癌症中高表达促进癌症的进展^[39-40]。目前暂时没有发现关于MMP25、FPR1和GLUT3在SLE中作用的报道。本文可能是首次报道MMP25、FPR1和GLUT3在SLE中具有重要的调控作用。MMP25、FPR1和GLUT3与中性粒细胞高度相关,猜测MMP25、FPR1和GLUT3可能通过靶向中性粒细胞在SLE中起重要的分子调控作用。同时,本研究也为进一步了解SLE的分子机制奠定了基础。

MGAM编码麦芽糖淀粉酶,在肠道中表达以催化淀粉消化。MGAM在正常乳腺组织中不表达或低表达,而在基底样型乳腺癌中表达上调^[41]。此外,MGAM在特发性间质性肺炎^[42]和冠心病^[43]中表达异常。KLHL2是Kelch相关超家族的成员,能够介导血管紧张素II调节的血管紧张^[44]。KLHL2在卵巢癌^[45]中异常表达调控疾病的进展。目前暂未发现MGAM和KLHL2参与SLE的报道。本研究中MGAM和KLHL2作为关键基因与中性粒细胞高度相关。猜测MGAM和KLHL2可能通过调控中性粒细胞的增殖在SLE中起重要的调控作用。

综上所述,本研究首次尝试使用WGCNA和CIBERSORT算法来识别SLE潜在的中性粒细胞相关生物标志物。8个关键基因在SLE中过表达并促进SLE进展。对于FPR1、SLC2A3、TLR2、TLR4、CXCR1、MMP25、MGAM和KLHL2的识别为SLE免疫治疗提供了潜在的生物标志物和靶点。但是,本研究有一定的局限性。本研究采用公共数据库数据,需要收集临床样本来进行验证;这些基因在SLE中的具体分子机制尚不清楚,需要进一步研究。

参考文献

1. Kiriakidou M, Ching CL. Systemic lupus erythematosus[J]. *Ann Intern Med*, 2020, 172(11): ITC81-ITC96.
2. Wu H, Zeng J, Yin J, et al. Organ-specific biomarkers in lupus[J]. *Autoimmun Rev*, 2017, 16(4): 391-397.
3. Udhaya Kumar S, Thirumal Kumar D, Siva R, et al. Dysregulation of signaling pathways due to differentially expressed genes from the B-cell transcriptomes of systemic lupus erythematosus patients—a bioinformatics approach[J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2020, 8: 276.
4. Borchers AT, Keen CL, Shoenfeld Y, et al. Surviving the butterfly and the wolf: mortality trends in systemic lupus erythematosus[J]. *Autoimmun Rev*, 2004, 3(6): 423-453.
5. Liu Z, Zhang H, Liu Z, et al. Multitarget therapy for induction

- treatment of lupus nephritis: a randomized trial[J]. *Ann Intern Med*, 2015, 162(1): 18-26.
6. Lech M, Anders HJ. The pathogenesis of lupus nephritis[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2013, 24(9): 1357-1366.
 7. Mohan C, Putterman C. Genetics and pathogenesis of systemic lupus erythematosus and lupus nephritis[J]. *Nat Rev Nephrol*, 2015, 11(6): 329-341.
 8. Borrebaeck CA, Sturfelt G, Wingren C. Recombinant antibody microarray for profiling the serum proteome of SLE[J]. *Methods Mol Biol*, 2014, 1134: 67-78.
 9. Zhu H, Luo H, Yan M, et al. Autoantigen microarray for high-throughput autoantibody profiling in systemic lupus erythematosus[J]. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, 2015, 13(4): 210-218.
 10. Kaewraemruan C, Ritprajak P, Hirankarn N. Dendritic cells as key players in systemic lupus erythematosus[J]. *Asian Pac J Allergy Immunol*, 2020, 38(4): 225-232.
 11. Parietti V, Chiffot H, Muller S, et al. Regulatory T cells and systemic lupus erythematosus[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2007, 1108: 64-75.
 12. Wirestam L, Arve S, Linge P, et al. Neutrophils-important communicators in systemic lupus erythematosus and antiphospholipid syndrome[J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 2734.
 13. van IJzendoorn DGP, Szuhai K, Briaire-de Bruijn IH, et al. Machine learning analysis of gene expression data reveals novel diagnostic and prognostic biomarkers and identifies therapeutic targets for soft tissue sarcomas[J]. *PLoS Comput Biol*, 2019, 15(2): e1006826.
 14. Langfelder P, Horvath S. WGCNA: an R package for weighted correlation network analysis[J]. *BMC Bioinformatics*, 2008, 9: 559.
 15. Li N, Zhan X. Identification of clinical trait-related lncRNA and mRNA biomarkers with weighted gene co-expression network analysis as useful tool for personalized medicine in ovarian cancer[J]. *EPMA J*, 2019, 10(3): 273-290.
 16. Tang G, Yin W. Development of an immune infiltration-related prognostic scoring system based on the genomic landscape analysis of glioblastoma multiforme[J]. *Front Oncol*, 2020, 10: 154.
 17. Lin J, Yu M, Xu X, et al. Identification of biomarkers related to CD8+ T cell infiltration with gene co-expression network in clear cell renal cell carcinoma[J]. *Aging (Albany NY)*, 2020, 12(4): 3694-3712.
 18. Gu Y, Li J, Guo D, et al. Identification of 13 key genes correlated with progression and prognosis in hepatocellular carcinoma by weighted gene co-expression network analysis[J]. *Front Genet*, 2020, 11: 153.
 19. Park SH, Das BB, Casagrande F, et al. Structure of the chemokine receptor CXCR1 in phospholipid bilayers[J]. *Nature*, 2012, 491(7426): 779-783.
 20. Risnik D, Podaza E, Almejún MB, et al. Revisiting the role of interleukin-8 in chronic lymphocytic leukemia[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 15714.
 21. Ocana A, Nieto-Jiménez C, Pandiella A, et al. Neutrophils in cancer: prognostic role and therapeutic strategies[J]. *Mol Cancer*, 2017, 16(1): 137.
 22. Tavares LP, Garcia CC, Machado MG, et al. CXCR1/2 antagonism is protective during influenza and post-influenza pneumococcal infection[J]. *Front Immunol*, 2017, 8: 1799.
 23. Jia D, Li L, Andrew S, et al. An autocrine inflammatory forward-feedback loop after chemotherapy withdrawal facilitates the repopulation of drug-resistant breast cancer cells[J]. *Cell Death Dis*, 2017, 8(7): e2932.
 24. Yin S, Mao Y, Li X, et al. Hyperactivation and in situ recruitment of inflammatory V δ 2 T cells contributes to disease pathogenesis in systemic lupus erythematosus[J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 14432.
 25. Sawant KV, Xu R, Cox R, et al. Chemokine CXCL1-mediated neutrophil trafficking in the lung: role of CXCR2 activation[J]. *J Innate Immun*, 2015, 7(6): 647-658.
 26. Chen Y, Lu S, Zhang Y, et al. TLR2 agonist Pam3CSK4 enhances the antibacterial functions of GM-CSF induced neutrophils to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*[J]. *Microb Pathog*, 2019, 130: 204-212.
 27. Tessarolli V, Gasparoto TH, Lima HR, et al. Absence of TLR2 influences survival of neutrophils after infection with *Candida albicans*[J]. *Med Mycol*, 2010, 48(1): 129-140.
 28. Ma SQ, Wei HL, Zhang X. TLR2 regulates allergic airway inflammation through NF- κ B and MAPK signaling pathways in asthmatic mice[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 22(10): 3138-3146.
 29. Komatsuda A, Wakui H, Iwamoto K, et al. Up-regulated expression of Toll-like receptors mRNAs in peripheral blood mononuclear cells from patients with systemic lupus erythematosus[J]. *Clin Exp Immunol*, 2008, 152(3): 482-487.
 30. Liu B, Yang Y, Dai J, et al. TLR4 up-regulation at protein or gene level is pathogenic for lupus-like autoimmune disease[J]. *J Immunol*, 2006, 177(10): 6880-6888.
 31. Qi H, Cao Q, Liu Q. MicroRNA-16 directly binds to DEC2 and inactivates the TLR4 signaling pathway to inhibit lupus nephritis-induced kidney tissue hyperplasia and mesangial cell proliferation[J]. *Int Immunopharmacol*, 2020, 88: 106859.
 32. Leu SW, Shi L, Xu C, et al. TLR4 through IFN- β promotes low molecular mass hyaluronan-induced neutrophil apoptosis[J]. *J Immunol*, 2011, 186(1): 556-562.
 33. Tsourouktsoglou TD, Warnatsch A, Ioannou M, et al. Histones, DNA, and citrullination promote neutrophil extracellular trap inflammation by regulating the localization and activation of TLR4[J]. *Cell Rep*, 2020, 31(5): 107602.
 34. Zhao H, Sohail A, Sun Q, et al. Identification and role of the homodimerization interface of the glycosylphosphatidylinositol-anchored membrane type 6 matrix metalloproteinase (MMP25)[J]. *J*

- Biol Chem, 2008, 283(50): 35023-35032.
35. Starr AE, Bellac CL, Dufour A, et al. Biochemical characterization and N-terminomics analysis of leukolysin, the membrane-type 6 matrix metalloprotease (MMP25): chemokine and vimentin cleavages enhance cell migration and macrophage phagocytic activities[J]. J Biol Chem, 2012, 287(16): 13382-13395.
 36. Liang Y, Guan C, Li K, et al. MMP25 Regulates Immune Infiltration Level and Survival Outcome in Head and Neck Cancer Patients[J]. Front Oncol, 2020, 10: 1088.
 37. Liu M, Zhao J, Chen K, et al. G protein-coupled receptor FPR1 as a pharmacologic target in inflammation and human glioblastoma[J]. Int Immunopharmacol, 2012, 14(3): 283-288.
 38. Ziegler GC, Almos P, McNeill RV, et al. Cellular effects and clinical implications of SLC2A3 copy number variation[J]. J Cell Physiol, 2020, 235(12): 9021-9036.
 39. Xu H, Wang X, Wu J, et al. Long Non-coding RNA LINC01094 promotes the development of clear cell renal cell carcinoma by upregulating SLC2A3 via microRNA-184[J]. Front Genet, 2020, 11: 562967.
 40. Gao H, Liang J, Duan J, et al. A prognosis marker SLC2A3 correlates with EMT and immune signature in colorectal cancer[J]. Front Oncol, 2021, 11: 638099.
 41. Xu S, Feng Y, Zhao S. Proteins with evolutionarily hypervariable domains are associated with immune response and better survival of basal-like breast cancer patients[J]. Comput Struct Biotechnol J, 2019, 17: 430-440.
 42. Chen H, Fang X, Zhu H, et al. Gene expression profile analysis for different idiopathic interstitial pneumonias subtypes[J]. Exp Lung Res, 2014, 40(8): 367-379.
 43. Shi Y, Yang S, Luo M, et al. Systematic analysis of coronary artery disease datasets revealed the potential biomarker and treatment target[J]. Oncotarget, 2017, 8(33): 54583-54591.
 44. Zeniya M, Morimoto N, Takahashi D, et al. Kelch-like protein 2 mediates angiotensin II-with no lysine 3 signaling in the regulation of vascular tonus[J]. J Am Soc Nephrol, 2015, 26(9): 2129-2138.
 45. Gong G, Lin T, Yuan Y. Integrated analysis of gene expression and DNA methylation profiles in ovarian cancer[J]. J Ovarian Res, 2020, 13(1): 30.

本文引用: 李慧娟, 马向波, 袁立平, 徐雪阳, 刘德林, 项丹丹, 刘小红, 王俊霞. 应用基因共表达网络分析在系统性红斑狼疮中鉴定中性粒细胞浸润相关生物标志物[J]. 临床与病理杂志, 2022, 42(5): 1036-1046. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2022.05.004

Cite this article as: LI Huijuan, MA Xiangbo, YUAN Liping, XU Xueyang, LIU Delin, XIANG Dandan, LIU Xiaohong, WANG Junxia. Identification of biomarkers related to neutrophils infiltration with gene co-expression network in systemic lupus erythematosus[J]. Journal of Clinical and Pathological Research, 2022, 42(5): 1036-1046. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2022.05.004