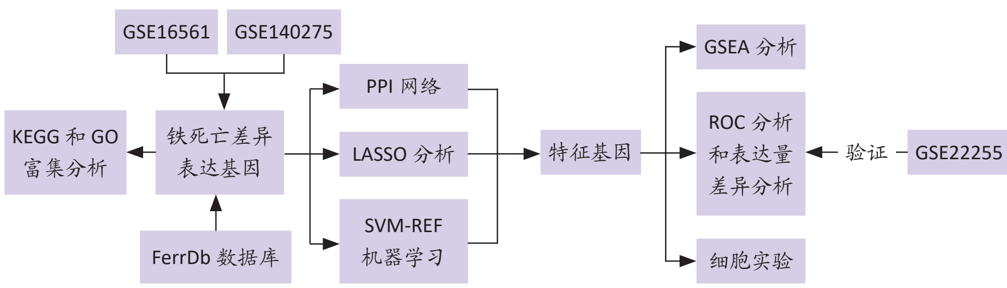
缺血性脑卒中铁死亡特征基因 NFE2L2 的鉴定与验证

王 咪[1, 2]，马书杰[3]，刘 杨[1]，齐 瑞[1]

https://doi.org/10.12307/2025.027
投稿日期：2023-11-25
采用日期：2024-01-25
修回日期：2024-02-07
在线日期：2024-03-02
中图分类号：
R452；R363；R364
文章编号：
2095-4344(2025)07-01466-09
文献标识码：A

文章快速阅读：基于生物信息学与细胞学实验对缺血性脑卒中铁死亡特征基因 NFE2L2 的鉴定与验证



文题释义：
缺血性脑卒中：缺血性脑卒中是最常见的脑卒中类型，主要是由于脑动脉血栓形成、动脉狭窄或者其他导致血管阻塞的原因，导致脑组织缺氧，使得脑细胞无法获得足够的氧气和营养物质，脑细胞的功能受损或死亡，从而出现的一系列症状。
铁死亡：主要是因为细胞内铁离子的异常积聚和细胞的氧化应激与脂质过氧化，最终引发细胞死亡，在心脑血管疾病的发病过程中发挥了重要作用。

摘要
背景：铁死亡与缺血性脑卒中的发病密切相关，靶向铁死亡是一种治疗缺血性脑卒中有前景的方案，但具体调控靶点尚不明确。
目的：通过生物信息学和机器学习方法筛选缺血性脑卒中铁死亡相关特征基因，并通过细胞实验进行验证，探讨铁死亡在缺血性脑卒中的作用。
方法：基于GEO数据库和FerrDb数据库选取符合条件的缺血性脑卒中相关数据集和铁死亡表达数据集，通过*t*检验筛选铁死亡相关差异基因。对铁死亡相关差异基因进行GO功能富集分析与KEGG信号通路富集分析。通过PPI网络分析和机器学习筛选缺血性脑卒中铁死亡的特征基因，利用ROC分析和GSEA分析探究特征基因的准确性和生物功能。然后进行细胞实验，将HT22细胞分为对照组与缺血性脑卒中组，对照组不作任何干预，缺血性脑卒中组加入0.1 mol/L的H_2O_2干预24 h诱导细胞氧化应激和铁死亡，通过实时荧光定量RT-PCR和Western Blot验证铁死亡的发生和特征基因表达。
结果与结论：①共获取45个铁死亡相关差异基因，GO和KEGG富集分析发现差异基因与氧化应激、自噬、铁死亡、脂肪细胞因子信号通路和线粒体代谢密切相关。②通过PPI网络中的MCODE插件和cytoHubba插件与机器学习中的LASSO算法和SVM-RFE算法共鉴定出1个铁死亡特征基因核因子E2相关因子2(nuclear factor erythroid 2-related factor 2，NFE2L2)。③对NFE2L2进行ROC曲线分析，发现在训练集和验证集中构建的诊断预测模型具有良好的准确性与特异性；对NFE2L2进行GSEA分析，发现特征基因通过免疫、炎症反应、氨基酸代谢及神经因子调控等方面参与缺血性脑卒中发病机制的调控。④细胞实验的RT-PCR和Western Blot分析表明，与对照组对比，缺血性脑卒中组中的酰基辅酶A合成酶长链家族成员4 mRNA和蛋白表达水平显著增高($P < 0.05$)，谷胱甘肽过氧化物酶4 mRNA和蛋白表达水平显著降低($P < 0.05$)；与对照组对比，缺血性脑卒中组中特征基因NFE2L2 mRNA和蛋白表达水平显著增高($P < 0.05$)。⑤上述结果证实，缺血性脑卒中与铁死亡密切相关，靶向特征基因NFE2L2可以为研究和治疗缺血性脑卒中提供一定的思路与方向。
关键词：缺血性脑卒中；铁死亡；生物信息学；HT22细胞；机器学习；特征基因；细胞实验；NFE2L2；ASCL4；GPX4

Identification and validation of characterized gene NFE2L2 for ferroptosis in ischemic stroke

Wang Mi[1, 2], Ma Shujie[3], Liu Yang[1], Qi Rui[1]
[1]Department of Rehabilitation, Yueyang Hospital of Integrated Chinese and Western Medicine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200437, China; [2]Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China; [3]Second Rehabilitation Hospital of Shanghai, Shanghai 200431, China
Wang Mi, Master candidate, Department of Rehabilitation, Yueyang Hospital of Integrated Chinese and Western Medicine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200437, China; Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China
Ma Shujie, MD, Second Rehabilitation Hospital of Shanghai, Shanghai 200431, China
Wang Mi and Ma Shujie contributed equally to this article.
Corresponding author: Qi Rui, MD, Chief physician, Department of Rehabilitation, Yueyang Hospital of Integrated Chinese and Western Medicine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200437, China

[1]上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院康复医学科，上海市 200437；[2]上海中医药大学，上海市 201203；[3]上海市第二康复医院，上海市 200431
第一作者：王咪，女，1992 年生，河南省洛阳市人，汉族，上海中医药大学在读研究生，主要从事神经系统疾病的中西医康复研究。
共同第一作者：马书杰，女，上海市人，博士，主要从事中枢与周围神经损伤的中西医结合康复治疗及脑功能重塑机制研究。
通讯作者：齐瑞，博士，主任医师，上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院，上海市 200437
https://orcid.org/0009-0008-0877-8841(王咪)
基金资助：国家自然科学基金项目 (81603713)，项目负责人：马书杰；宝山区医学重点专科项目 (BSZK-2023-BZ12，BSZK-2023-BP08)，项目负责人：马书杰；宝山区科技创新项目 (20-E-43)，项目负责人：马书杰
引用本文：王咪，马书杰，刘杨，齐瑞 . 缺血性脑卒中铁死亡特征基因 NFE2L2 的鉴定与验证 [J]. 中国组织工程研究，2025，29(7):1466-1474.

Abstract

BACKGROUND: Ferroptosis is closely associated with the pathogenesis of ischemic stroke, and targeting ferroptosis is a promising regimen for the treatment of ischemic stroke, but the specific regulatory targets are unclear.

OBJECTIVE: To screen ferroptosis-related characterized genes in ischemic stroke by bioinformatics and machine learning methods and validate them by cellular experiments to investigate the role of ferroptosis in ischemic stroke.

METHODS: Eligible ischemic stroke-related datasets and ferroptosis expression datasets were selected based on GEO database and FerrDb database, and ferroptosis-related differential genes were screened by *t*-test. GO functional enrichment analysis with KEGG signaling pathway enrichment analysis was performed for ferroptosis-related differential genes. Characterized genes for ferroptosis in ischemic stroke were screened by PPI network analysis and machine learning. The reliability and biological functions of the characterized genes were explored using ROC analysis and GSEA analysis, followed by cell experiment. HT22 cells were divided into control and ischemic stroke groups. No intervention was made in the control group, and 0.1 mM H_2O_2 was added to the ischemic stroke group for 24 hours to simulate cellular oxidative stress injury and ferroptosis. The ferroptosis and the expression of characterized genes were verified by real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (RT-PCR) and western blot assay.

RESULTS AND CONCLUSION: (1) Forty-five ferroptosis-associated differential genes were obtained, and GO and KEGG enrichment analyses revealed that the differential genes were closely associated with oxidative stress, autophagy, ferroptosis, adipocytokine signaling pathway, and mitochondrial metabolism. (2) A total of one ferroptosis characterized gene, nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (NFE2L2), was identified by the MCODE plugin and cytoHubba plugin in the PPI network with the LASSO algorithm and SVM-RFE algorithm in machine learning. (3) Receiver operating characteristic curve analysis of NFE2L2 revealed that the diagnostic prediction models constructed in the training and validation sets had good accuracy and specificity. GSEA analysis of NFE2L2 revealed that the characterized gene was involved in the regulation of ischemic stroke pathogenesis through immunity, inflammatory response, amino acid metabolism, and neurofactor regulation. (4) RT-PCR and western blot analyses showed that the acyl coenzyme A synthetase long chain family, member 4 (ACSL4) mRNA and protein expression levels were significantly higher in the ischemic stroke group compared with the control group (P < 0.05), and the glutathione peroxidase 4 (GPX4) mRNA and protein expression levels were significantly lower in the ischemic stroke group (P < 0.05). Compared with the control group, the mRNA and protein expression levels of the characterized gene NFE2L2 were significantly higher in the ischemic stroke group (P < 0.05). (5) It suggests that ischemic stroke is closely related to ferroptosis, and targeting the characterized gene NFE2L2 may provide certain ideas and directions for the study and treatment of ischemic stroke.

Key words: ischemic stroke; ferroptosis; bioinformatics; HT22 cell; machine learning; characteristic gene; cell experiment; NFE2L2; ASCL4; GPX4

Funding: *National Natural Science Foundation of China, No. 81603713 (to MSJ); Baoshan District Medical Key Specialized Project, No. BSZK-2023-BZ12, BSZK-2023-BP08 (to MSJ); Baoshan District Science and Technology Innovation Project, No. 20-E-43 (to MSJ)*

How to cite this article: *WANG M, MA SJ, LIU Y, QI R. Identification and validation of characterized gene NFE2L2 for ferroptosis in ischemic stroke. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2025;29(7):1466-1474.*

0 引言 Introduction

缺血性脑卒中是由于血管内血栓形成及累聚，严重阻塞或闭塞血管导致脑组织局部缺血、缺氧及坏死引起的一系列神经功能障碍的疾病[1-2]。随着人口老龄化的逐步加重，缺血性脑卒中是心脑血管疾病死亡的第二大原因，其高致残率与死亡率严重威胁着患者的生活质量与生命健康[3-4]，已成为全球人群主要疾病负担之一。然而，缺血性脑卒中引起的神经功能损伤的病理机制尚未完全明确，因此，明确缺血性脑卒中后的神经元死亡机制、探索新的神经保护策略、逆转脑缺血造成的核心神经元死亡是非常有必要的[5]。所以，有效地阐明该病的病理机制、寻求新的治疗方法是一项重要任务。

铁死亡作为一种新型细胞程序性死亡的方式，通过干预铁死亡的发生，可以调节众多神经疾病的病理过程，如脑卒中、阿尔茨海默病及帕金森病等[6-7]。脑组织缺血会引起脑内铁稳态失衡，诱发铁死亡[8-9]。过量铁离子的累积可以引起氧化应激反应，导致细胞内氧化损伤的累积，从而对缺血性脑卒中的发生产生不利影响[10]。因此，缺血性脑卒中可以加重铁死亡现象，同时铁死亡的发生可以诱导缺血性脑卒中的发生。目前，铁死亡在缺血性脑卒中具体作用靶点尚未明确。因此，靶向铁死亡可能是治疗缺血性脑卒中的一种潜在治疗方法。

生物信息学分析和机器学习是两种广泛应用于生命科学领域的分析方法，两种分析方法的联合使用，可以更好地处理大规模的生物学数据，揭示疾病的分子机制和相关的生物学过程[11-12]。通过对数据的分析和建模，不仅可以预测已知的疾病靶点，还可以发现新的潜在靶点，挖掘生物学数据中的隐藏模式和潜在关联，为疾病治疗提供了思路[13]。实验通过生物信息学联合机器学习探索缺血性脑卒中相关的铁死亡生物标志物，并通过体外细胞实验进行验证，为探究缺血性脑卒中的发病机制和从铁死亡角度治疗缺血性脑卒中提供了理论可能与靶点支持。

1 资料和方法 Data and methods

1.1 设计 生物信息学分析联合体外细胞实验结果验证，Student's *t* 检验。

1.2 时间及地点 实验于 2023 年 6–9 月在上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院中心实验室完成。

1.3 资料

1.3.1 数据来源 利用 GEO 数据库 (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gds/)，以“缺血性脑卒中”“人类”为筛选条件，纳入符合条件的 GSE16561 数据集、GSE140275 数据集和 GSE22255 数据集，下载每个数据集中的原始探针数据与注释信息，其中 GSE16561 数据集与 GSE140275 数据集作为差异基因表达分析的训练数据集，GSE22255 数据集为分析结果验证数据集。GSE16561 数据集包含疾病组 39 个缺血性脑卒中患者外周全血样本，正常组 24 个健康人外周全血样本；GSE140275 数据集包含疾病组 3 个缺血性脑卒中患者外周全血样本，正常组 3 个健康人外周全血样本；GSE22255 数据集包含疾病组 20 个缺血性脑卒中患者外周血单核细胞样本，正常组 20 个健康人外周血单核细胞样本，详见**表 1**。通过 R 语言“sva”包对 GSE16561 数据集与 GSE140275 数据集进行去除批次效应处理，将其归一化，随后利用“limma”包中 normalizeBetweenArrays 函数对数据集进行校正，获得校正后的数据集。

1.3.2 细胞 该研究选用小鼠海马神经元细胞系 HT22 细胞 (FH1027)，购自上海富衡生物科技有限公司。

1.4 方法

1.4.1 筛选缺血性脑卒中铁死亡相关差异基因和功能富集分析 在铁死亡相关数据库 FerrDb 数据库 (http://www.zhounan.org/ferrdb/) 中下载铁死

表 1 | GEO 数据集中脑卒中相关数据集

数据集	探针平台	疾病组(缺血性脑卒中)	正常组(健康人)	样本类型	提交年份	数据集类型
GSE16561	GPL6883	39	24	外周全血	2010	训练集
GSE140275	GPL16791	3	3	外周全血	2019	训练集
GSE22255	GPL96	20	20	外周血单核细胞	2011	验证集

亡标志物、抑制剂与激动剂数据集，每个数据集筛选标准为 confidence: Validated，对 3 个数据集进行并集处理，获取铁死亡相关基因。将获取的铁死亡相关基因映射到校正后的数据集中，提取铁死亡相关基因的表达量。通过 *t* 检验对提取的铁死亡相关基因进行正常组与疾病组之间的统计学差异分析，获取铁死亡相关差异基因。通过 R 包“pheatmap”对铁死亡相关差异基因绘制热图，展示差异分析结果。

基于 R 包“clusterProfiler”对差异基因进行基因本体 (gene ontology，GO) 富集分析和京都基因与基因组百科全书 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes，KEGG) 信号通路分析，随后基于层次聚类 Ward.d 算法对差异基因富集的信号通路进行聚类分析，进一步探究差异基因的生物功能。

1.4.2 构建差异基因蛋白与蛋白互作网络 将差异基因映射入 STRING 数据库 (https://cn.string-db.org/)，设置条件为 medium confidence: 0.4，剔除网络中未连接的节点，构建蛋白与蛋白互作 (protein-protein interaction，PPI) 网络。随后下载差异基因的 interactions 信息，使用 Cytoscape 软件 (v3.9.1) 对 PPI 网络进行优化。利用 MCODE 插件对 PPI 网络进行聚类分析，参数设置为：节点度数阈值≥ 2，haircut ≥ 0.2，节点 score 阈值≥ 0.2，K-core ≥ 2，最大深度 =100，筛选网络中的重要聚类模块；通过 cytoHubba 插件中最大集团中心性 (MCC) 算法对 PPI 网络中的节点进行分析，提取核心靶点基因网络。

1.4.3 筛选特征基因 运用最小绝对收缩选择算子 (LASSO) 回归分析，通过 R 包“glmnet”对铁死亡差异基因进行反复交叉验证，筛选差异基因中的标记基因；利用支持向量机递归特征消除 (SVM-RFE) 机器学习进行分析，验证差异基因的准确性与误差，确定标记基因。随后，将 LASSO 回归分析与 SVM-RFE 机器学习分别获取的标记基因与 MCODE 插件和 MCC 算法获得的核心靶点基因取交集，最终得到特征基因核因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2，NFE2L2)。

1.4.4 特征基因的表达水平和对缺血性脑卒中诊断的预测作用 通过箱线图展示特征基因在正常组与疾病组之间的表达水平并对其进行统计学分析。通过受试者工作特征 (receiver operating characteristic，ROC) 曲线分析，检验特征基因曲线下面积 (area under the curve，AUC) 值、特异性与准确性。随后基于特征基因构建逻辑回归模型，运用 ROC 曲线评估构建的逻辑回归模型的准确性与诊断价值。在验证集中对特征基因的表达量和 ROC 曲线进行验证。

1.4.5 基因集富集分析 以 KEGG 信号通路集为检测特征基因富集水平的背景集合，运用 R 包“GSEA”对特征基因进行基因集富集分析，根据目标基因表达量的中位数，将其分为高表达组与低表达组，将其纳入基因集中进行分析，探索特征基因的相关信号通路，*P* < 0.05 被认为是显著富集。

1.4.6 构建细胞模型 实验选用小鼠海马神经元细胞系 HT22 细胞 (FH1027)，用体积分数 10% 的完全培养基 (DMEM 培养基 +10% 胎牛血清 +1% 青链霉素)，在 37 ℃、体积分数 5%CO_2、95%AIR 的培养箱中进行培养。待细胞在 T25 培养瓶中融合度到 80% 以上后进行传代。选取状态良好的细胞，接种到 6 孔板中，3×10^5 个 / 孔，放置到培养箱中培养 24 h。设置对照组和缺血性脑卒中组，每组设置 3 个复孔。对照组不做任何干预，缺血性脑卒中组每孔加入 0.1 mmol/L 的 H_2O_2(10011208，上海国药集团化学试剂有限公司) 干预 24 h，诱导神经元细胞氧化应激和铁死亡，通过检测铁死亡相关指标酰基辅酶 A 合成酶长链家族成员 4 [long-chain acyl-coenzyme A (CoA) synthase 4，ACSL4] 与谷胱甘肽过氧化物酶 4 (glutathione peroxidase 4，GPX4) 表达进行模型验证 [14]。

1.4.7 RT-PCR 检测 将干预后的细胞采用 TRLzol 法 (QP020，GeneCopoeia 公司) 提取总 RNA，测定 RNA 浓度。使用反转录试剂盒 (K1622，Thermo 公司) 配置反转录反应体系，进行反转录，反应条件：25 ℃ 10 min，42 ℃ 60 min，75 ℃ 2 min。随后使用 2X Universal SYBR Green Fast qPCR Mix 试剂 (RM21203，abclonal 公司) 进行 RT-PCR 扩增，引物序列由华大基因合成，见**表 2**，设 GAPDH 为内参。反应顺序包括 95 ℃预变性 10 min，95 ℃变性 10 s，60 ℃退火 20 s，72 ℃延伸 15 s，进行 40 个循环，反应结束后记录 CT 值，利用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法进行数据分析 [15]。

表 2 | 引物序列信息

基因名称	序列 (5'-3')	片段长度 (bp)
甘油醛 -3- 磷酸脱氢酶 (GAPDH)	上游：AGA CAG CCG CAT CTT CTT GT 下游：CTT GCC GTG GGT AGA GTC AT	207
长链酰基辅酶合成酶 4(ACSL4)	上游：GAC TGG CAG GAA GGT GGT TA 下游：CCC ATG GAG ATA TTC TGG CCT	86
谷胱甘肽过氧化物酶 4(GPX4)	上游：CCG GCT ACA ATG TCA GGT TT 下游：ACG CAG CCG TTC TTA TCA AT	166
核因子 E2 相关因子 2 (NFE2L2)	上游：CTG TCA GCT ACT CCC AGG TTG 下游：GGC AAG CGA CTGA AAT GTA GG	137

1.4.8 蛋白免疫印迹检测 将干预后的细胞加入 RIPA 裂解液，提取总蛋白。使用 BCA 法检测样品蛋白浓度，通过 SDS-PAGE 聚丙烯酰胺凝胶进行电泳分离蛋白，随后将其转到 PVDF 膜上进行电转，将电转结束的 PVDF 膜标记后，转移至封闭液中室温振摇封闭 2 h。加入一抗，分别为小鼠抗 GAPDH 单克隆抗体 (1 ∶ 6 000，abcam 公司)、兔抗 ACSL4 多克隆抗体 (1 ∶ 1 000，ABclonal 公司)、兔抗 GPX4 单克隆抗体 (1 ∶ 5 000，abcam 公司)、兔抗 NFE2L2 多克隆抗体 (1 ∶ 2 000，proteintech 公司)，4 ℃环境下孵育过夜。加入二抗：HRP 标记羊抗兔 IgG(1 ∶ 10 000，Searcare 公司)，室温振荡反应 1 h。经过 ECL 混合溶液的显影后在凝胶成像系统上曝光拍

照，设 GAPDH 为内参，通过 Image J 软件分析目标带的灰度值，以目标蛋白灰度值 / 内参蛋白灰度值作为目标蛋白的相对表达量。

1.5　**主要观察指标**　生物信息学与机器学习鉴定缺血性脑卒中铁死亡核心特征基因；细胞模型中特征基因的表达；铁死亡表型验证结果。

1.6　**统计学分析**　利用 RStudio 软件 (4.3.1) 和 GraphPad Prism 9 软件进行统计学分析，计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示，数据均符合正态分布，采用 Student's *t* 检验分析两组之间的差异。$P < 0.05$ 表示两组之间差异有显著性意义。实验的统计学方法已通过上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院统计学专家审核。

2 结果 Results

2.1 生物信息学分析结果

2.1.1　确定铁死亡相关差异基因　将 GSE16561 数据集与 GSE140275 数据集进行批次效应处理与校正后，获取了校正后的数据集，见图 **1**。在 FerrDb 数据库下载铁死亡相关数据集，其中标志物数据集包含 11 个基因，激动剂数据集包含 280 个基因，抑制剂数据集包含 297 个基因，取交集后共获取 378 个已验证的人类铁死亡相关基因。将获取的 378 铁死亡基因映射到校正后的数据集中，获得 101 个铁死亡相关基因。随后通过 *t* 检验对数据集中正常组与组之间的铁死亡相关基因进行差异分析，确定 45 个铁死亡相关差异基因，其中 33 个为上调基因，12 个为下调基因，并对 45 个铁死亡相关差异基因进行热图展示，见图 **2**。

2.1.2　铁死亡差异基因的功能富集分析结果　GO 富集分析显示，铁死亡差异基因的生物过程主要集中在小分子代谢、细胞对外界刺激化学应激及氧化应激的反应和自噬等；在细胞成分方面，铁死亡差异基因与过氧物酶体、线粒体和自噬体等密切相关；分子功能注释表明铁死亡差异基因显著富集在 DNA 结合转录因子结合、氧化还原酶活性和抗氧化活性等，见图 **3A**。根据 KEGG 信号通路分析显示，差异基因主要在脂质与动脉粥样硬化、自噬、铁死亡、脂肪细胞因子信号通路等通路中富集表达，聚类树展示了富集信号通路聚类的三个类型，分别为脂肪细胞因子花生四烯酸、c 型 EGFR− 巨细胞病毒和酒精性肠病，其中在第一类型下主要包括自噬、铁死亡、线粒体代谢及活性氧等相关信号通路，这与实验的差异基因密切相关，见图 **3B**。

2.1.3　PPI 网络的构建　通过 Cytoscape 软件将由 STRING 数据库构建的铁死亡差异基因 PPI 网络进行可视化与优化，该网络包括 34 个节点，111 条边，见图 **4A**；通过 MCODE 插件筛选出 PPI 网络中 2 个功能模块，选择聚类值 > 5 作为核心聚类模块，见图 **4B**；cytoHubba 插件中通过 MCC 算法选取前 15 个基因作为核心靶点，见图 **4C**。

2.1.4　特征基因 NFE2L2 的鉴定结果　对铁死亡差异基因进行 LASSO 回归分析后，确定 18 个标记基因，见图 **5A**；通过 SVM-RFE 机器学习分析，确定 10 个标记基因，见图 **5B**。然后将 MCODE 插件获得的功能模块基因、MCC 算法选取的核心靶点基因与两种机器学习算法筛选的标记基因进行交集，最终获得特征基因 NFE2L2，见图 **5C**。

2.1.5　特征基因 NFE2L2 的验证结果　训练集中，疾病组与正常组相比，特征基因 NFE2L2 的表达水平明显增高 ($P < 0.05$)，见图 **6A**，**表 3**，验证集中 NFE2L2 的表达水平与训练集一致，见图 **6B**，表 3，结果表明了特征基因对缺血性脑卒中发生的潜在影响。

表 3　特征基因在数据集中表达量的统计分析结果 ($\bar{x}\pm s$)

基因名称	正常组	疾病组	*t* 值	*P* 值	数据集类型
NFE2L2	0.22±0.31	0.46±0.33	−2.980	0.005 2	训练集
NFE2L2	6.59±0.27	6.98±0.36	−3.805	0.001 7	验证集

随后，通过 R 包“glmnet”评估特征基因对缺血性脑卒中诊断的准确性与特异性，训练集中 NFE2L2 的 ROC 曲线中 AUC 值为 0.701，逻辑回归模型的 AUC 值 95% *CI*：0.563−0.817，见图 **7A**。同时，通过验证集中 NFE2L2 的 ROC 曲线分析与逻辑回归模型构建，其结果与验证集相符，见图 **7B**，表明了特征基因 NFE2L2 对缺血性脑卒中的发生发展具有良好的诊断价值。

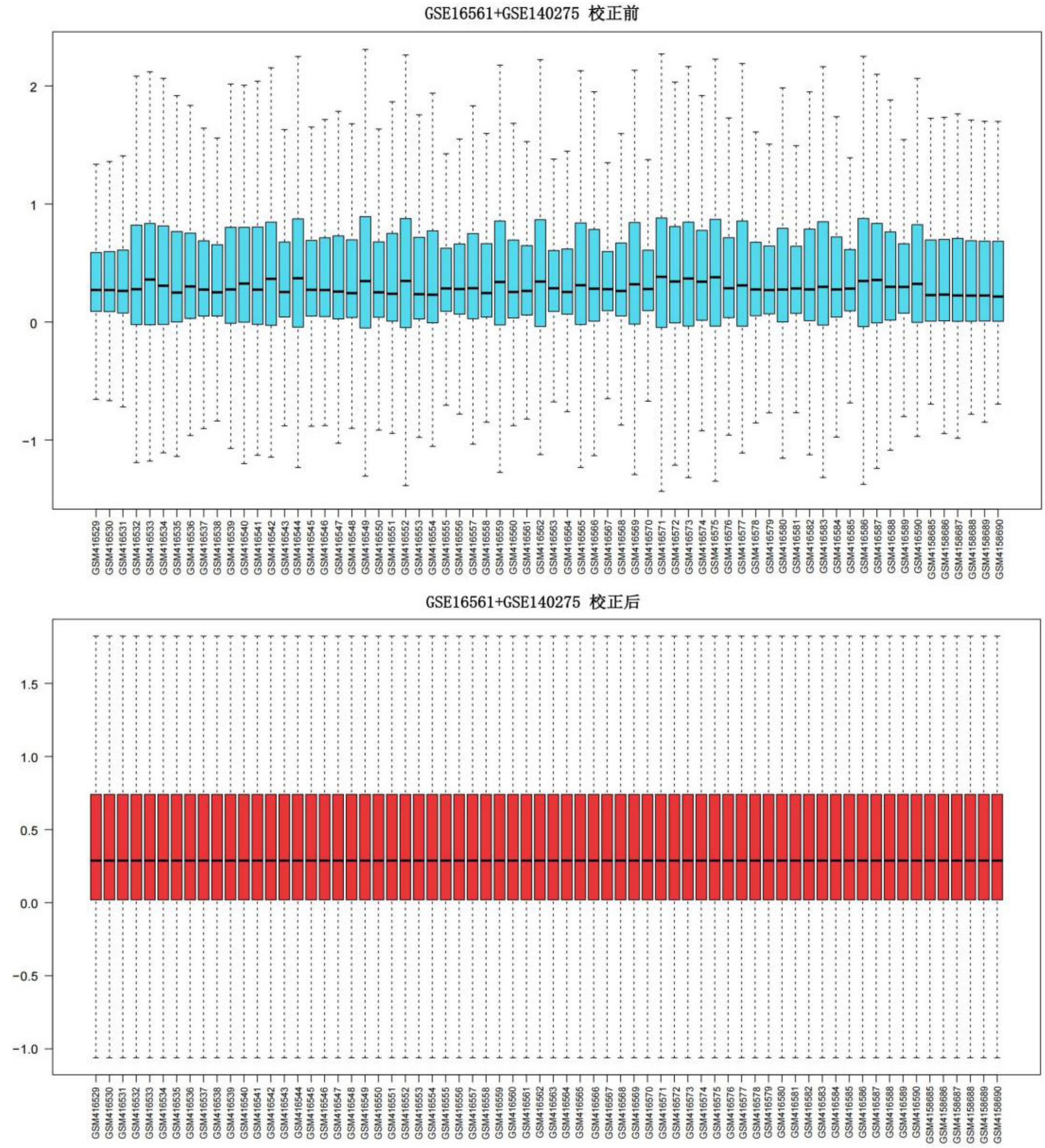
2.1.6　特征基因的基因富集分析结果　GSEA 分析结果显示，特征基因共富集了 20 个主要信号通路，主要富集在免疫、炎症反应、氨基酸代谢及神经因子调控方面，其中在 Ecm 受体相互作用、核糖体和嗅觉传导中表达下调，在其他信号通路中均为上调，如 T 细胞与 B 细胞受体信号通路、系统性红斑狼疮、半胱氨酸和蛋氨酸代谢和神经营养因子信号通路，见图 **8**。

2.2　细胞实验验证缺血性脑卒中铁死亡的发生和特征基因的表达

实验通过检测细胞模型中 ACSL4 与 GPX4 的表达，验证缺血性脑卒中由脂质过氧化诱导的铁死亡的发生。随后检测 NFE2L2 的表达量，验证筛选特征基因的准确性与可靠性。通过 Western blot 和 RT-PCR 实验结果表明，缺血性脑卒中组中的 ACSL4 蛋白与 mRNA 表达量显著高于对照组，GPX4 蛋白与 mRNA 表达水平较对照组明显降低，这从很大程度上表明了缺血性脑卒中铁死亡的发生；NFE2L2 蛋白与 mRNA 表达水平与对照组相比升高，差异具有显著性意义，表明实验筛选缺血性脑卒中铁死亡特征基因的准确性和诊断价值，见图 **9**。

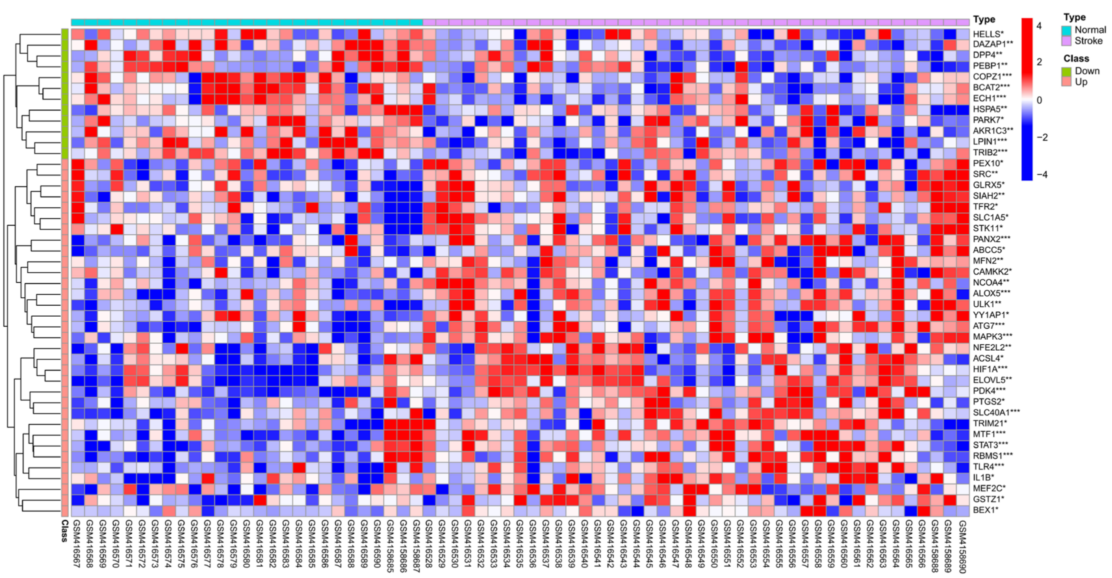
3　总结与展望　Summary and prospects

缺血性脑卒中作为最为常见的神经系统性疾病之一，其病理机制目前尚未完全明确，虽然治疗方法较多，但治疗效果参差不齐，存在各种局限性和不良反应 [16]，因此，探究缺血性脑卒中的病理机制，寻找新的治疗靶点具有重要意义。研究表明，调节神经元细胞的铁死亡可以改善缺血性脑卒中的病理状况，减轻缺血再灌注期间的脑部损伤 [17]。同时，大脑具有氧气高敏感性、高不饱和脂肪酸含量和抗氧化能力低的特点，局部脑区缺血会产生大量自由基与氧化物质，引起铁离子的异常聚集和细胞的脂质过氧化损伤，



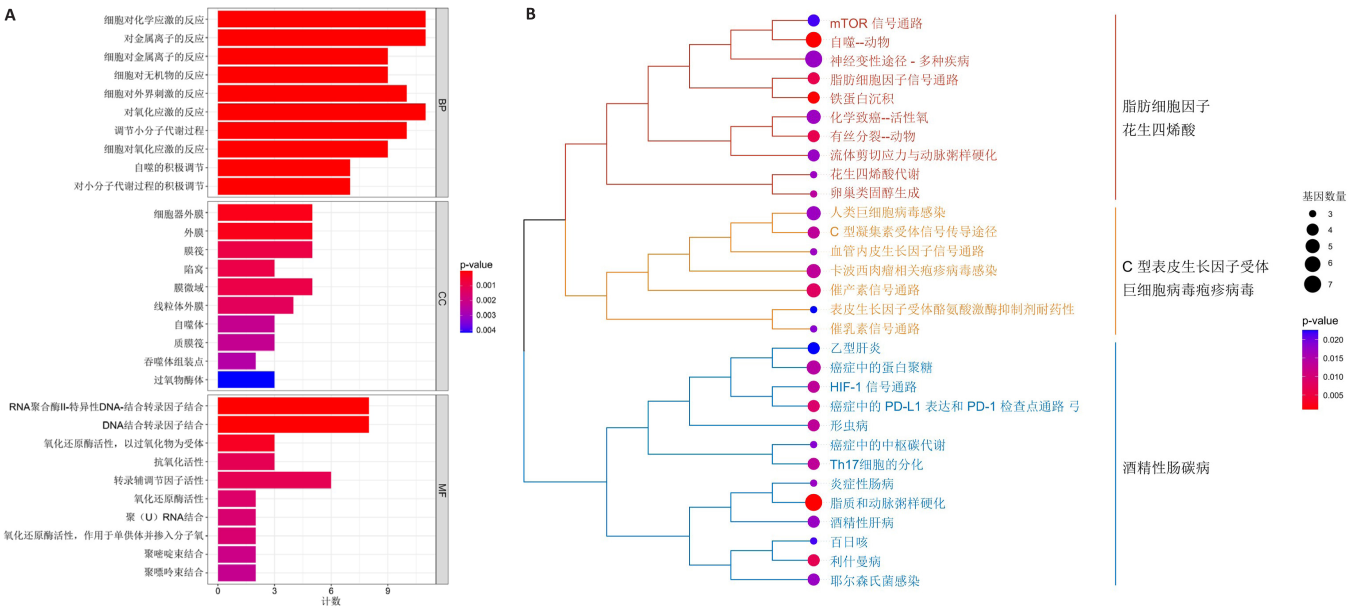
图注：图中横坐标代表样本名称，纵坐标代表样本表达量，其中天蓝色代表校正前各样本表达量，红色代表校正后各样本表达量。

图 1 | **缺血性脑卒中相关数据集 GSE16561 和 GSE140275 的批次效应处理和矫正结果**



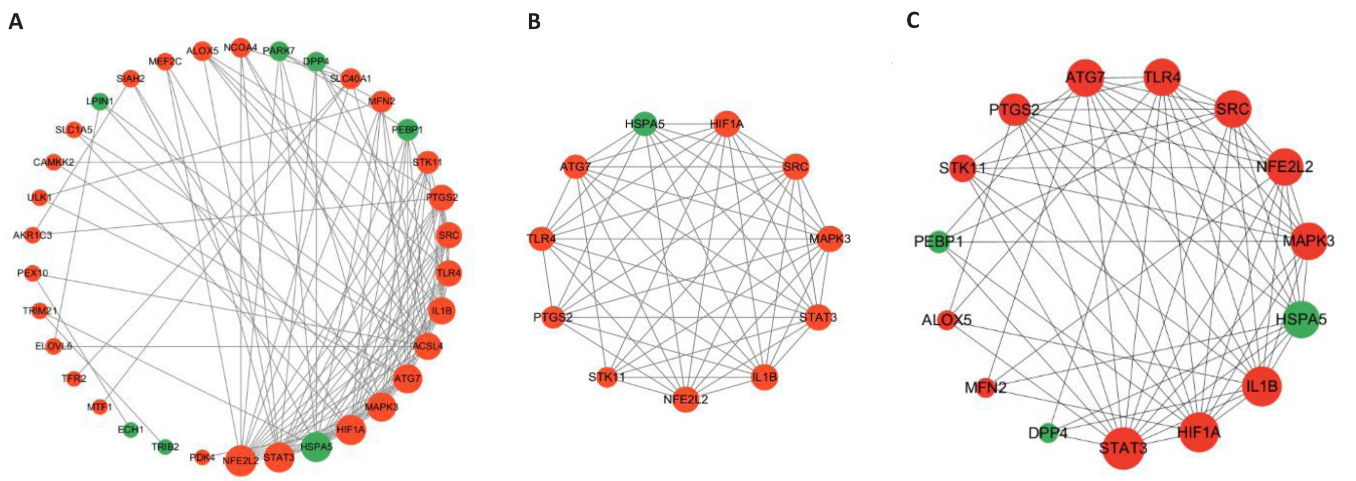
图注：热图表明了训练集中铁死亡差异基因表达情况，蓝色代表低表达，红色高表达，$^*P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$，$^{***}P < 0.001$。

图 2 | **缺血性脑卒中相关铁死亡差异基因的筛选结果**



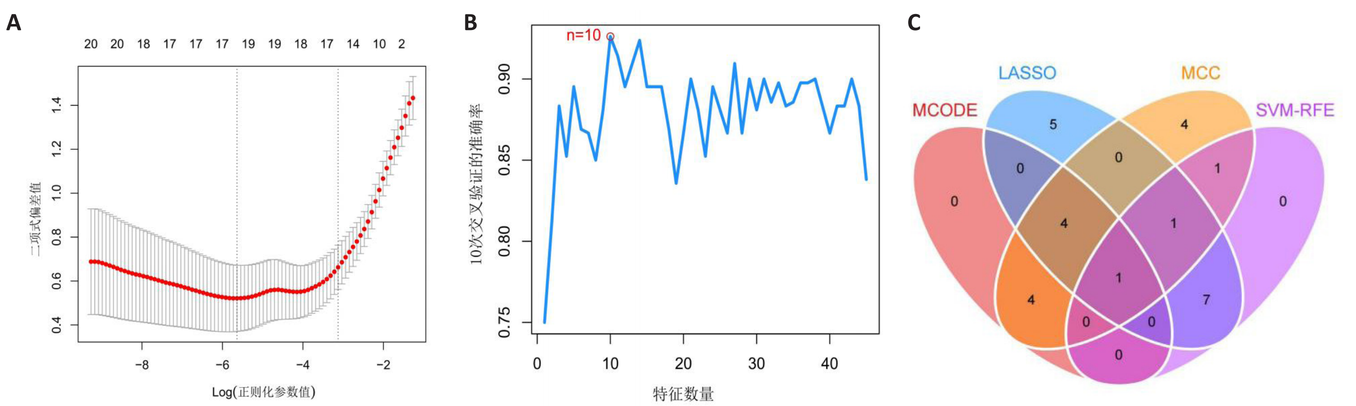
图注：图 A 为铁死亡差异基因的基因本体富集分析，BP 为生物过程；CC 为细胞成分；MF 为分子功能；B 为对铁死亡差异基因富集信号通路进行的聚类分析。

图 3 丨铁死亡差异基因的基因本体富集分析和 KEGG 信号通路富集分析结果



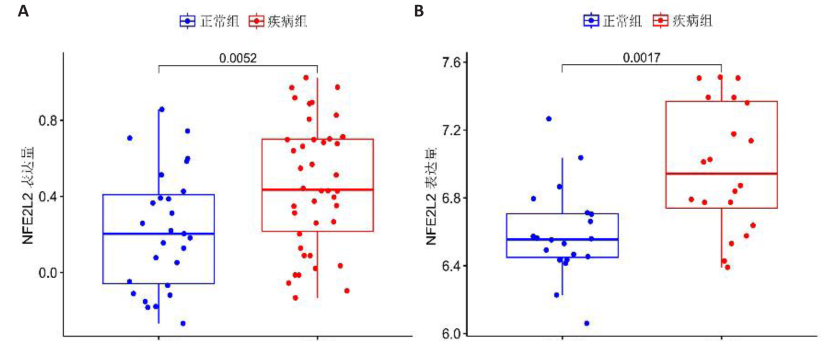
图注：图 A 为铁死亡差异基因之间的蛋白与蛋白互作网络，共有 34 个节点，111 条边；B 为 MCODE 插件筛选出来的核心聚类模块，聚类值 = 10.2，由 11 个节点，51 条边组成；C 为 cytoHubba 插件中 MCC 算法筛选的前 15 个核心基因，由 15 个节点，68 条边构成。节点代表蛋白，边代表蛋白与蛋白之间的互作关系。节点的颜色中红色代表上调表达，绿色代表下调表达。节点的大小反映了度值，节点越大代表度值越高。

图 4 丨铁死亡差异基因的蛋白互作网络、MCODE 聚类模块和最大集团中心性 (MCC) 算法筛选的核心基因



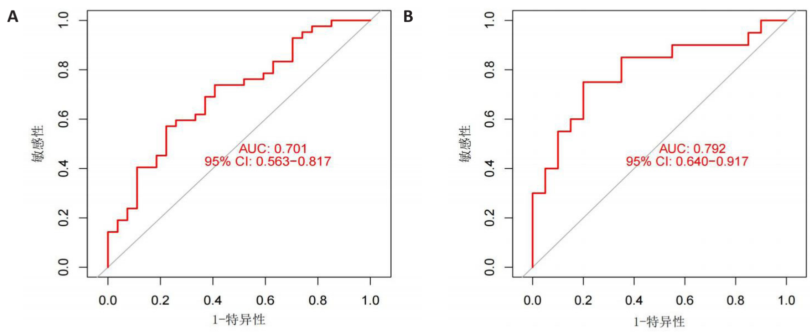
图注：图 A 为通过最小绝对收缩选择算子 (LASSO) 分析，从差异基因中鉴定出 18 个铁死亡特征基因；B 为通过支持向量机递归特征消除 (SVM-RFE) 机器学习，从差异基因中鉴定出 10 个铁死亡特征基因；C 为将 MCODE 插件和最大集团中心性 (MCC) 算法筛选出的的关键靶点与 LASSO 分析和 SVM-RFE 机器学习获取的特征基因取交集，获得最终特征基因 NFE2L2。

图 5 丨铁死亡特征基因的鉴定结果



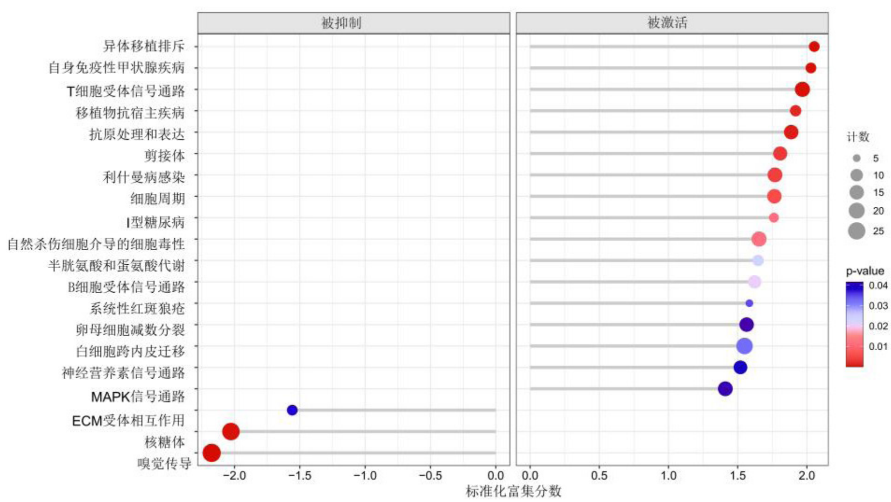
图注：图A为训练集中，特征基因NFE2L2在数据集中正常组和疾病组之间的表达水平，两组之间的表达量存在统计差异(P < 0.05)；B为验证集中，统计特征基因NFE2L2在不同组别之间的表达量，两组之间的表达量存在统计差异(P < 0.05)，与训练集分析结果一致。

图6｜特征基因核因子E2相关因子2(NFE2L2)表达差异分析结果



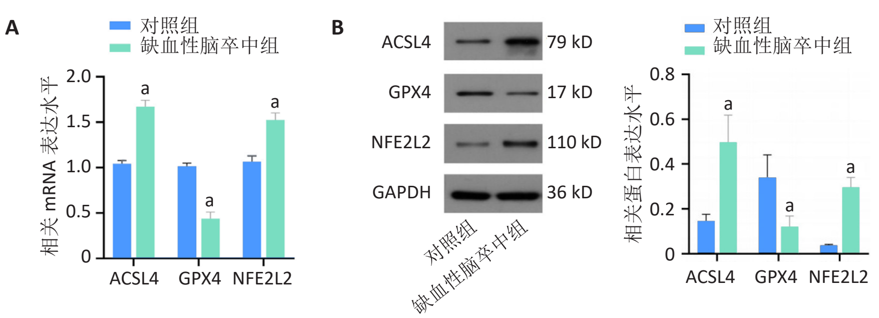
图注：图A为训练集中NFE2L2的AUC值为0.701，95%CI: 0.563-0.817；B为验证集中NFE2L2的AUC值为0.792，95%CI：0.640-0.917。

图7｜特征基因核因子E2相关因子2(NFE2L2)的ROC分析结果



图注：GSEA分析中，NFE2L2在17个信号通路中被激活，上调表达；在3个信号通路中被抑制，下调表达。

图8｜特征基因核因子E2相关因子2(NFE2L2)的GSEA分析结果



图注：图A为RT-PCR结果显示缺血性脑卒中组中的ACSL4 mRNA和特征基因NFE2L2 mRNA表达量显著高于对照组(^aP < 0.05)，GPX4 mRNA表达量显著低于对照组(^aP < 0.05)；B为Western blot结果显示，缺血性脑卒中组中的ACSL4蛋白和特征基因NFE2L2蛋白表达水平显著高于对照组(^aP < 0.05)，GPX4蛋白表达水平显著低于对照组(^aP < 0.05)。与对照组比较，^aP < 0.05。ACSL4为长链酰基辅酶合成酶4；GPX4为谷胱甘肽过氧化物酶4；NFE2L2为核因子E2相关因子2。

图9｜缺血性脑卒中铁死亡表型相关蛋白和mRNA及特征基因蛋白和mRNA的表达

导致铁死亡的发生[18-19]。铁死亡的发生同样会加剧缺血再灌注期间的神经元细胞损伤，继发炎症反应与细胞死亡[20-21]。因此，铁死亡是缺血性脑卒中必不可少的病理现象，维持脑区铁离子平衡和抑制脂质过氧化来防止铁死亡的发生是治疗缺血性脑卒中新的方向与思路。目前，关于缺血性脑卒中的生物信息学研究主要集中在对整个缺血性脑卒中差异基因的研究[22-23]，同时，关于铁死亡与缺血性脑卒中的研究主要以综述的形式进行阐述，缺乏对缺血性脑卒中与铁死亡之间特征基因和病理机制的研究。因此，实验基于疾病芯片数据，通过生

物信息学方法联合机器学习，并通过细胞实验筛选缺血性脑卒中铁死亡潜在生物标志物，以期从铁死亡角度为缺血性脑卒中的病理机制和治疗方法提供新思路与方法。

实验通过疾病基因数据集与铁死亡相关数据库，筛选出45个疾病相关铁死亡差异基因。根据GO富集分析显示，差异基因主要在过氧物酶体、线粒体、氧化还原酶活性及细胞对外界刺激化学应激和氧化应激的反应方面显著富集。过氧物酶体参与清除活性氧和保护细胞免受氧化应激的损伤，当过氧物酶体功能异常或酶活性下降时，会导致氧化应激的增加，从而可能促进铁死亡的发生[24]。线粒体是细胞内铁的主要储存和利用部位之一，铁离子在线粒体内过量积聚会增加线粒体内的氧化应激，导致线粒体功能障碍，诱发铁死亡[25-26]。化学应激中炎症反应和免疫细胞的激活可以引发氧化应激和产生炎性因子，影响细胞内的铁代谢和铁死亡[27-28]。KEGG信号通路显著富集在自噬、铁死亡、线粒体代谢及活性氧等相关信号通路。自噬一方面可以调节细胞内铁离子的代谢，减少铁离子异常积聚引起的氧化应激和细胞损伤，从而抑制铁死亡的发生，另一方面，铁离子的异常积聚和氧化应激也可能影响细胞内的自噬过程，干扰自噬的正常功能，导致自噬功能下降或失调[29]。综上所述，GO富集分析和KEGG信号通路富集分析表明差异表达基因的生物学功能主要与氧化应激密切相关，通过多通路协调发挥作用。缺血缺氧作为缺血性脑卒中的核心诱因，会引起活性氧的大量增加，导致氧化应激的发生，削弱大脑的抗氧化能力。这也证明了铁死亡在缺血性脑卒中的病理发展过程中扮演着重要的角色。但铁死亡在缺血性脑卒中的具体调控机制，仍需深入研究与探索。

为了进一步明确与缺血性脑卒中密切相关的铁死亡特征基因，实验通过MCODE插件、MCC算法、LASSO分析及SVM-RFE机器学习交叉获得了特征基因NFE2L2，又称Nrf2，位于胞质内，生理状态下，NFE2L2受Kelch样蛋白影响，呈现低表达状态，当细胞受到氧化应激和炎症反应时，NFE2L2与Kelch样蛋白分离，易位入核，引起相关转录因子的表达，从而发挥抗氧化作用[30]。脂质过氧化是铁死亡的驱动因素，NFE2L2可以调控多种抗氧化酶，如超氧化物歧化酶、血红素氧合酶1、谷胱甘肽过氧化物酶等，来抑制脂质过氧化的发生[31]。细胞内亚铁离子的增加是诱导铁死亡发生的重要原因之一，NFE2L2活性较低时，亚铁离子含量升高，易导致细胞发生铁死亡[32]。此外，FSP1-CoQ途径是另外一种抑制铁死亡发生的机制，与谷胱甘肽-GPX4途径协同抑制脂质过氧化，FSP1可以抑制CoQ的表达，抑制细胞膜脂质过氧化的发生[33]。值得注意的是，NFE2L2可以激活FSP1，促进其表达[34]。研究表明，Nrf2(NFE2L2)通过上调神经元细胞对铁离子的存储能力，降低谷胱甘肽的损耗，提高对氧化应激的耐受性，从而抑制铁死亡的表达，减轻对细胞的损伤[35]。NFE2L2可以上调抗氧化酶血红素氧合酶1的表达，从而抑制肿瘤坏死因子α和白细胞介素1β等促炎细胞因子的表达[36]。同时，GSEA富集分析显示NFE2L2主要富集在免疫炎症反应、氨基酸代谢及神经因子调控方面，进一步表明特征基因主要通过氧化应激和炎症反应来发挥对缺血性脑卒中的调控作用。ROC分析表明，训练集中NFE2L2的AUC值为0.701，95%*CI*：0.563−0.817；验证集中NFE2L2的AUC值为0.792，95% *CI*：0.640−0.917，表明NFE2L2在诊断缺血性脑卒中铁死亡方面具有较高的诊断价值。实验分析了NFE2L2在训练集与验证集中表达水平的差异性，发现疾病组中NFE2L2的表达量高于正常组，具有显著性意义。

随后，实验通过细胞实验对NFE2L2的表达水平进行了验证，缺血性脑卒中组的表达水平显著高于对照组，与生物信息学鉴定的结果一致。为了验证缺血性脑卒中是否发生了铁死亡，通过细胞实验验证了铁死亡发生的相关指标。ACSL4作为调节脂质成分的关键因子，可以导致脂质过氧化，造成铁死亡的发生[37]，敲低ACSL4可以抑制小胶质细胞中炎症反应[38]。同时，GPX4被认为是调节铁死亡发生的核心调节因子，在抑制细胞铁死亡的发生中发挥着重要作用[39]。实验通过对缺血性脑卒中ACSL4及GPX4 mRNA表达和蛋白表达的检测发现，与对照组相比，缺血性脑卒中组中的ACSL4 mRNA和蛋白表达量显著升高，而GPX4 mRNA和蛋白的表达则显著降低，证明了缺血性脑卒中铁死亡的发生。

该文尽管通过生物信息学和机器学习鉴定出NFE2L2作为缺血性脑卒中铁死亡的潜在生物标志物，但仍存在不足之处。实验只是在细胞实验中验证了NFE2L2的表达，未进行动物实验和临床试验验证；其次，未对缺血性脑卒中铁死亡的表型进行深入探究。未来可以进一步探索缺血性脑卒中的铁死亡相关机制和特征基因对缺血性脑卒中铁死亡的调控机制。

综上所述，实验从铁死亡角度入手，通过生物信息学和机器学习，筛选鉴定并验证了NFE2L2作为缺血性脑卒中铁死亡的潜在生物标志物，靶向NFE2L2可能是对缺血性脑卒中患者有价值的策略与方法，并验证了缺血性脑卒中铁死亡的发生，为进一步研究缺血性脑卒中的病理机制和诊断治疗提供新的思路与见解。

作者贡献：文章设计和数据分析者为王咪和马书杰。资料收集者为刘杨。王咪撰写论文。齐瑞审校。

利益冲突：文章的全部作者声明，在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

出版规范：该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行3次查重。文章经小同行外审专家双盲外审，同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

4 参考文献 References

[1] ANDRABI SS, PARVEZ S, TABASSUM H. Ischemic stroke and mitochondria: mechanisms and targets. Protoplasma. 2020;257(2):335-343.

[2] TUO QZ, ZHANG ST, LEI P. Mechanisms of neuronal cell death in ischemic stroke and their therapeutic implications. Med Res Rev. 2022;42(1):259-305.
[3] GBD 2017 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 354 diseases and injuries for 195 countries and territories, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. Lancet. 2018; 392(10159):1789-1858.
[4] GBD 2019 STROKE COLLABORATORS. Global, regional, and national burden of stroke and its risk factors, 1990-2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. Lancet Neurol. 2021;20(10):795-820.
[5] REN J X, LI C, YAN XL, et al. Crosstalk between oxidative stress and ferroptosis/oxytosis in ischemic stroke: possible targets and molecular mechanisms. Oxid Med Cell Longev. 2021;2021:6643382.
[6] WEILAND A, WANG Y, WU W, et al. Ferroptosis and its role in diverse brain diseases. Mol Neurobiol. 2019;56(7): 4880-4893.
[7] WEI Z, XIE Y, WEI M, et al. New insights in ferroptosis: potential therapeutic targets for the treatment of ischemic stroke. Front Pharmacol. 2022;13:1020918.
[8] ZHANG Y, LU X, TAI B, et al. Ferroptosis and its multifaceted roles in cerebral stroke. Front Cell Neurosci. 2021;15: 615372.
[9] TUO QZ, LEI P, JACKMAN KA, et al. Tau-mediated iron export prevents ferroptotic damage after ischemic stroke. Mol Psychiatry. 2017;22(11):1520-1530.
[10] LIU J, GUO ZN, YAN XL, et al. Crosstalk between autophagy and ferroptosis and its putative role in ischemic stroke. Front Cell Neurosci. 2020;14:577403.
[11] FABRIS F, PALMER D, DE MAGALHÃES JP, et al. Comparing enrichment analysis and machine learning for identifying gene properties that discriminate between gene classes. Brief Bioinform. 2020;21(3): 803-814.
[12] AUSLANDER N, GUSSOW AB, KOONIN EV. Incorporating machine learning into established bioinformatics frameworks. Int J Mol Sci. 2021;22(6):2903.
[13] MANN M, KUMAR C, ZENG WF, et al. Artificial intelligence for proteomics and biomarker discovery. Cell Syst. 2021;12(8): 759-770.
[14] PENG C, AI Q, ZHAO F, et al. Quercetin attenuates cerebral ischemic injury by inhibiting ferroptosis via Nrf2/HO-1 signaling pathway. Eur J Pharmacol. 2023; 963:176264.
[15] LIVAK KJ, SCHMITTGEN TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods. 2001;25(4): 402-408.
[16] ZHAO Y, ZHANG X, CHEN X, et al. Neuronal injuries in cerebral infarction and ischemic stroke:From mechanisms to treatment (Review). Int J Mol Med. 2022;49(2):15.
[17] TUO QZ, ZHANG ST, LEI P. Mechanisms of neuronal cell death in ischemic stroke and their therapeutic implications. Med Res Rev. 2022;42(1):259-305.
[18] YAO MY, LIU T, ZHANG L, et al. Role of ferroptosis in neurological diseases. Neurosci Lett. 2021;747:135614.
[19] LI Y, LI M, FENG S, et al. Ferroptosis and endoplasmic reticulum stress in ischemic stroke. Neural Regen Res. 2024;19(3): 611-618.
[20] LAN B, GE JW, CHENG SW, et al. Extract of Naotaifang, a compound Chinese herbal medicine, protects neuron ferroptosis induced by acute cerebral ischemia in rats. J Integr Med. 2020;18(4):344-350.
[21] GUO H, ZHU L, TANG P, et al. Carthamin yellow improves cerebral ischemia-reperfusion injury by attenuating inflammation and ferroptosis in rats. Int J Mol Med. 2021;47(4):52.
[22] 于瑜，王钟兴 . 基于生物信息学途径筛选缺血性脑卒中关键基因及药物预测 [J]. 中山大学学报 (医学科学版),2021,42(1): 42-50.
[23] 周嫱，柏娜，刘生刚，等 . 基于生物信息学和机器学习方法探索缺血性脑卒中关键风险基因 [J]. 中国神经精神疾病杂志，2022,48(9):525-532.
[24] GUO Y, ZHOU P, QIAO L, et al. Maternal protein deficiency impairs peroxisome biogenesis and leads to oxidative stress and ferroptosis in liver of fetal growth restriction offspring. J Nutr Biochem. 2023; 121:109432.
[25] CHEN X, KANG R, KROEMER G, et al. Organelle-specific regulation of ferroptosis. Cell Death Differ. 2021;28(10):2843-2856.
[26] SHE R, LIU D, LIAO J, et al. Mitochondrial dysfunctions induce PANoptosis and ferroptosis in cerebral ischemia/reperfusion injury: from pathology to therapeutic potential. Front Cell Neurosci. 2023;17: 1191629.
[27] ZHENG D, LIU J, PIAO H, et al. ROS-triggered endothelial cell death mechanisms: focus on pyroptosis, parthanatos, and ferroptosis. Front Immunol. 2022;13:1039241.
[28] YANG K, ZENG L, YUAN X, et al. The mechanism of ferroptosis regulating oxidative stress in ischemic stroke and the regulation mechanism of natural pharmacological active components. Biomed Pharmacother. 2022;154:113611.
[29] TANG D, CHEN X, KANG R, et al. Ferroptosis: molecular mechanisms and health implications. Cell Res. 2021;31(2):107-125.
[30] ROJO DE LA VEGA M, CHAPMAN E, ZHANG DD. NRF2 and the hallmarks of cancer. Cancer cell. 2018;34(1):21-43.
[31] CONRAD M, KAGAN VE, BAYIR H, et al. Regulation of lipid peroxidation and ferroptosis in diverse species. Genes Dev. 2018;32(9-10):602-619.
[32] NISHIZAWA H, YAMANAKA M, IGARASHI K. Ferroptosis: regulation by competition between NRF2 and BACH1 and propagation of the death signal. FEBS J. 2023;290(7): 1688-1704.
[33] BERSUKER K, HENDRICKS JM, LI Z, et al. The CoQ oxidoreductase FSP1 acts parallel to GPX4 to inhibit ferroptosis. Nature. 2019;575(7784):688-692.
[34] JIANG X, STOCKWELL BR, CONRAD M. Ferroptosis: mechanisms, biology and role in disease. Nat Rev Mol Cell Biol. 2021; 22(4):266-282.
[35] LIU Z, LV X, SONG E, et al. Fostered Nrf2 expression antagonizes iron overload and glutathione depletion to promote resistance of neuron-like cells to ferroptosis. Toxicol Appl Pharmacol. 2020;407:115241.
[36] DENG X, CHU W, ZHANG H, et al. Nrf2 and ferroptosis: a new research direction for ischemic stroke. Cell Mol Neurobiol. 2023;43(8):3885-3896.
[37] SONG X, LONG D. Nrf2 and ferroptosis: a new research direction for neurodegenerative diseases. Front Neurosci. 2020;14:267.
[38] CUI Y, ZHANG Y, ZHAO X, et al. ACSL4 exacerbates ischemic stroke by promoting ferroptosis-induced brain injury and neuroinflammation. Brain Behav Immun. 2021;93:312-321.
[39] FAN GB, LI Y, XU GS, et al. Propofol inhibits ferroptotic cell death through the Nrf2/Gpx4 signaling pathway in the mouse model of cerebral ischemia-reperfusion injury. Neurochem Res. 2023;48(3):956-966.

(责任编辑：WJ，ZN，QY，ZM)