基于生物信息学方法探究白癜风铁死亡相关发病机制和潜在治疗药物筛选

刘祥冉[1]，李治建[1,2,3*]，阿卜杜热伊木·阿力木江[1]，魏文婧[2]，霍仕霞[2,3*]

1. 新疆医科大学 药学院，新疆 乌鲁木齐 830011
2. 新疆维吾尔自治区维吾尔医医院，新疆 乌鲁木齐 830049
3. 新疆中药医院制剂循证与转化重点实验室，新疆 乌鲁木齐 830049

摘 要：目的 通过生物信息学方法分析白癜风疾病中铁死亡基因及相关发病机制，并筛选通过铁死亡相关途径治疗白癜风的潜在药物。**方法** 从 FerrDB 数据库获取铁死亡基因，通过 R 分析数据集 GSE53146 中差异表达基因，随后二者取交集。通过 SVM-REF 算法和 LASSO 回归构建机器学习模型预测白癜风铁死亡关键基因并通过数据集 GSE75819 进行基因表达验证。GSE203262 单细胞数据进行细胞聚类分析，发现与关键基因高度相关且参与白癜风发病的关键细胞群，随后通过 HPA 数据库对基因表达细胞进行验证。利用 cAMP 数据库筛选关键基因相关小分子药物，利用分子对接技术验证小分子化合物与基因结合的能力。最后进行单基因免疫细胞相关性分析及 GSEA-KEGG 分析探讨小分子药物治疗白癜风的相关免疫机制。**结果** 获得 458 个铁死亡基因和 706 个差异表达基因，二者交集基因 23 个。机器学习预测模型筛选出 *RRM2*、*LCN2*、*OTUB1*、*SNCA*、*CTSB*、*WWTR1* 作为关键基因。外部数据集验证、单细胞聚类和 HPA 数据均提示关键基因中 *OTUB1*、*CTSB* 和 *LCN2* 主要在角质形成细胞、黑素细胞和朗格汉斯细胞等重要皮肤细胞中表达。通过高通量筛选和分子对接验证，获得雷公藤甲素作为通过铁死亡途径治疗白癜风的小分子药物。免疫细胞相关性分析发现雷公藤甲素通过影响关键基因调控自然杀伤细胞、活化的 $CD8^+$ T 细胞等免疫细胞的功能。GSEA-KEGG 分析发现雷公藤甲素可能通过趋化因子信号通路、机体代谢信号通路和 NOD 样受体信号通路产生治疗白癜风的作用。**结论** 利用生物信息学方法发现在白癜风发病中重要的铁死亡证据及相关机制，并以此为插入点筛选到雷公藤甲素作为潜在治疗药物，对白癜风发病及治疗研究具有重要意义。

关键词：白癜风；铁死亡；预测模型；关键基因；雷公藤甲素

中图分类号：R285 **文献标志码：**A **文章编号：**1674 - 5515(2024)04 - 0826 - 13

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2024.04.004

Exploring the pathogenesis and potential therapeutic drug screening related to ferroptosis in vitiligo based on bioinformatics approach

LIU Xiangran[1], LI Zhijian[1,2,3], Abudureyimu ALIMUJIANG[1], WEI Wenjing[2], HUO Shixia[2,3]

1. School of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China
2. Uyghur Medical Hospital of Xinjiang Uyghur Autonomous Region, Urumqi 830049, China
3. Xinjiang Key Laboratory of Evidence-Based and Translation, Hospital preparation of Traditional Chinese Medicine, Urumqi 830049, China

Abstract: Objective To analyze ferroptosis genes and related pathogenesis in vitiligo diseases by bioinformatics methods and to explore potential drugs for the treatment of vitiligo through ferroptosis related pathways. **Methods** Ferroptosis genes were obtained from the FerrDB database and differentially expressed genes in the dataset GSE53146 were analyzed by R. Subsequently, the two were taken to intersect. A machine learning model was constructed by SVM-REF algorithm and LASSO regression to predict key genes for ferroptosis in vitiligo and validated for gene expression by dataset GSE75819. Cell clustering analysis of the GSE203262 single-cell data identified key cell populations that were highly correlated with key genes and involved in vitiligo pathogenesis, which were subsequently validated against gene-expressing cells by the HPA database. The cAMP database was utilized to screen key gene-related small molecule drugs, and molecular docking technology was utilized to verify the ability of small molecule compounds to bind to

收稿日期：2023-12-01

基金项目：国家自然科学基金地区科学基金资助项目（82160821）；新疆自治区重点研发计划项目（2022B03012-4）；“天山英才”培养计划项目（2022TSYCLJ009，2022TSYCCX0021）；国家中医药管理局青年岐黄学者培养项目（国中医药人教函[2022256]号）

作者简介：刘祥冉，男，硕士，主要从事中药防治白癜风的机制研究。E-mail: 1619850680@qq.com

***通信作者：**李治建，男，研究员，博士，主要从事中药药理及毒理学研究。E-mail: lizhijian0220@sina.com

霍仕霞，女，研究员，博士，主要从事中药民族药开发与应用。E-mail: huoshixia1983@163.com

genes. Finally, single gene immune cell correlation analysis and GSEA-KEGG analysis were performed to explore the immune mechanisms associated with small molecule drugs for treating vitiligo. **Results**　458 ferroptosis genes and 706 differentially expressed genes were obtained, and 23 genes were intersected by the two. The machine learning prediction model screened *RRM2*, *LCN2*, *OTUB1*, *SNCA*, *CTSB*, and *WWTR1* as key genes. External dataset validation, single-cell clustering, and HPA data all suggested that the key genes, *OTUB1*, *CTSB*, and *LCN2*, were predominantly expressed in important skin cells such as keratinocytes, melanocytes, and Langerhans cells. High-throughput screening and molecular docking validation were performed to obtain triptolide as a small molecule drug for the treatment of vitiligo via the ferroptosis pathway. Immune cell correlation analysis revealed that triptolide modulates the function of immune cells such as natural killer T cell and activated CD8 T cell by affecting the key genes. GSEA-KEGG analysis revealed that triptolide may treat vitiligo through chemokine signaling pathway, body metabolic signaling pathway and NOD-like receptor signaling pathway. **Conclusions**　Bioinformatics methods were used to discover important iron death evidence and related mechanisms in the pathogenesis of vitiligo, and this was used as an insertion point to screen triptolide as a potential therapeutic agent, which is of great significance to the study of vitiligo pathogenesis and treatment.

Key words: vitiligo; ferroptosis; prediction model; key genes; triptolide

白癜风是一种自身免疫性皮肤色素脱失性疾病，主要临床表现为皮肤出现局限性白色斑块。据统计，白癜风患病率占全球人口的 0.5%～2%[1]。大多数研究认为白癜风发病主要与自身免疫[2]、氧化应激[3]、局部炎症及角质形成细胞功能异常[4]有关。尽管目前的研究结果对白癜风的发病机制提供了部分见解，但确切机制仍需进一步证实。

铁死亡的主要机制是铁和脂质活性氧（L-ROS）的积累以及一组特定基因的参与导致的铁相关性程序性细胞死亡[5]。谷胱甘肽过氧化物酶 4（GPX4）是铁死亡的关键因子[6]。GPX4 活性下降，氧化脂质产生大量的活性氧（ROS）。这种氧自由基可增强细胞的氧化损伤，诱导细胞死亡[7]。氧化应激诱导的免疫反应是白癜风发病的触发因素，而 ROS 过度积聚是激活氧化应激的主要原因[8]。氧化应激中细胞内质网应激可触发一种称为未折叠蛋白反应（UPR）的细胞反应，UPR 可引起 ROS 诱导的 CXC 趋化因子配体 16（CXCL16）活性增加，CXCL16 是白癜风中细胞毒性 T 细胞迁移所必需的趋化因子[9]。此外，ROS 可直接诱导角质形成细胞分泌三磷酸腺苷也可引发半胱氨酸蛋白酶-3（Caspase-3）介导的黑素细胞死亡，也可诱导黑素细胞附近的角质形成细胞产生 CXCL9/10，从而招募 $CD8^+$ T 细胞在局部组织浸润产生细胞杀伤作用[10]。故铁死亡、ROS 生成和氧化应激可能与白癜风患者体内免疫系统功能有密切联系。在皮肤组织中，多种原因（包括铁死亡）导致 ROS 的过量产生所引起的氧化应激，能够激活 γ 干扰素（IFN-γ）-CXCL9/CXCL10-CXCR3 轴、CXCL16-CXCR6 轴和高迁移率族蛋白 B1（HMGB1）-核因子-κB（NF-κB）p65/细胞外调节蛋白激酶（ERK）-CXCL8 轴导致下游的免疫细胞功能紊乱，使皮肤中免疫稳态失衡，导致白癜风的发病[9, 11-13]。所以推测通过铁死亡途径治疗白癜风的根本机制是使白癜风患者免疫系统趋向稳态，调节功能异常的免疫细胞发挥正常的免疫功能。

雷公藤是卫矛科雷公藤属植物，具有抗炎、抗肿瘤、免疫调节等作用[14]。雷公藤作为皮肤科常用药，临床可用于治疗慢性荨麻疹、皮肌炎和银屑病等[15]。雷公藤甲素是雷公藤中主要活性成分之一，可抑制多种炎性介质和淋巴细胞增殖，具有很好的抗炎和抑制免疫活性作用[16]。相关研究报道雷公藤甲素对角质形成细胞有明显的抑制作用，并且研究进一步证实雷公藤甲素能有效抑制角质形成细胞中 IFN-γ 响应性 Janus 激酶（JAK）/信号传导及转录激活蛋白（STAT）信号通路的表达[17]。白癜风相关研究也发现 IFN-γ 刺激角质形成细胞，细胞内 JAK/STAT 信号激活使细胞分泌大量的 CXCL9/10，从而招募黑素细胞特异性 $CD8^+$ T 细胞聚集产生杀伤黑素细胞的作用，在此过程中角质形成细胞具有极其关键的作用，所以抑制角质形成细胞可能是雷公藤甲素治疗白癜风的潜在机制[18]。本研究利用生物信息学[19]方法寻找与白癜风发生发展相关的高质量铁死亡基因及相关的免疫信号机制，并通过高通量筛选获得雷公藤甲素作为潜在治疗药物，旨在为白癜风的发病机制研究及治疗策略提供参考依据。

1　材料和方法

1.1　数据来源

使用 R 语言 GEOquery 包[20]从高通量基因表达（https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/）数据库中获取原始数据集 GSE53146（GPL14951）作为分析的实验

集（包括 5 位白癜风患者、5 位健康志愿者）；GSE75819（GPL6884）数据集作为关键基因外部验证集（包括 15 位白癜风患者、15 位健康志愿者）；GSE203262（GPL20301）数据集作为单细胞评估分析集（包括 6 位白癜风患者、6 位健康志愿者）。此外，本工作中获取的铁死亡基因（FRGs）是基于 FerrDB 数据库中 Driver、Suppressor、Marker 模块获得铁死亡相关基因。

1.2 差异表达基因筛选

获取数据集中原始表达矩阵后，通过 Normalize Between Arrays 校正除去批次效应，并通过 R 软件 limma 包[21]分析白癜风患者皮肤及健康对照皮肤之间的差异表达基因（DEGs），将$|\log_2 FC|>1$，$P<0.05$ 作为具有显著性差异的标准。

1.3 筛选白癜风铁死亡关键基因

在 R 语言中使用 ggvenn 包获得 DEGs 与 FRGs 交集基因作为白癜风铁死亡差异表达基因（FR-DEGs）。利用 glmnet 包[22]，采用最小绝对收缩选择算子（LASSO）来减少数据维度。同时获取 LASSO 算法预测的基因[23]。利用 kernlab 包[24]构建支持向量机递归特征消除（SVM-RFE）模型，并使用平均误判率与 10 倍交叉验证进行比较[25]，筛选模型预测基因。2 种算法所得基因取交集即白癜风铁死亡关键基因（也是通过铁死亡途径治疗白癜风的关键靶点）。使用 pROC 包绘制受试者工作特征（ROC）曲线，并确定曲线下面积（AUC）值，以评估本研究选择的标记基因是否具有诊断价值。另外，本研究还利用 circlize 包[26]用来分析关键基因之间的相互作用关系。

1.4 单细胞聚类分析及关键基因验证

此部分基于 GSE203262 数据集进行。该数据集涵盖 6 个白癜风和 6 个正常样本。在本研究中使用 Seurat R 包[27]进行质量控制。细胞剔除的标准为（1）RNA 计数＜50，（2）线粒体基因表达率＜5%，利用 Seurat 中的 Normalize Data 函数对数据进行规范化。在后期分析中，选择了 15 个最显著的主成分和 2 000 个最显著的可变基因。使用 Seurat 的 Find Clusters 函数（分辨率＝0.5）检测细胞簇，并采用 2Dt 分布随机嵌入（tSNE）显示[28]。本研究采用 Single R 包，将不同簇中的细胞与带注释的参考数据集进行比较[29]。根据识别的细胞标记和比较结果完成细胞类型的聚类标注。利用 HPA 数据库进一步验证关键基因在正常皮肤组织细胞群中的表达，表达水平显示为 4 种类型：未检测到、低、中、高。染色细胞的比例（＜25%、25%～75%、＞75%）和染色强度（阴性、弱、中等、强）构成了评分系统。

1.5 免疫细胞相关性分析

白癜风病灶内免疫微环境对疾病发生发展具有十分重要的作用。ssGSEA 方法是使用 23 个免疫细胞基因集构建的。本研究中通过 R 软件 GSVA 包中 ssGSEA 方法评估关键基因免疫细胞浸润特征[30]。

1.6 小分子化合物的筛选

在 cMAP 数据库中（https://clue.io/query）筛选通过铁死亡途径治疗白癜风的潜在小分子化合物。将关键靶点分别上传至 cMAP 数据库，通过数据库高通量分析，筛选出对其具有潜在作用的小分子化合物。按照高通量筛选得分由底到高排列，删去无归类的小分子，选取前 30 个化合物作为后续研究的主要对象。

1.7 分子对接

利用分子对接初步验证化合物与潜在靶点结合，结合能＜0 kcal/mol 说明配体分子与受体蛋白可以自发结合。在本研究中，通过 PDB 数据库（https://www.rcsb.org/）[31]下载靶点蛋白的 3D 结构，在 AutoDockTools 1.5.7 软件中处理后保存为 PDBQT 格式[32]。通过 PubChem 下载小分子化合物的 3D 结构式，以同样的方式处理后保存为 PDBQT 格式[33]。将上述 2 个结构文件导入到 AutoDockTools 1.5.7 中进行对接并计算结合能，使用 OpenBabel 软件[34]将对接结果的 PDBQT 格式转换为 PDB 格式，随后使用 PyMOL 软件将对接结果可视化。

1.8 关键基因的 GSEA-京都基因与基因组百科全书（KEGG）富集分析

利用 R 语言 GSEA 包分析关键基因与 GSE53146 数据集中其他基因之间的相关性。将所有基因根据其相关性从高到低排序，作为用来测试的基因集。同时将 KEGG 信号通路集作为预定义集调用，以检测关键基因在信号通路集中的富集。

1.9 统计学分析

在本研究中使用 Wilcoxon 秩和检验进行两组之间的比较。采用 Spearman 相关性分析 23 个白癜风铁死亡基因之间的关系，Cytoscape 用于 ceRNA 网络可视化。

2 结果

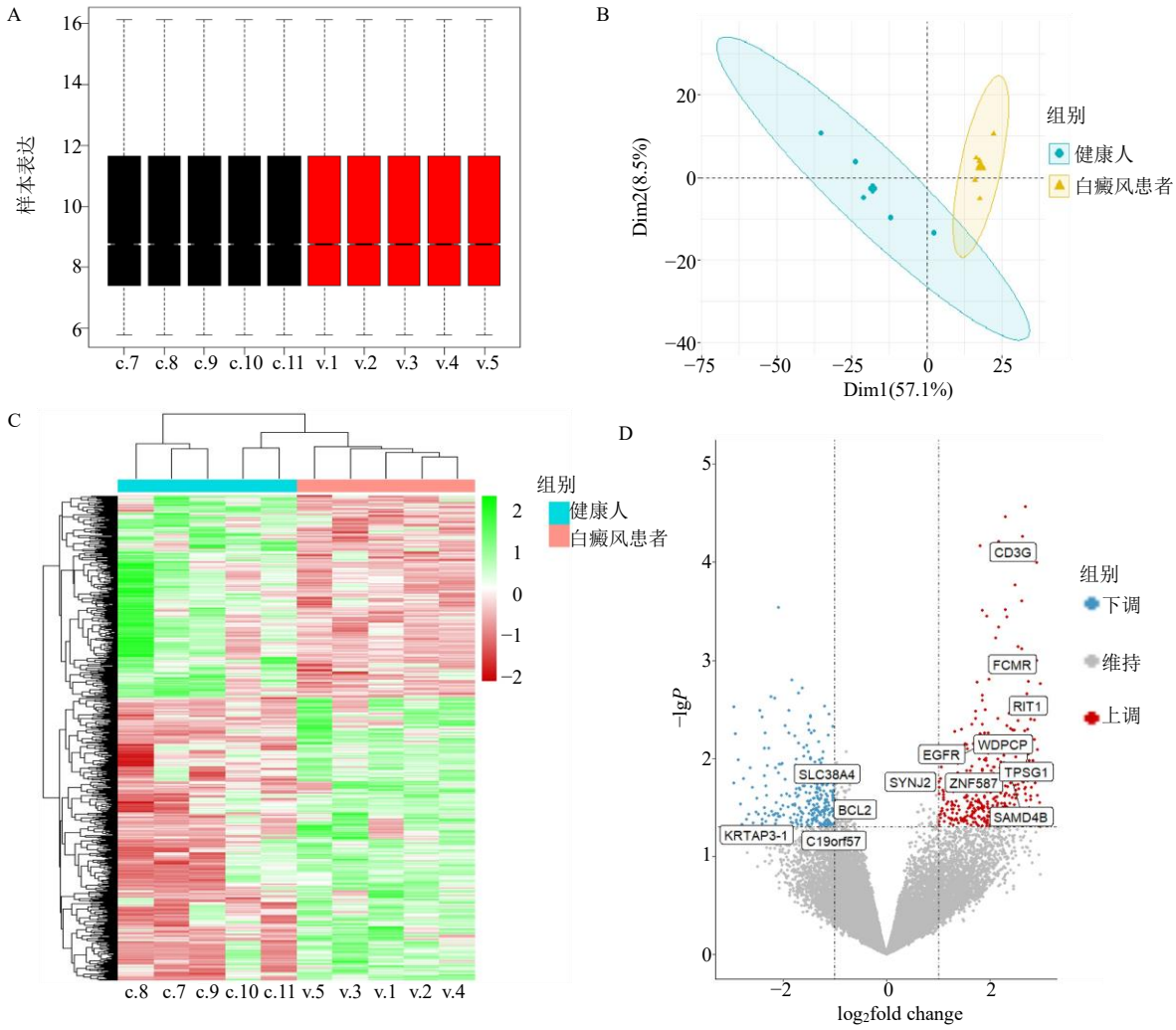
2.1 获取差异表达基因及铁死亡基因

将 GSE53146 矫正后进行差异表达基因分析

（图 1A、1B），共获得 706 个 DEGs，其中包括 412 个上调基因和 294 个下调基因，DEGs 热图及火山图如图 1C、D 所示。在 FerrDB 数据库中获取 3 个模块相关数据，汇总去重后共得到 458 个铁死亡标志物。

2.2　白癜风铁死亡关键基因的筛选

将 706 个 DEGs 对 458 个 FRGs 进行映射，筛选出 23 个 FR-DEGs（图 2A）。FR-DEGs 之间的



A-GSE53146 数据集标准化后各样本表达；B-GSE53146 数据集主成分分析图；C-GSE53146 数据集的热图；D-GSE53146 数据集火山图。
A-expression of each sample after standardization of GSE53146 dataset; B-GSE53146 data set principal component analysis diagram; C-Heat map of GSE53146 data set; D-GSE53146 data set volcano map.

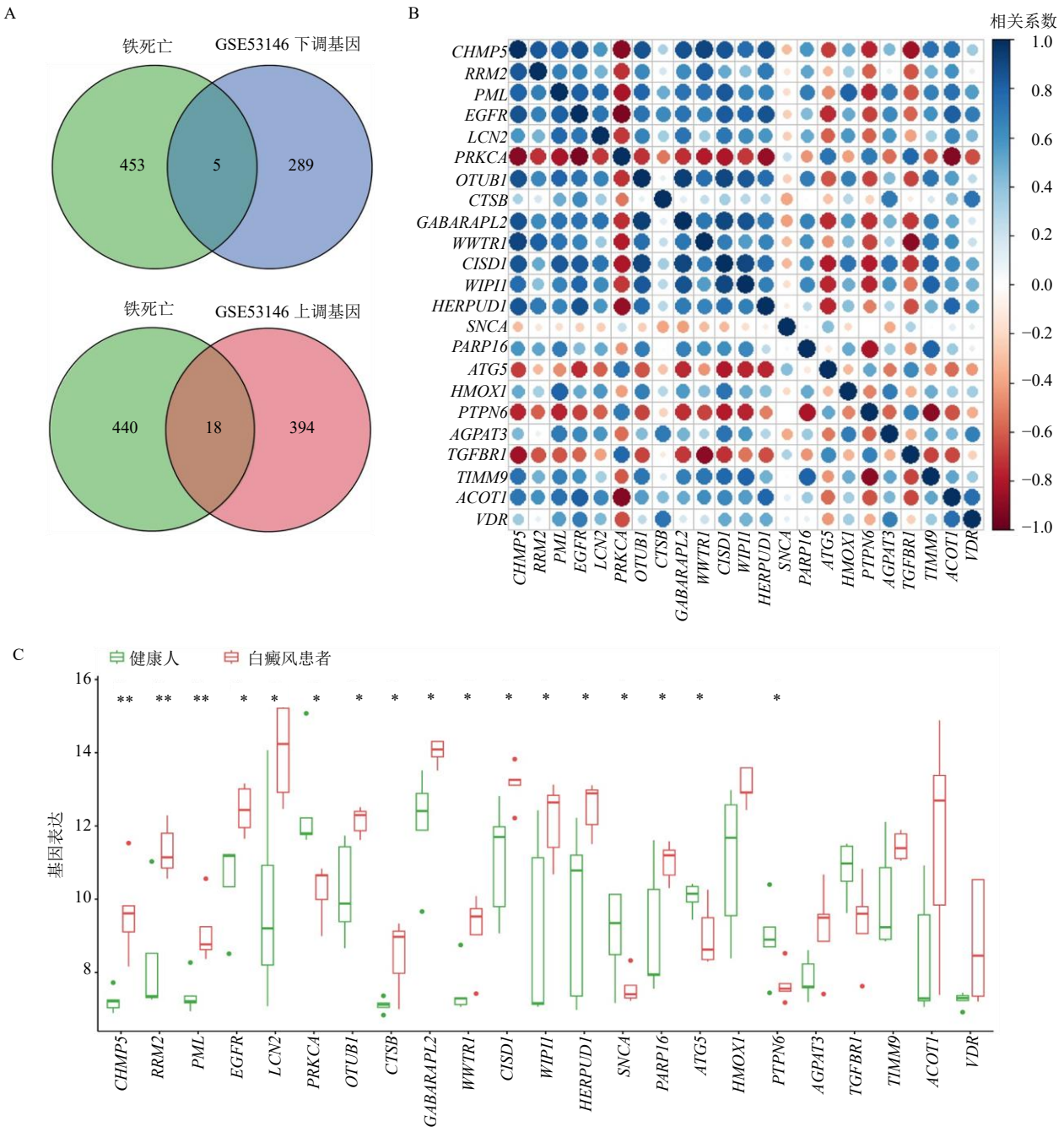
图 1　GEO 数据集处理与差异表达基因分析

Fig. 1　GEO dataset processing and differential expression gene analysis

Spearman 相关性如图 2B 所示。箱线图展现了白癜风患者大多数 FR-DEGs 表达水平较健康人高（$P<0.05$、0.01，图 2C）。获得 FR-DEGs 后，利用 LASSO 算法筛选出 6 个基因（图 3A），利用 SVM-RFE 筛选出 18 个基因（图 3B），取交集得核糖核苷二磷酸还原酶亚基 M2（*RRM2*）、组织蛋白酶 B（*CTSB*）、OTU 去泛素化酶 1（*OTUB1*）、α-突触核蛋白（*SNCA*）、脂质运载蛋白 2（*LCN2*）、人含 WW 域转录调节蛋白 1（*WWTR1*）6 个关键基因（图 3C）。如图 3D 所示关键基因间具有较高相关性。关键基因的 ROC 曲线说明，*OTUB1* 和 *WWTR1* 在 6 个特征基因中具有最高的 AUC 值（AUC＝0.960）。*RRM2*、*CTSB*、*SNCA*、*LCN2* 的 AUC 值分别为 0.920、0.840、0.800、0.920（图 3E）。以上结果表明，在白癜风患者和健康人之间 6 个特征基因都具有较好的鉴别价值。

2.3　关键基因的外部数据集验证

在 GSE75819 验证集中，WWTR1 在两组之间



A-GSE53146 数据集与铁死亡基因交集基因的韦恩图；B-交集基因的相关性分析；C-交集基因的表达水平箱线图；与健康人组比较：$^{*}P<0.05$ $^{**}P<0.01$。

A-Venn diagram of intersection genes between GSE53146 data set and iron death gene; B-correlation analysis of intersection gene; C-expression level boxplot of intersection gene; $^{*}P<0.05$ $^{**}P<0.01$ *vs* normal group.

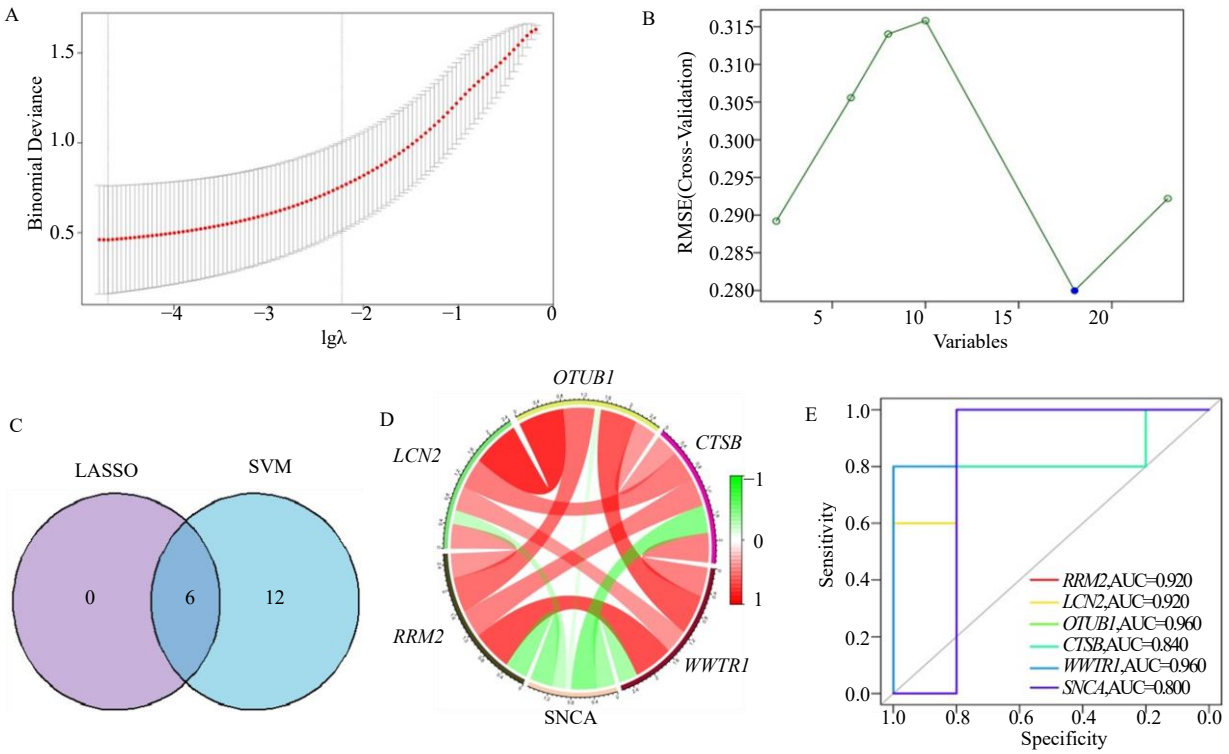
图 2 铁死亡基因的筛选及表达分析

Fig. 2 Screening and expression analysis of ferroptosis genes

表达无显著差异，RRM2、CTSB、OTUB1、SNCA、LCN2 基因的表达趋势与实验集中完全一致且差异具有显著性。与健康人组相比，白癜风患者的 RRM2、LCN2、OTUB1、CTSB 表达水平升高（$P<0.01$、0.001），而 *SCNA* 水平下降（$P<0.05$），见图 4。由于 *WWTR1* 在验证集中基因表达无差异，故在后面的分析中只针对有差异的 5 个关键基因。

2.4 关键基因在白癜风相关细胞群中表达

使用 Seurat 函数分析了数据集 GSE203262，并依据质量控制条件（nFeature_RNA＞200 & nFeature_

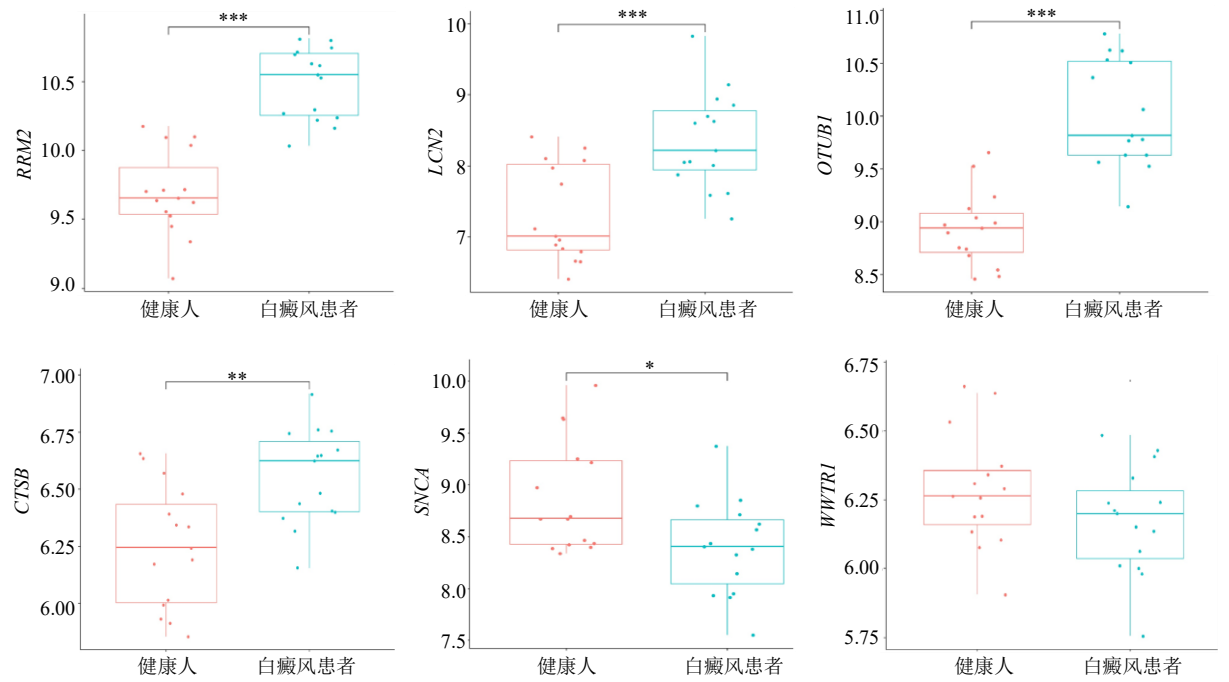


A-LASSO 算法构建机器学习模型；B-SVM-REF 机器学习模型；C-LASSO 与 SVM-REF 2 种机器学习模型交集基因的韦恩图；D-关键基因间相关性分析；E-关键基因的 ROC 曲线及 AUC 值。

A-LASSO algorithm builds machine learning model; B-SVM-REF machine learning model; C-Venn diagram of intersection genes of LASSO and SVM-REF machine learning models; D-correlation analysis between key genes; E-key gene ROC curve and AUC value.

图 3　关键基因的筛选与分析

Fig. 3　Screening and analysis of key genes



与健康人组比较：$^{*}P<0.05$　$^{**}P<0.01$　$^{***}P<0.001$。

$^{*}P<0.05$　$^{**}P<0.01$　$^{***}P<0.001$ *vs* normal group.

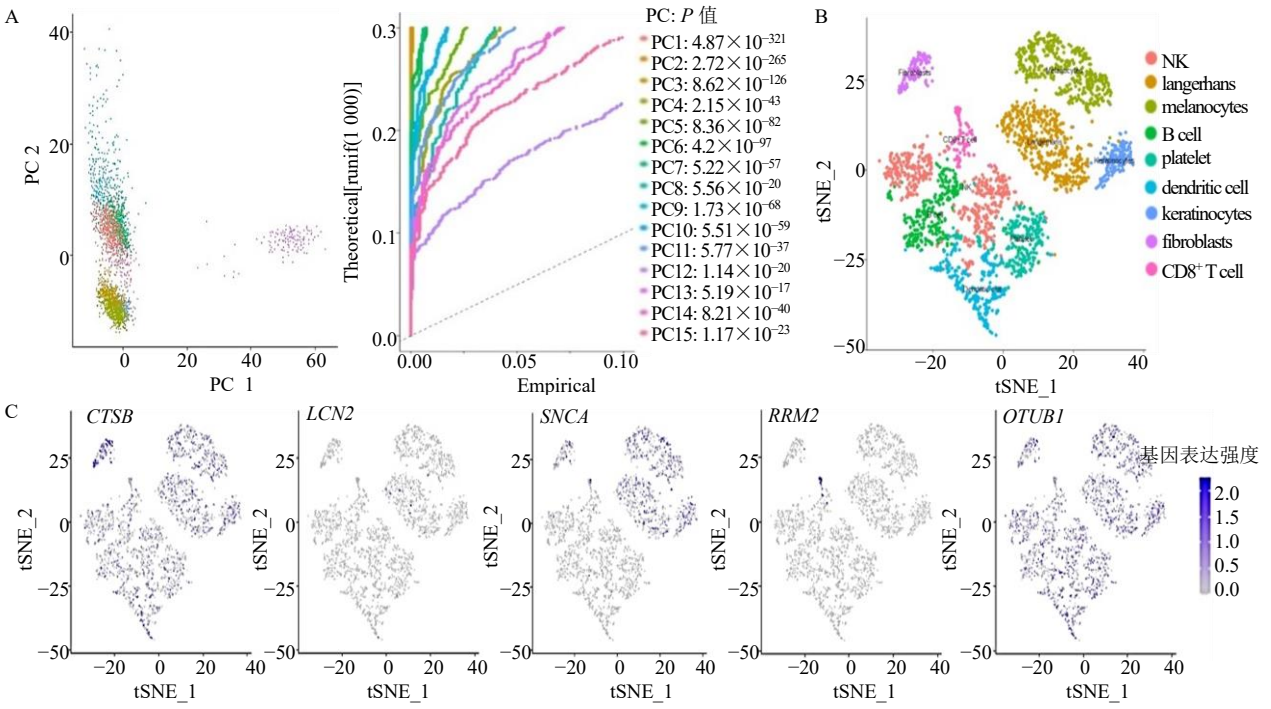
图 4　关键基因在验证集中的差异分析

Fig. 4　Differential analysis of key genes in the validation set

RNA＜2 500 & percent.mt＜5）从数据集中筛选 33 694 个细胞，细胞主成分分析如图 5A 所示。这些细胞被分类为 9 种主要细胞类型，包括 NK 细胞、朗格汉斯细胞、黑素细胞、B 细胞、血小板、树突状细胞、角质形成细胞和 $CD8^+$ T 细胞（图 5B）。随后在各细胞类型中对 *CTSB*、*LCN2*、*OTUB1*、*RRM2* 和 *SNCA* 基因进行富集标注。结果显示，白癜风患者皮肤样本中关键基因主要在成纤维细胞，角质形成细胞、黑素细胞和朗格汉斯细胞中。其中 *OTUB1* 在各种细胞中均被标注，说明其在白癜风发生发展过程中具有重要影响。此外，*CTSB* 主要在成纤维细胞中标注。*LCN2* 标注较弱几乎无表达。*RRM2* 主要标注在 $CD8^+$ T 细胞中，且富集结果具有高度特异性。成纤维细胞、角质形成细胞、黑素细胞和朗格汉斯细胞与 *SNCA* 高度相关（图 5C）。

2.5 关键基因蛋白表达验证

在 HPA 数据库中，对关键基因蛋白在正常人类皮肤细胞群（主要发现成纤维细胞、角质形成细胞、



A-GSE203262 数据集主成分分析；B-GSE203262 数据集单细胞聚类分析；C-关键基因在单细胞中的表达强度分析。

A-principal component analysis of GSE203262 dataset; B-single cell clustering analysis on the GSE203262 dataset; C-analysis of the expression intensity of key genes in single cells.

图 5 关键基因在白癜风发病相关细胞群中的表达情况

Fig. 5 Immunoinfiltration assessment of key genes in the single cell data set

朗格汉斯细胞和黑素细胞）中的表达分析发现，*CTSB*、*OTUB1* 在皮肤组织中表达最强，各细胞均能检测到而且细胞比例较高。*LCN2* 与 *RRM2* 几乎检测不到。而 *SNCA* 很特殊，其只在黑素细胞中表达水平高，染色强度强并且细胞占比均为 75%～25%，见图 6。

2.6 关键基因的免疫细胞相关性

关键基因与白癜风病灶微环境 23 个免疫细胞 Spearman 相关性分析表明 CTSB 与 gamma delta T 细胞和活化的树突状细胞呈显著正相关（图 7A）。LCN2 与 Th1 型辅助 T 细胞、自然杀伤细胞、巨噬细胞、活化的 CD8 T 细胞及肥大细胞呈显著正相关（图 7B）。OTUB1 与自然杀伤细胞、活化的 CD8 T 细胞、活化的 CD4 T 细胞、Th1 型辅助 T 细胞、$CD56^+$自然杀伤细胞、巨噬细胞及肥大细胞呈显著正相关（图 7C）。RRM2 与活化的 CD4 T 细胞、嗜酸性粒细胞、自然杀伤细胞及髓系抑制性细胞呈显著正相关，与效应性记忆 CD4 T 细胞呈显著负相关（图 7D）。此外，SNCA 是唯一一个与中性粒细胞具有相关性也是唯一一个几乎与所有的免疫细胞呈负相关的基因（图 7E）。

2.7 关键基因的潜在信号通路富集

通过对关键基因进行单基因 GSEA-KEGG 通路富集分析（图 8），发现这些基因主要涉及黏附分子、

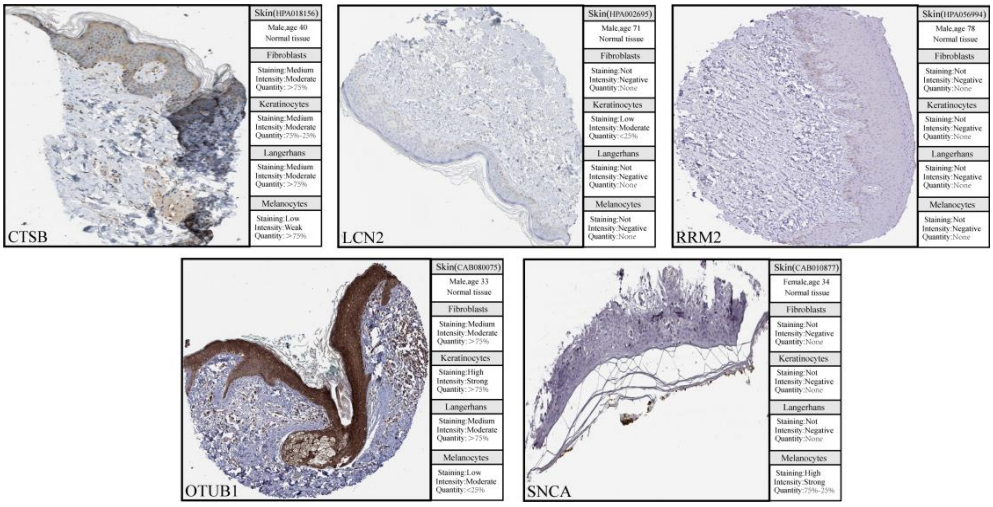


图 6　在 HPA 数据库中验证关键基因的蛋白表达情况

Fig. 6　Validation of protein expression of key genes in the HPA database

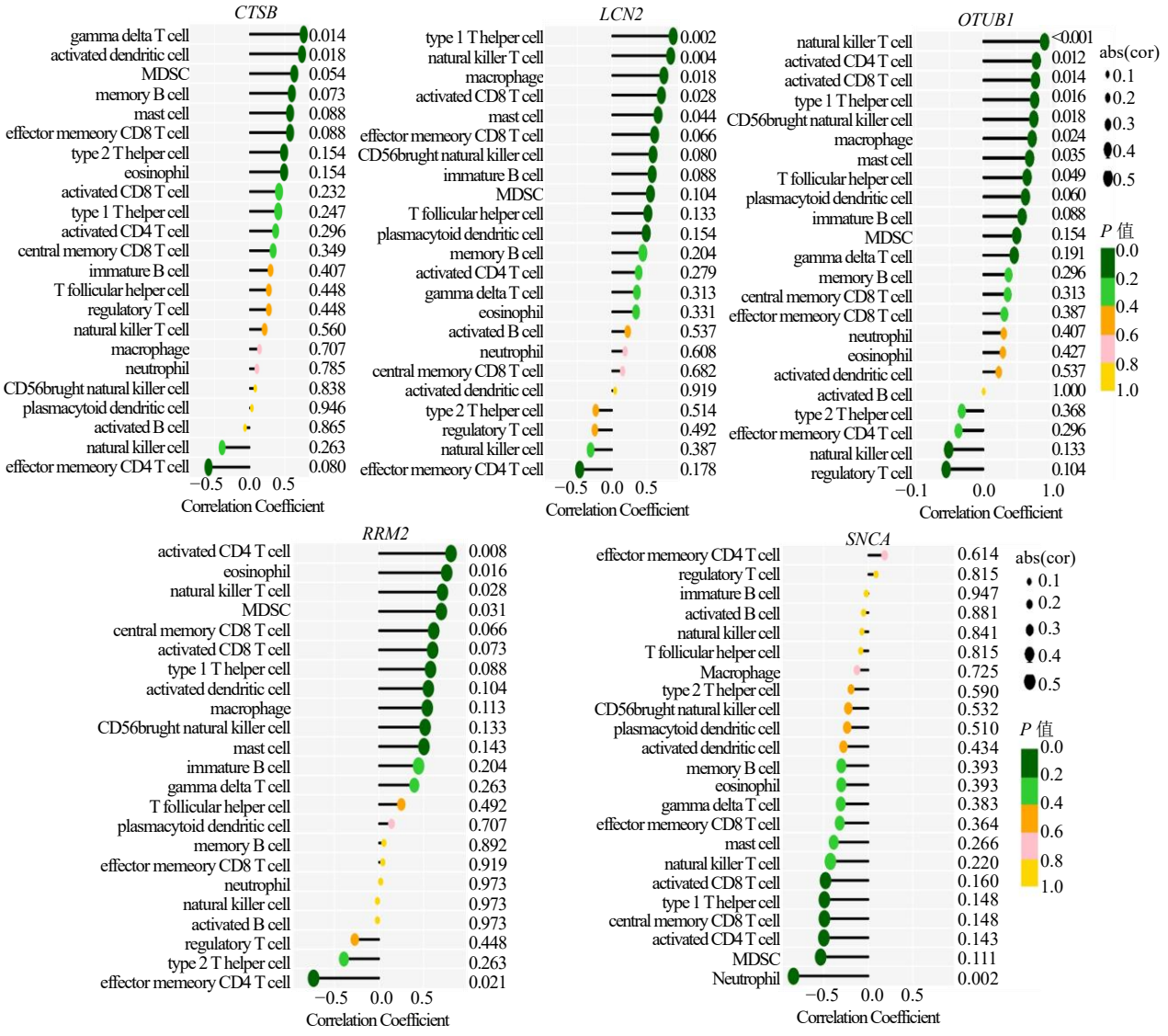


图 7　关键基因与免疫细胞的相关性分析

Fig. 7　Analysis of the correlation between key genes and immune cells infiltration

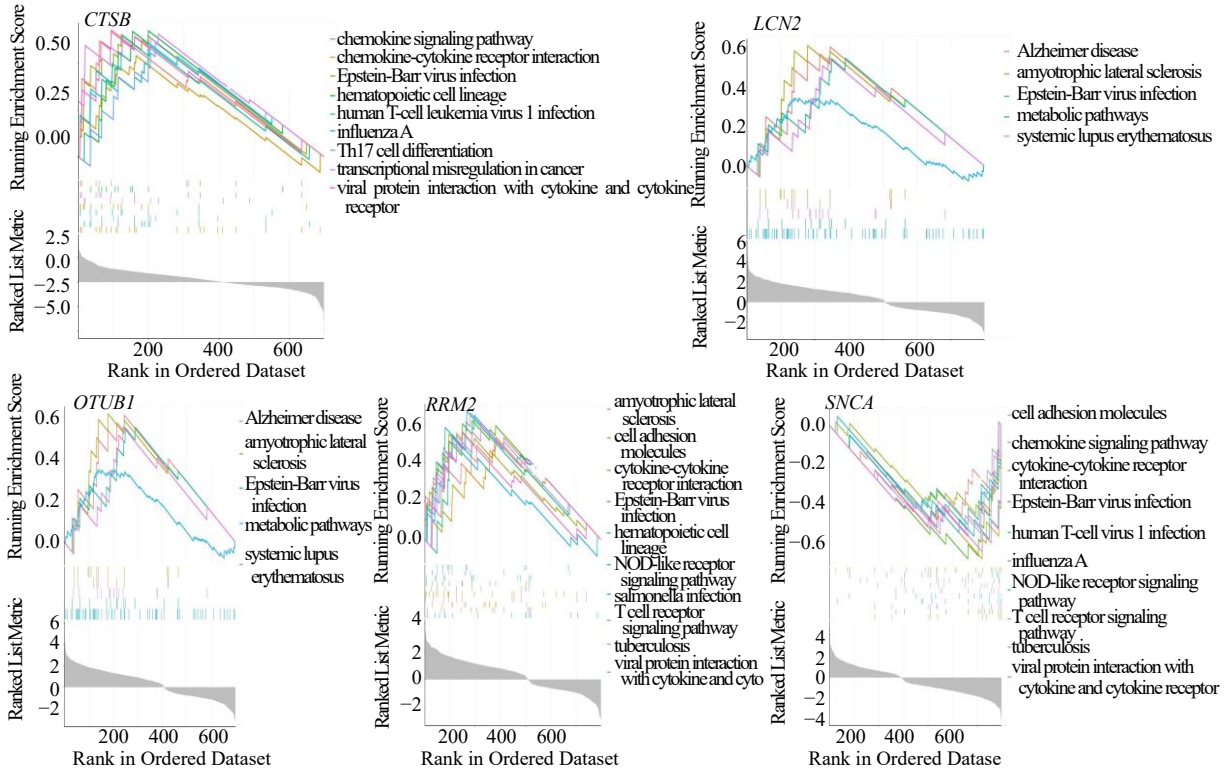


图 8　关键基因 *CTSB*、*LCN2*、*OTUB1*、*RRM2* 和 *SNCA* 的 GSEA-KEGG 分析

Fig. 8　GSEA-KEGG analysis of the key genes *CTSB*, *LCN2*, *OTUB1*, *RRM2* and *SNCA*

趋化因子、免疫反应（趋化因子及其受体相互作用、ECM-受体相互作用和 Th17 细胞分化）、细菌或病毒感染（沙门菌感染、结核杆菌感染、流感病毒和趋化因子与病毒蛋白相互作用）和各种疾病途径（阿尔兹海默病、系统性红斑狼疮、肌萎缩侧索硬化和人类Ⅰ型白血病）。此外，关键基因也富集在趋化因子信号通路、机体代谢信号通路、NOD 样受体信号通路和 T 细胞受体信号通路。同时，还发现趋化因子-趋化因子相互作用通路与 *CTSB*、*RRM2*、*SNCA* 3 个基因密切相关。同样，*LCN2* 和 *OTUB1* 2 个基因都与代谢通路密切相关，说明趋化因子相互作用及机体代谢在白癜风的发病及雷公藤甲素治疗中具有重要作用。

2.8　筛选通过铁死亡途径治疗白癜风的潜在药物

在 cMAP 数据库筛选的潜在药物中，将得分（norm_cs）＜−1 的化合物作为候选化合物，在排名前 30 位的成分中，选取具有明确化学结构式的雷公藤甲素[35]（相对分子质量 360.4，分子式 $C_{20}H_{24}O_6$）作为潜在药物，结构见图 9。

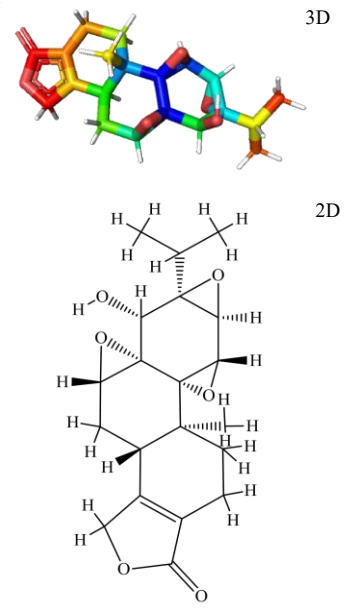


图 9　雷公藤甲素的药物结构

Fig. 9　Pharmacological structure of triptolide

2.9　雷公藤甲素与潜在靶点分子对接验证

潜在靶点 CTSB（PDB:8b5f）、LCN2（PDB:3bx8）、OTUB1（PDB:4dhi）、RRM2（PDB:3bs9）和 SNCA（PDB:4bxl）与雷公藤甲素（PubChem CID:107985）的分子对接结果如表 1、图 10 所示。结合

能越低，配体与受体结合的构象就越稳定，产生作用的可能性就越大[36]。通过分子对接结果可以看出，雷公藤甲素对 5 个潜在核心靶点的结合能力较强，从而提示其有望通过铁死亡途径治疗白癜风相关疾病。

表 1　雷公藤甲素与潜在靶点的分子对接

Table 1　Molecular docking information for triptolide and potential targets

潜在靶点	PDB ID	结合能/(kcal·mol^{-1})
CTSB	8b5	−6.87
LCN2	3bx8	−4.41
OTUB1	4dhi	−5.41
RRM2	3bs9	−6.17
SNCA	4bxl	−7.23

3　讨论

铁死亡为铁依赖性脂质过氧化导致机体氧化还原失衡所介导的细胞死亡模式。在白癜风的研究中，与健康人组相比白癜风患者的血清中检测到花生四烯酸降低，这可能增加白癜风局部被 CD8$^+$ T 细胞浸润及破坏黑素细胞的风险[37]。另外，铁死亡关键因子 GPX4 在白癜风患者皮肤中表达降低，但在健康人组皮肤的各个表皮层中表现出高表达[38]，这可能是白癜风局部铁死亡敏感性高和抗氧化能力弱的主要原因。然而，关于铁死亡在白癜风发病中是否占据着重要地位，研究甚少。

本研究共筛选了 *CTSB*、*LCN2*、*OTUB1*、*RRM2*、*SNCA* 5 个铁死亡基因进行一系列分析。其中 RRM2 是核糖核苷酸还原酶的催化亚基，它在增殖、迁移和血管生成等细胞过程中起重要作用[39-40]。研究表

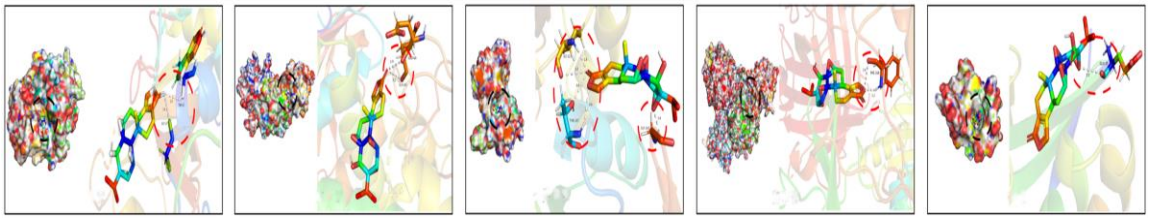


图 10　雷公藤甲素与潜在靶点的分子对接示意图

Fig. 10　Schematic diagram of molecular docking of triptolide with potential targets

明，RRM2 的过表达激活 NF-κB 通路并增加了胰腺癌细胞、乳腺癌细胞的侵袭、迁移[41-42]。而 NF-κB 通路也参与白癜风的发病，研究发现 NF-κB 信号激活可促进白细胞介素（IL）-15、CXCL10 和 IL-1β 的分泌，进而促进 CD8$^+$ T 细胞的活化和诱导白癜风的适应性免疫。此外，表皮中过量的 CXCL10 在 CD8$^+$ T 细胞的招募及黑素细胞杀伤中起关键性作用[43]。LCN2 是一种糖蛋白，可通过激活炎症途径或调节细胞铁稳态来调节细胞反应。研究发现，MPTP 中毒而引发的帕金森综合征小鼠模型中铁的积累使星形胶质细胞分泌 LCN2 增加导致多巴胺神经元变性[44]。相关研究也发现在星形胶质细胞中 NF-κB 信号的激活，能够调节 LCN2 分泌和 LCN2 诱导脑中风的铁死亡[45]。因此，推测在白癜风病变中铁死亡基因 *RRM2* 上调导致 NF-κB 信号被激活，CXCL10 与 IL-1β 释放增多，招募 CD8$^+$ T 免疫细胞局部浸润从而杀伤黑素细胞，同时 NF-κB 信号激活也使 LCN2 上调并诱导病变局部铁死亡，一方面使黑素细胞死亡，另一方面进一步增强 RRM2 的表达。

OTUB1 是一种去泛素化酶，影响细胞代谢、分化、增殖和凋亡，被称为是免疫细胞活性和炎症反应的重要调节剂[46]。在以往研究中发现，OTUB1 在多发性硬化症、支气管哮喘、肺癌、食管癌等多种疾病中有重要免疫调节作用[47-48]；在多发性硬化症中，OTUB1 直接抑制 *STAT1* mRNA 产生，还可以通过稳定 SOCS1 间接抑制 IFN-γ 诱导的 JAK/STAT1 信号传导[49]。在体外实验中，OTUB1 缺乏能增加 IFN-γ 诱导的星形胶质细胞趋化因子（CXCL10、CXCL11、CCL2）和促炎分子（NOS2）的产生[50]。在白癜风研究中，IFN-γ 激活成纤维细胞中 JAK/STAT1 通路使趋化因子 CXCL9/10 分泌是 CD8$^+$ T 免疫细胞在黑素细胞周围募集并杀伤细胞的关键一环[51]。在本研究中发现，白癜风病变皮肤中 OTUB1 表达上调，可能是机体产生的免疫保护作用。OTUB1 上调抑制 JAK/STAT1 信号传导，抑制 CXCL9/10 产生的免疫细胞招募能力，减少 CD8$^+$ T 在病变局部的浸润，从而避免黑素细胞的死亡。

关键基因 GSEA-KEGG 通路分析发现，趋化因

子相互作用通路和 NOD 样受体信号通路与关键基因密切相关。趋化因子是由多种免疫细胞分泌的重要的炎症介质，其可以招募 $CD8^+$ T 免疫细胞在黑素细胞周围募集，从而杀伤细胞使黑色素产生障碍[52]。NOD 样受体是细胞内受体，可以激活各种相关途径，以增加促炎细胞因子（如 IFN-γ、IL-1、IL-6 和 TNF）的产生。细胞因子的产生能增加免疫细胞反应并激活非特异免疫系统[53]。

Connectivity Map（cMAP）数据库是由哈佛、剑桥大学和麻省理工学院研究人员通过不同干扰物（包括小分子）处理人类细胞后检测基因表达差异所构建的生物应用数据库。研究团队认为以基因表达谱建立的基因与药物的关联性，可协助研究者快速利用基因表达数据比对出与基因高相关性的药物、并推论出药物分子的主要结构。本研究基于“新机制－老药”研究思路，通过 cMAP 数据库筛选出影响 5 个潜在靶点的潜在药物。分子对接结果表明，雷公藤甲素对 5 个潜在靶点的结合较强，说明该小分子与筛选出的铁死亡相关靶点和通路之间存在高度关联性，其有望成为通过铁死亡途径治疗白癜风药物。目前相关研究也表明，雷公藤甲素在皮肤病与自身免疫性疾病的治疗方面具有很大潜力[53-54]。

白癜风发病机制复杂且不明确，导致对其治愈十分困难，因此阐明白癜风的发病机制对其根治尤为重要。本研究采用生物信息学方法从铁死亡的角度筛选了白癜风发病的 5 个关键基因，并采用多种数据评估了 5 个铁死亡基因与病变部位细胞群潜在联系，所得结果可靠性强。除此之外，还筛选雷公藤甲素作为铁死亡途径治疗白癜风小分子药物。所采用的“新机制－老药”研究思路，不仅可以大大降低药物研发中因不良反应所导致的失败，也为临床上老药的重新应用提供了新的方向。本研究为白癜风的发病及治疗研究提供了新的视角，适合在其他疾病研究中推广，通过新的机制与老药的结合研究，将会为临床更快地研发治疗疑难疾病的药物提供参考方案。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] Frisoli M L, Essien K, Harris J E. Vitiligo: Mechanisms of pathogenesis and treatment [J]. *Annu Rev Immunol*, 2020, 38: 621-648.

[2] Lyu C, Sun Y H. Immunometabolism in the pathogenesis of vitiligo [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 1055958.

[3] Spritz R A, Santorico S A. The genetic basis of vitiligo [J]. *J Invest Dermatol*, 2021, 141(2): 265-273.

[4] Khaitan B K, Sindhuja T. Autoimmunity in vitiligo: Therapeutic implications and opportunities [J]. *Autoimmun Rev*, 2022, 21(1): 102932.

[5] Dixon S J, Lemberg K M, Lamprecht M R, *et al*. Ferroptosis: An iron-dependent form of nonapoptotic cell death [J]. *Cell*, 2012, 149(5): 1060-1072.

[6] Wang F, He J Y, Xing R X, *et al*. Molecular mechanisms of ferroptosis and their role in inflammation [J]. *Int Rev Immunol*, 2023, 42(1): 71-81.

[7] Battaglia A M, Chirillo R, Aversa I, *et al*. Ferroptosis and cancer: Mitochondria meet the “iron maiden” cell death [J]. *Cells*, 2020, 9(6): 1505.

[8] Wang Y H, Li S L, Li C Y. Perspectives of new advances in the pathogenesis of vitiligo: From oxidative stress to autoimmunity [J]. *Med Sci Monit*, 2019, 25: 1017-1023.

[9] Li S L, Zhu G N, Yang Y Q, *et al*. Oxidative stress drives $CD8^+$ T-cell skin trafficking in patients with vitiligo through CXCL16 upregulation by activating the unfolded protein response in keratinocytes [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2017, 140(1): 177-189.

[10] Ahn Y, Seo J Y, Lee E J, *et al*. ATP-P2X7-induced inflammasome activation contributes to melanocyte death and CD8+ T-cell trafficking to the skin in vitiligo [J]. *J Invest Dermatol*, 2020, 140(9): 1794-1804.

[11] Wu X Y, Yang Y W, Xiang L H, *et al*. The fate of melanocyte: Mechanisms of cell death in vitiligo [J]. *Pigment Cell Melanoma Res*, 2021, 34(2): 256-267.

[12] Xuan Y J, Yang Y W, Xiang L H, *et al*. The role of oxidative stress in the pathogenesis of vitiligo: A culprit for melanocyte death [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2022, 22: 8498472.

[13] Xu Z J, Chen D M, Hu Y C, et al. Anatomically distinct fibroblast subsets determine skin autoimmune patterns [J]. *Nature*, 2022, 601(7891): 118-124.

[14] 林光美, 张敏, 侯长红. 雷公藤研究进展 [J]. 中国农学通报, 2009, 25(23): 90-93.

[15] 王爱民, 程宏学. 雷公藤在皮肤科的应用 [J]. 现代中西医结合杂志, 2007(22): 3219.

[16] Han R, Rostami-Yazdi M, Gerdes S, *et al*. Triptolide in the treatment of psoriasis and other immune-mediated inflammatory diseases [J]. *Br J Clin Pharmacol*, 2012, 74(3): 424-436.

[17] Tu H Q, Li X Y, Gu H, *et al*. Triptolide inhibits IFN-γ signaling via the Jak/STAT pathway in HaCaT keratinocytes [J]. *Phytother Res*, 2011, 25(11): 1678-1685.

[18] Chen X G, Guo W N, Chang Y Q, *et al*. Oxidative stress-

induced IL-15 trans-presentation in keratinocytes contributes to $CD8^+$ T cells activation via JAK-STAT pathway in vitiligo [J]. *Free Radic Biol Med*, 2019, 139: 80-91.

[19] 符珊珊, 封杰妮, 黎祖鸣, 等. 基于生物信息学探讨胃癌相关基底膜基因及中药预测 [J]. 中草药, 2023, 54(15): 4948-4957.

[20] Davis S, Meltzer P S. GEOquery: A bridge between the Gene Expression Omnibus (GEO) and BioConductor [J]. *Bioinformatics*, 2007, 23(14): 1846-1847.

[21] Ritchie M E, 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.

[22] Friedman J, Hastie T, Tibshiran R. Regularization paths for generalized linear models via coordinate descent [J]. *J Stat Softw*, 2010, 33(1): 1-22.

[23] Tibshiran R. Regression shrinkage and selection via the LASSO [J]. *JRSSB*, 1996, 58(1): 267-288.

[24] Karatzoglou A, Smola A, Hornik K. Kernlab-an S4 package for kernel methods in R [J]. *J Stat Softw*, 2004, 69: 721-729.

[25] Noble W S. What is a support vector machine? [J]. *Nat Biotechnol*, 2006, 24: 1565-1567.

[26] Gu Z G, Gu L, Eils R, *et al*. Circlize implements and enhances circular visualization in R [J]. *Bioinformatics*, 2014, 30(19): 2811-2812.

[27] Butler A, Hoffman P, Smibert P, *et al*. Integrating single-cell transcriptomic data across different conditions, technologies, and species [J]. *Nat Biotechnol*, 2018, 36(5): 411-420.

[28] Narayan A, Berger B, Cho H. Assessing single-cell transcriptomic variability through density-preserving data visualization [J]. *Nat Biotechnol*, 2021, 39(6): 765-774.

[29] Aran D，Looney A P, Liu L Q, *et al*. Reference-based analysis of lung single-cell sequencing reveals a transitional profibrotic macrophage [J]. *Nat Immunol*, 2019, 20(2): 163-172.

[30] Hänzelmann S, Castelo R, Guinney J. GSVA: Gene set variation analysis for microarray and RNA-seq data [J]. *BMC Bioinformatics*, 2013, 14: 7.

[31] Berman H M, Westbrook J, Feng Z, *et al*. The protein data bank [J]. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28(1): 235-242.

[32] Morris G M, Huey R, Lindstrom W, *et al*. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility [J]. *J Comput Chem*, 2009, 30(16): 2785-2791.

[33] Kim S, Chen J, Cheng T J, *et al*. PubChem 2019 update: Improved access to chemical data [J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(D1): D1102-D1109.

[34] O'Boyle N M, Banck M, James C A, *et al*. Open Babel: An open chemical toolbox [J]. *J Cheminform*, 2011, 3: 33.

[35] Chen B J. Triptolide, a novel immunosuppressive and anti-inflammatory agent purified from a Chinese herb *Tripterygium wilfordii* Hook F [J]. *Leuk Lymphoma*, 2001, 42(3): 253-265.

[36] Hsin K Y, Ghosh S, Kitano H. Combining machine learning systems and multiple docking simulation packages to improve docking prediction reliability for network pharmacology [J]. *PLoS One*, 2013, 8(12): e83922.

[37] Zhang D F, Li Y D, Du C Y, *et al*. Evidence of pyroptosis and ferroptosis extensively involved in autoimmune diseases at the single-cell transcriptome level [J]. *J Transl Med*, 2022, 20(1): 363.

[38] Ye Z B, Chen J R, Du P R, *et al*. Metabolomics signature and potential application of serum polyunsaturated fatty acids metabolism in patients with vitiligo [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 839167.

[39] Ma C, Luo H, Cao J, *et al*. Independent prognostic implications of *RRM2* in lung adenocarcinoma [J]. *J Cancer*, 2020, 11(23): 7009-7022.

[40] Zhuang S J, Li L, Zang Y W, *et al*. RRM2 elicits the metastatic potential of breast cancer cells by regulating cell invasion, migration and VEGF expression via the PI3K/AKT signaling [J]. *Oncol Lett*, 2020, 19(4): 3349-3355.

[41] Duxbury M S, Whang E E. RRM2 induces NF-kappaB-dependent MMP-9 activation and enhances cellular invasiveness [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 354(1): 190-196.

[42] Shah K N, Wilson E A, Malla R, *et al*. Targeting ribonucleotide reductase M2 and NF-κB activation with didox to circumvent tamoxifen resistance in breast cance r[J]. *Mol Cancer Ther*, 2015, 14(11): 2411-2421.

[43] Chen X G, Guo W N, Chang Y Q, *et al*. Oxidative stress-induced IL-15 trans-presentation in keratinocytes contributes to $CD8^+$ T cells activation via JAK-STAT pathway in vitiligo [J]. *Free Radic Biol Med*, 2019, 139: 80-91.

[44] Kim B W, Jeong K H, Kim J H, *et al*. Pathogenic upregulation of glial lipocalin-2 in the Parkinsonian dopaminergic system [J]. *J Neurosci*, 2016, 36(20): 5608-5622.

[45] Liu R J, Wang J, Chen Y, *et al*. NOX activation in reactive astrocytes regulates astrocytic LCN2 expression and neurodegeneration [J]. *Cell Death Dis*, 2022, 13(4): 371.

[46] Saldana M, VanderVorst K, Berg A L, *et al*. Otubain 1: A non-canonical deubiquitinase with an emerging role in cancer [J]. *Endocr Relat Cancer*, 2019, 26(1): R1-R14.

[47] Tan L L, Shan H Y, Han C, *et al*. Discovery of potent OTUB1/USP8 dual inhibitors targeting proteostasis in non-small-cell lung cancer [J]. *J Med Chem*, 2022, 65(20): 13645-13659.

[48] Sun J, Deng Y, Shi J, *et al*. MicroRNA-542-3p represses OTUB1 expression to inhibit migration and invasion of esophageal cancer cells [J]. *Mol Med Rep*, 2020, 21(1): 35-42.

[49] Wang X, Mulas F, Yi W J, *et al*. OTUB1 inhibits CNS autoimmunity by preventing IFN-γ-induced hyperactivation of astrocytes [J]. *EMBO J*, 2019, 38(10): e100947.

[50] Kang Z Z, Altuntas C Z, Gulen M F, *et al*. Astrocyte-restricted ablation of interleukin-17-induced Act1-mediated signaling ameliorates autoimmune encephalomyelitis [J]. *Immunity*, 2010, 32(3): 414-425.

[51] Shiu J, Zhang L H, Lentsch G, *et al*. Multimodal analyses of vitiligo skin identify tissue characteristics of stable disease [J]. *JCI Insight*, 2022, 7(13): e154585.

[52] Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen pecognition and innate immunity [J]. *Cell*, 2006, 24:783-801.

[53] Han R, Rostami-Yazdi M, Gerdes S, *et al*. Triptolide in the treatment of psoriasis and other immune-mediated inflammatory diseases [J]. *Br J Clin Pharmacol*, 2012, 74(3): 424-436.

[54] Liu X Y, Pei W J, Wu Y Z, *et al*. Transdermal delivery of triptolide-phospholipid complex to treat rheumatoid arthritis [J]. *Drug Deliv*, 2021, 28(1): 2127-2136.

[责任编辑 高源]