

## • 数据挖掘与循证医学 •

## 血管性痴呆铜死亡关键差异基因的生物信息学分析及防治中药筛选

卓桂锋<sup>1,2</sup>, 陈 炜<sup>2</sup>, 朱健敏<sup>1</sup>, 匡龙娇<sup>1</sup>, 廖乃彬<sup>2</sup>, 张金枝<sup>2</sup>, 苏明阳<sup>2</sup>, 吴 林<sup>1,3\*</sup>

1. 广西中医药大学 科学实验中心, 广西 南宁 530022

2. 广西中医药大学第一临床医学院, 广西 南宁 530022

3. 广西中医药大学 广西中医基础研究重点实验室, 广西 南宁 530022

**摘要:** 目的 通过机器学习等生物信息学方法筛选参与血管性痴呆 (vascular dementia, VaD) 发病机制的铜死亡关键差异表达基因 (differentially expressed genes, DEGs), 并预测和分析具有防治作用的中药。方法 基于 GSE33000 数据集筛选铜死亡 DEGs 并分析其相关性; 对数据集样本进行聚类分型, 应用基因集变异分析 (gene set variation analysis, GSVA) 分型后通路富集情况; 应用加权基因共表达网络分析与 VaD 关系密切的基因并取交集获得重要基因; 构建风险预测列线图模型筛选重要基因的风险因子; 基于风险因子构建多种机器学习方法的预测模型并将其与铜死亡 DEGs 进行相关性分析得到关键基因, 并进行防治中药的筛选。结果 共获得铜转运 ATP 酶  $\beta$  (ATPase copper transporting beta, *ATP7B*)、硫辛酸合成酶 (lipoic acid synthetase, *LIAS*) 等 9 个铜死亡 DEGs, 其相互之间表现出较强的协同或拮抗效应。根据铜死亡 DEGs 可将 VaD 患者分为 2 种亚型且 DEGs 在亚型间表达有所差异。分型后 GSVA 通路富集结果涉及刺猬信号通路等; 绿松石模块 (37 个差异基因) 与 VaD 分型高度相关, 其与数据集 DEGs 交集得到 5 个重要基因, 其中 *XLOC\_005471* 可能是 VaD 的风险因子。广义线性模型 (generalized linear models, GLM) 机器学习模型的预测性能最高。脂酰基转移酶 2 (lipoyltransferase 2, *LIPT2*)、二氢脂酰胺 *S*-乙酰基转移酶 (dihydrolipoamide *S*-acetyltransferase, *DLAT*)、二氢硫辛酰胺脱氢酶 (dihydrolipoamide dehydrogenase, *DLD*)、丙酮酸脱氢酶 E1 亚基  $\beta$  (pyruvate dehydrogenase E1 subunit beta, *PDHB*) 与金属调节转录因子 1 (metal regulatory transcription factor 1, *MTF1*) 与风险因子相关性较强, 可作为铜死亡关键 DEGs, 其中 *MTF1*、*PDHB* 的表达与 VaD 患者年龄负相关 ( $P < 0.01$ )。根据铜死亡 DEGs 筛选出海蛤壳、鱼鳔胶等 29 味中药, 其四气五味多属寒、温、平, 苦、甘, 归胃、肾、心、肝经, 多为清热补虚药。结论 *ATP7B*、*LIAS* 等 9 个铜死亡 DEGs 相互调控作用及其相关的刺猬信号通路可能是 VaD 铜死亡相关发病机制的重要环节, 其中 *LIPT2*、*DLAT*、*DLD*、*PDHB* 与 *MTF1* 是铜死亡关键基因。GLM 机器学习模型可以较准确诊断 VaD。*ATP7B*、*LIAS* 等铜死亡 DEGs 可能有助于阐释 VaD 火热内盛伴有气虚或肾精亏虚证型的实质机制, 海蛤壳、鱼鳔胶等中药可能为防治 VaD 潜在分子药物的来源。

**关键词:** 血管性痴呆; 铜死亡; 清热补虚药; 证候实质; 机器学习; 广义线性模型; 海蛤壳; 鱼鳔胶

中图分类号: R285; Q811.4 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)21-7120-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.21.021

## Bioinformatics analysis of cuproptosis in vascular dementia and screening of traditional Chinese medicine for prevention and treatment

ZHUO Gui-feng<sup>1,2</sup>, CHEN Wei<sup>2</sup>, ZHU Jian-min<sup>1</sup>, KUANG Long-jiao<sup>1</sup>, LIAO Nai-bin<sup>2</sup>, ZHANG Jin-zhi<sup>2</sup>, SU Ming-yang<sup>2</sup>, WU Lin<sup>1,3</sup>

1. Science Experiment Center, Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanning 530022, China

2. The First Clinical Faculty of Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530022, China

3. Guangxi Key Laboratory of Basic Research of Traditional Chinese Medicine, Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanning 530022, China

**Abstract: Objective** Key cuproptosis differentially expressed genes (DEGs) involved in the pathogenesis of vascular dementia (VaD)

收稿日期: 2023-08-16

基金项目: 国家自然科学基金项目 (82160885); 广西中医药大学研究生教育创新计划项目 (YCSW2023384); 广西中医药大学 2015 年广西中医基础研究重点实验室项目 (KJT15007); 广西中医脑病临床研究中心项目 (桂科 AD20238028); 广西高等学校高水平创新团队及卓越学者计划 (桂教人才 (2020) 6 号); 广西中医药大学第一附属医院学术团队建设项目 (院字 [2018]146); 广西中医药大学重点学科建设项目 (GZXK-Z-20-13)

作者简介: 卓桂锋, 博士研究生, 研究方向为中医药防治脑系疾病。E-mail: 12942105@qq.com

\*通信作者: 吴 林, 博士研究生导师, 教授, 从事中医药防治脑系疾病研究。E-mail: 358304005@qq.com

were selected by machine learning and other bioinformatics methods. Differentially expressed genes (DEGs) were analyzed. **Methods** Cuproptosis DEGs were screened based on GSE33000 data set and their correlation was analyzed. Pathway enrichment was performed by cluster typing and gene set variation analysis (GSVA). The weighted gene co-expression network was used to analyze the genes closely related to VaD and the intersection was used to obtain the important genes. The risk prediction nomogram model was constructed to screen the risk factors of important genes. Based on the risk factors, a variety of predictive models of machine learning methods were constructed, and the correlation analysis between them and copper death DEGs was carried out to obtain key genes, and clinical correlation analysis and screening of prevention and treatment of traditional Chinese medicine were carried out. **Results** A total of nine cuproptosis DEGs including ATPase copper transporting beta (*ATP7B*) and lipoic acid synthetase (*LIAS*) were obtained. DEGs showed strong synergistic or antagonistic effect between them. According to cuproptosis DEGs, VaD patients could be divided into two subtypes and the expression of DEGs was different among the subtypes. The enrichment results of GSVA pathway after typing involved hedgehog signaling pathway, etc. The turquoise module (37 differential genes) was highly correlated with VaD typing, and its intersection with the dataset differential genes resulted in five important genes, among which *XLOC\_005471* may be a risk factor for VaD. The prediction performance of generalized linear models (GLM) machine learning model is the highest. Lipoyltransferase 2 (*LIPT2*), dihydrolipoamide *S*-acetyltransferase (*DLAT*), dihydrolipoamide dehydrogenase (*DLD*), pyruvate dehydrogenase E1 subunit beta (*PDHB*) and metal regulatory transcription factor 1 (*MTF1*) were strongly correlated with risk factors, and could be used as key DEGs for cuproptosis. The expressions of *MTF1* and *PDHB* were negatively correlated with the age of VaD patients ( $P < 0.01$ ). According to cuproptosis death DEGs, 29 traditional Chinese medicines such as sea clam shells, ichthyocolla were screened, and their four properties and five flavors were mainly cold, warm and flat, bitter, and sweet, and belonged to the stomach, kidney, heart, liver channels and clearing heat and tonifying deficiency. **Conclusion** *ATP7B*, *LIAS* and other 9 cuproptosis DEGs regulate each other and their related hedgehog signaling pathways may be an important link in the pathogenesis of cuproptosis in VaD, among which *LIPT2*, *DLAT*, *DLD*, *PDHB* and *MTF1* are key cuproptosis genes. GLM machine learning model can accurately diagnose VaD. *ATP7B*, *LIAS* and other cuproptosis DEGs may help to explain the parenteral mechanism of VaD fire-heat internalization accompanied by *qi* deficiency or kidney essence deficiency syndrome. Sea clam shells, ichthyocolla, and other traditional Chinese medicines may be sources of potential molecular drugs to combat VaD.

**Key words:** vascular dementia; cuproptosis; heat-clearing and deficiency-tonifying medicine; syndrome parenchyma; machine learning; generalized linear models; sea clam shell; ichthyocolla

血管性痴呆 (vascular dementia, VaD) 以进行性认知功能障碍为特征, 通常被认为是老年人中仅次于阿尔茨海默病的第 2 大常见的痴呆症类型<sup>[1]</sup>。VaD 可导致生活质量持续和不可逆转的恶化, 给家庭和社会带来了巨大的医疗和经济负担。然而, 由于 VaD 的临床异质性和病理类型的复杂性, 其发病机制仍未阐明, 亦缺乏安全有效的防治手段。

铜离子作为酶的辅助因子, 其稳态的维持主要依赖于线粒体的调节。铜稳态失调已被证明与神经退行性疾病有关<sup>[2]</sup>。铜死亡是最近发现的一种新的不同于其他氧化应激调节的细胞死亡形式。以铜参与的脂酰化线粒体酶过度累积和铁-硫簇蛋白消耗为特征的线粒体应激是引起铜死亡的主要机制<sup>[3-4]</sup>。同时, 研究表明线粒体功能障碍和氧化应激可能是 VaD 进展的关键发病机制<sup>[5]</sup>。因此, 有理由推断铜死亡与 VaD 的病程进展密切相关。然而, 目前尚未有从铜死亡角度探讨 VaD 的发病机制研究。进一步阐明铜死亡相关基因 (cuproptosis-related genes, CRGs) 的分子特征, 可能有助于阐明 VaD 病理类型的复杂性和发病机制和探索有效防治手段。

## 1 材料与方法

### 1.1 数据采集和预处理

以“vascular dementia”为关键词, 检索 GEO 数据库, 根据数据集提供的相关信息, 获得所需芯片 GSE122063。GSE122063 共有 80 个样本, 其中包含 36 个 VaD 患者和 44 个健康人的样本 (正常), 样本来源于人大脑皮层。注释数据后通过“limma”R 包对 GSE122063 的原始基因表达谱进行标准化校正得到 normalize.txt。

### 1.2 铜死亡差异表达基因 (differentially expressed genes, DEGs) 的筛选

根据文献报道<sup>[6-7]</sup>获得 19 个铜死亡相关基因文本 gene.txt。利用“limma”“pheatmap”“reshape2”“ggpubr”和“RCircos”R 包对 normalize.txt 和 gene.txt 进行分析, 获取铜死亡相关基因表达量的文本 CuproptosisGeneExp.txt, 通过 wilcox.test 检验<sup>[8]</sup>, 以校正后的  $P < 0.05$  为阈值筛选铜死亡相关 DEGs, 进行可视化处理, 输出箱线图。

### 1.3 铜死亡 DEGs 相关性分析

为进一步研究铜死亡 DEGs 的相互关系, 利用

“corrplot”和“circlize”R包对其进行分析，最后进行可视化处理。

#### 1.4 样品聚类分型

基于铜死亡 DEGs 使用“ConsensusClusterPlus”R包对数据集中的样本进行分型，使用“pheatmap”“reshape2”和“ggpubr”R包对分型结果进行分析，并构建亚型箱图和热图。为观察各亚型样本内部的相似性和不同分型样本之间的区分度，使用“limma”和“ggplot2”R包对分型结果进行分析，并绘制主成分分析（principal component analysis, PCA）散点图。

#### 1.5 分型后基因集变异分析（gene set variation analysis, GSVA）通路富集分析

基于“1.4”项的分型结果，对 normalize.txt 进行 GSVA 通路富集分析，筛选出校正后  $P < 0.05$  且上调或下调显著性前 5 名的通路，并绘制柱状图。

#### 1.6 加权基因共表达网络分析（weighted gene co-expression network analysis, WGCNA）

基于分型结果与 normalize.txt，使用“WGCNA”R包进行 WGCNA 以识别共表达模块。方差最高的前 25% 基因用于后续 WGCNA，以保证质量结果的准确性。选择满足无尺度网络的标准软阈值  $\beta$  构建基因共表达网络，转化拓扑重叠矩阵（topological overlap matrix, TOM）。当最小模块大小设置为 100 时，采用基于层次聚类树算法的 TOM 不相似度量（1-TOM）获得模块。以基因与模块相关性  $> 0.8$ ，基因显著性  $< 0.05$  为条件筛选模块内核心基因。

#### 1.7 重要基因的筛选

利用“limma”等包对 normalize.txt 进行分析，以  $|\log_2FC| \geq 1$  且校正后  $P < 0.05$  为筛选条件，获取 GSE122063 的 DEGs 并与“1.6”项筛选出来的临床性状模块核心基因取交集得到重要基因。

#### 1.8 构建风险预测列线图模型

基于重要基因和 normalize.txt，采用“rms”和“rmda”R包构建列线图模型，筛选风险因子，绘制决策曲线以评价该列线图模型的临床有效性。

#### 1.9 基于多种机器学习方法的预测模型构建

基于“1.8”项结果中的风险因子，将 GSE122063 数据集数据按 7:3 分为训练组和测试组，训练组用于分类模型的构建，测试组用于验证模型的准确性。利用“caret”“DALEX”“ggplot2”“randomForest”“kernlab”和“xgboost”R包构建极限梯度上升（eXtreme gradient boosting, XGB）模型、广义线性

模型（generalized linear models, GLM）、随机森林（random forest, RF）模型和支持向量机（support vector machine, SVM）模型，并对共风险因子进行分析，得到 4 种模型的残差箱线图，采用“pROC”包绘制受试者工作特征（receiver operating characteristic, ROC）曲线，根据残差箱线图和 ROC 曲线下面积（area under the curve, AUC）选择最优模型及评估预测性能。

#### 1.10 铜死亡 DEGs 与风险因子相关性分析

为进一步研究铜死亡 DEGs 与高风险因子的相互关系，利用“corrplot”和“circlize”R包对其进行分析，得出关键基因，最后进行可视化处理。

#### 1.11 铜死亡 DEGs 的中药筛选

将铜死亡 DEGs 作为预测靶标，在医学本体信息检索数据库（CoremineMedical）中以  $P < 0.05$  为条件，筛选对各预测靶标具有生物学效应的前 10 位中药，并进行四气五味、归经和功效分析。

## 2 结果

### 2.1 铜死亡 DEGs

如图 1 所示，共筛选出 9 个铜死亡 DEGs。其中，铜转运 ATP 酶  $\beta$ （ATPase copper transporting beta, *ATP7B*）、硫辛酸合成酶（lipoic acid synthetase, *LIAS*）、脂酰基转移酶 1（lipoyltransferase 1, *LIPT1*）、金属调节转录因子 1（metal regulatory transcription factor 1, *MTF1*）在 VaD 皮层组织中的表达水平较高，而 NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3（NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3, *NLRP3*）、脂酰基转移酶 2（lipoyltransferase 2, *LIPT2*）、二氢硫辛酰胺脱氢酶（dihydrolipoamide dehydrogenase, *DLD*）、二氢脂酰胺 *S*-乙酰基转移酶（dihydrolipoamide *S*-acetyltransferase, *DLAT*）、丙酮酸脱氢酶 E1 亚基  $\beta$ （pyruvate dehydrogenase E1 subunit beta, *PDHB*）在 VaD 皮层组织中的表达水平明显低于正常组。

### 2.2 铜死亡 DEGs 相关性分析

对以上 DEGs 进行相关性分析，结果显示 *DLAT* 和 *DLD*、*PDHB*，*DLD* 和 *PDHB* 表现出较强的协同效应；*MTF1* 和 *LIAS*、*LIPT2* 表现出较强的拮抗效应（图 2）。

### 2.3 样品聚类分型分析

根据铜死亡 DEGs 对数据集中的额叶样本进行分型，结果显示当  $k$  值设置为 2 时，共识聚类矩阵区分度最明显，聚类数量最稳定，各个亚型的一致性评分最高。PCA 散点图亦显示 2 个亚型之间存在

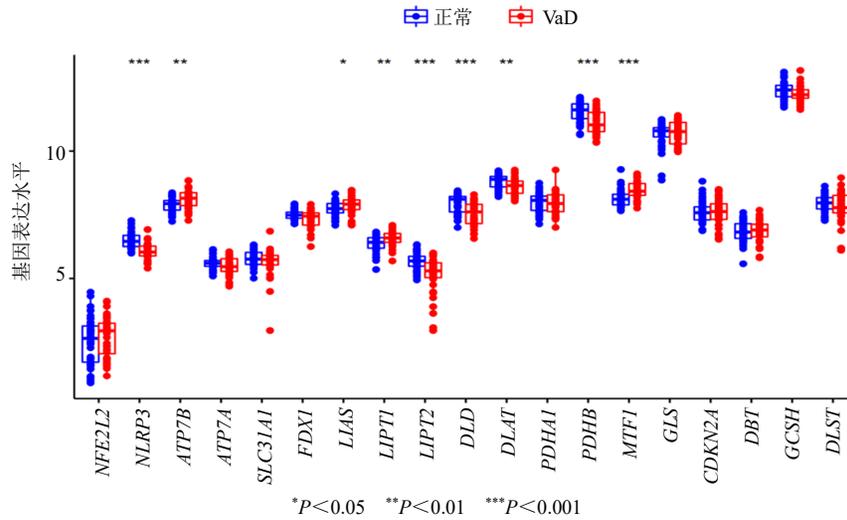
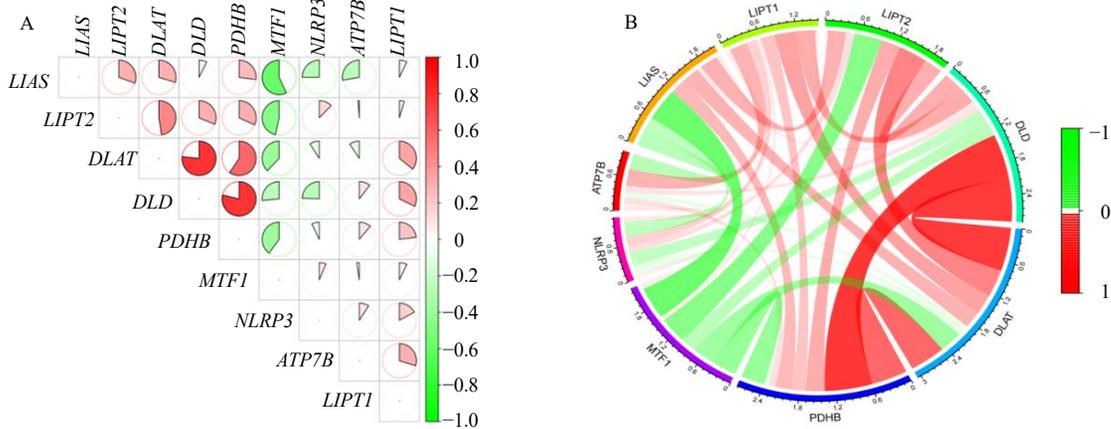


图1 铜死亡相关基因箱线图

Fig. 1 Box map of genes associated with cuproptosis



A-相关性分析扇形图 B-相关性分析圈图

A-sector chart of correlation analysis B-circle chart of correlation analysis

图2 铜死亡 DEGs 相关性分析

Fig. 2 Correlation analysis of cuproptosis DEGs

显著差异。因此，最终将 36 例 VaD 患者分为 2 个亚型：C1 ( $n=6$ )、C2 ( $n=30$ )。见图 3。为了进一步探索亚型间的分子特征，综合评估了铜死亡 DEGs 在各亚型的表达差异。图 4 可观察到 C1 和 C2 2 种亚型 DEGs 的表达情况。*MTF1* 在 C1 中明显高表达；*LIAS*、*LIPT1*、*LIPT2*、*DLD*、*DLAT* 和 *PDHB* 在 C2 中明显高表达。

#### 2.4 分型后 GSVA 通路富集分析

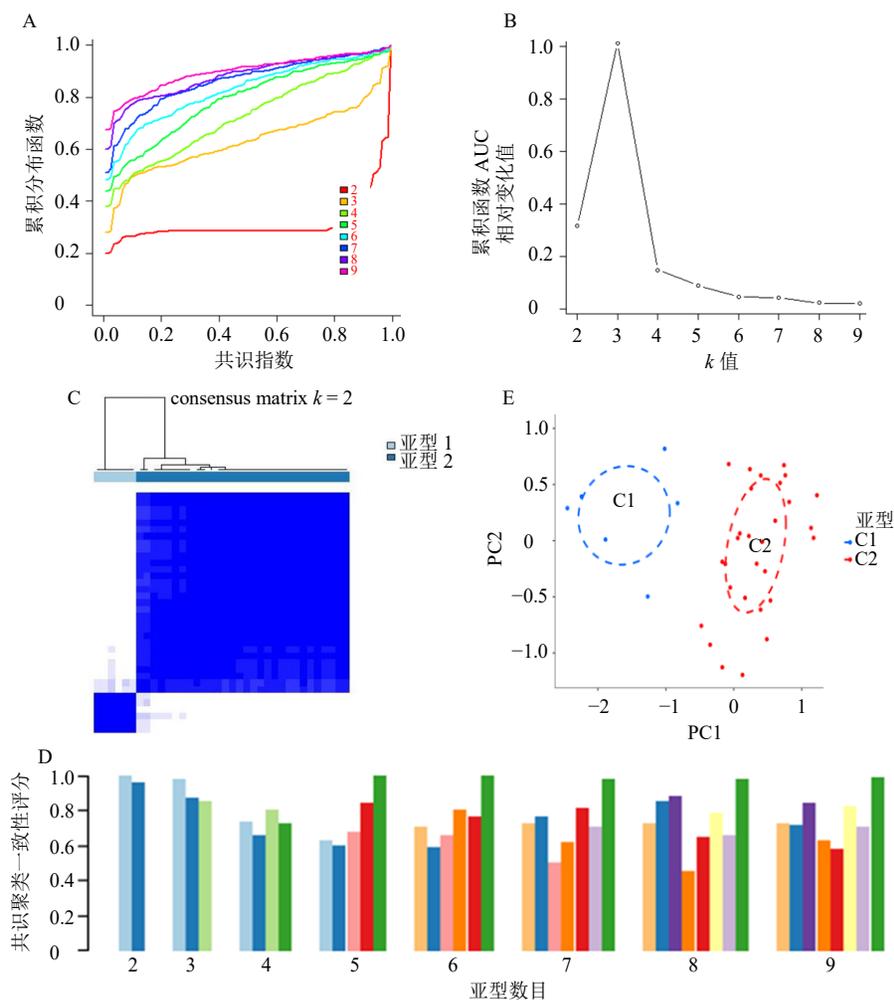
结果显示，通过分型后 GSVA 通路富集分析，富集到上调与下调显著性前 5 条通路。其中，下调通路涉及核苷酸切除修复、去氧核糖核酸的复制、错配修复、组氨酸代谢和非同源端连接；上调通路涉及青少年成熟型糖尿病、刺猬信号通路、2 型糖尿病、硫代谢和嗅觉转导。见图 5。

#### 2.5 WGCNA

利用 WGCNA 算法建立共表达网络和模块，识别与 VaD 铜死亡聚类分型密切相关的关键基因模块。结果显示，根据无尺度网络的拟合度 0.8，得到构建网络的最佳软阈值 3 (图 6-A)。其中 1 个模块包含 3026 个基因被确定为显著模块，热图描绘了所有模块相关基因的 TOM (图 6-B)。基因模块与临床性状之间的相关性如图 6-C 所示，绿松石模块与 VaD 分型高度相关。其中，绿松石模块基因 (37 个) 与所选模块具有显著的相关性 (图 6-D)。

#### 2.6 重要基因的筛选结果

如图 7 所示，通过与正常组对比分析，GSE122063 芯片获得 VaD 所有 DEGs 294 个，与 WGCNA 筛选出来的临床性状模块差异基因取交集



A- $k=0.2\sim 0.9$ , 累积分布函数呈现一致性分布 B- $k$  值不同, 集群的稳定性有所不同 C- $k=2$  时, 共识聚类矩阵区分度最明显 D- $k=2$  时, 各亚型的一致性评分最高 E-聚类型 PCA 散点图

A- $k=0.2\sim 0.9$ , cumulative distribution function shows that the consistency distribution B- $k$  value is different, and the stability of the cluster is different C-when  $k=2$ , the consensus cluster matrix is the most distinguished D-when  $k=2$ , the consistency score of each subtype is the highest

图 3 基于铜死亡 DEGs 样品聚类分型

Fig. 3 Clustering type of samples based on cuproptosis DEGs

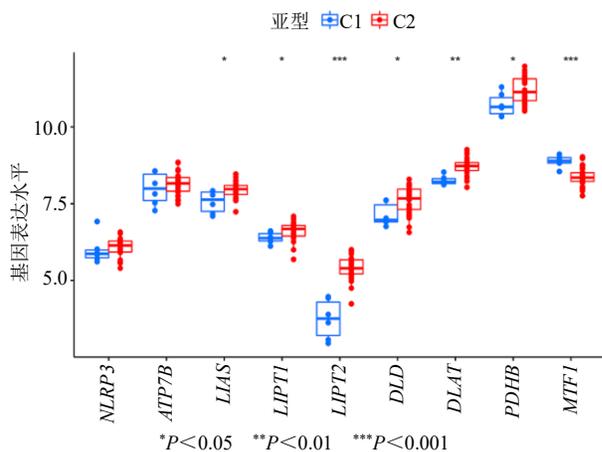


图 4 铜死亡 DEGs 在各亚型的表达情况

Fig. 4 Expression of cuproptosis DEGs in each subtype

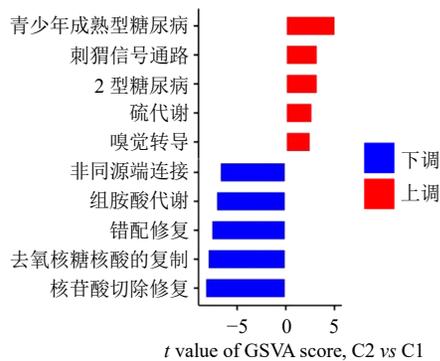
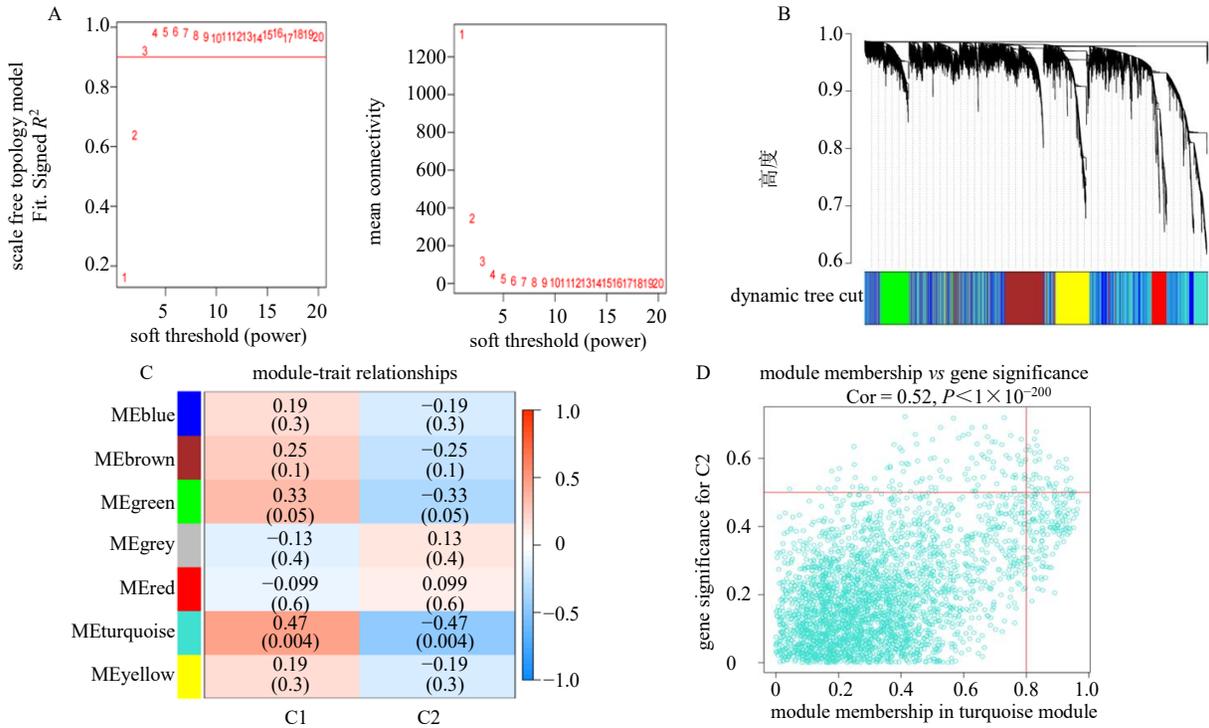


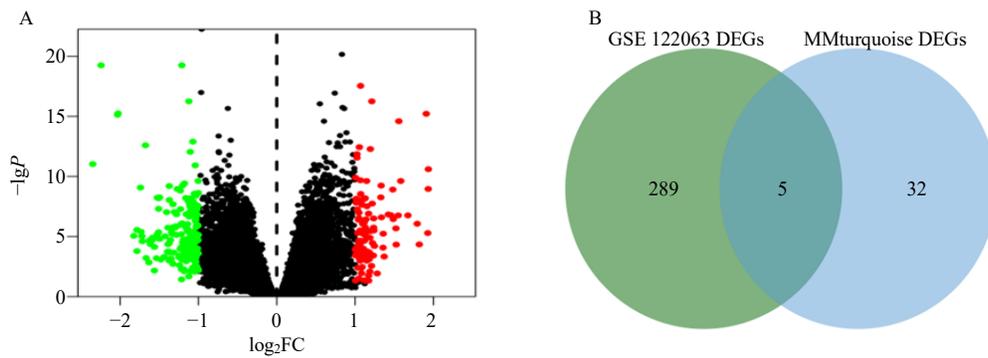
图 5 铜死亡 DEGs 相关分型后 GSVA 通路富集分析

Fig. 5 GSVA pathway enrichment analysis of cuproptosis DEGs after correlation typing



A-软阈值图 B-模块聚类图 C-模块-临床性状关系图 D-绿松石模块基因显著性散点图  
A-diagram illustrating soft thresholding B-diagram depicting module clustering C-diagram showing the relationship between modules and clinical traits D-scatter diagram displaying gene significance in the turquoise module

图6 WGCNA 结果  
Fig. 6 Result of WGCNA



A-GSE122063 火山图 B-韦恩图  
A-GSE122063 volcano map B-Venn diagram

图7 重要基因筛选结果

Fig. 7 Screening results of important gene

得到 5 个重要基因含 113 螺旋结构域蛋白 (coiled-coil domain-containing protein 113, *CCDC113*)、*XLOC\_011804*、*XLOC\_001488*、*XLOC\_005471* 和 EF 手结构域 1 蛋白磷酸酶 (protein phosphatase with EF-hand domain 1, *PPEF1*)。见图 7。

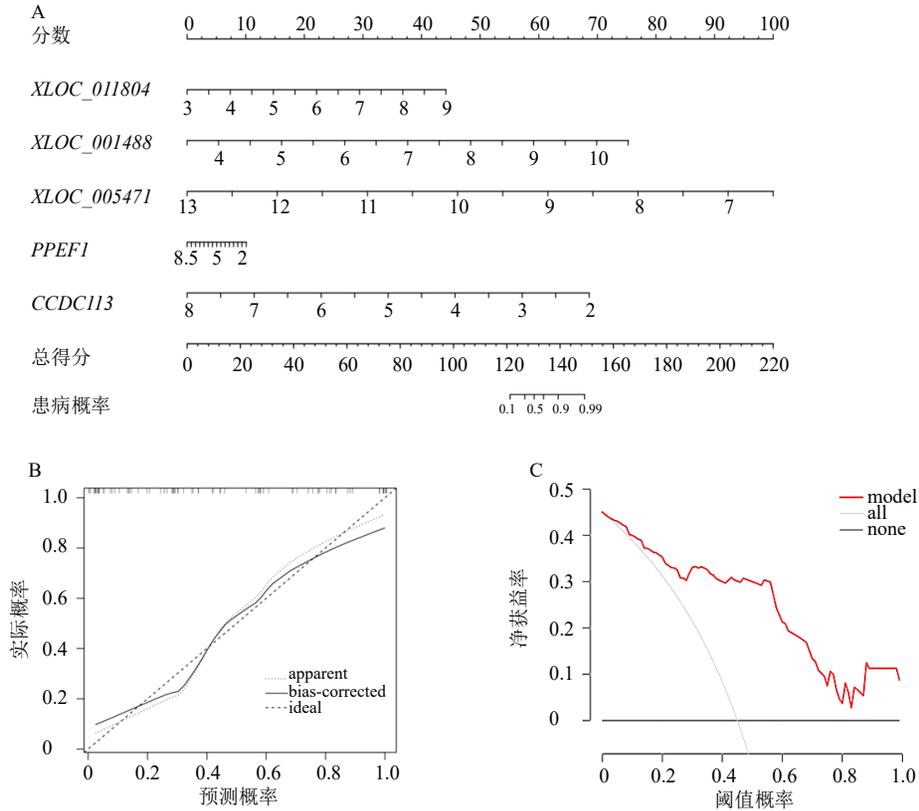
### 2.7 风险预测列线图模型

为了评估重要基因的预测效能, 需构建 1 个列线图模型。结果显示, *XLOC\_005471* 基因可能是

VaD 的风险因子。校正曲线显示, 基于重要基因构建列线图模型来分析 VaD 患者的预测风险概率与实际风险之间的误差非常小。决策曲线显示列线图模型具有较高的准确性, 可为临床决策提供依据。见图 8。

### 2.8 机器学习预测模型

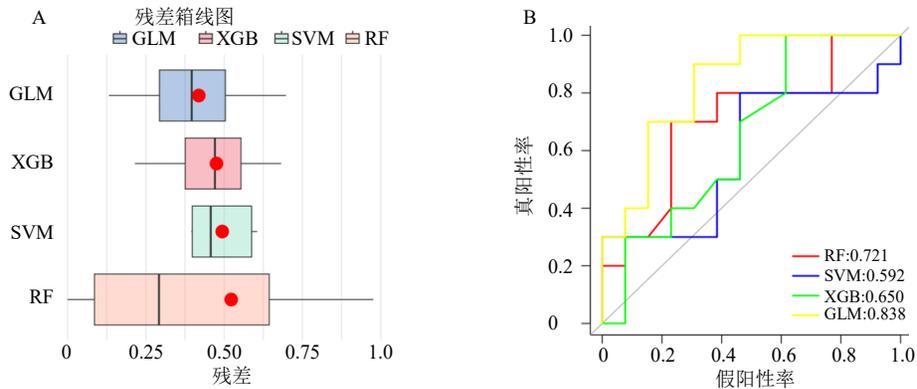
如图 9 所示, 基于风险因子 *XLOC\_005471* 建立了 4 种经过验证的机器学习模型: XGB、GLM、RF



A-VaD 患者列线图模型 B-校正曲线验证 C-决策曲线验证  
A-VaD patient nomogram model B-correction curve validation C-decision curve validation

图 8 风险预测列线图模型的构建

Fig. 8 Construction of risk prediction nomogram model



A-各机器学习模型残差箱线图 (红点代表残差的均方根) B-各机器学习模型 ROC 曲线

A-box-and-whisker plots illustrating the residuals of each machine learning model (red dots represent the root mean square of residuals) B-receiver operating characteristic (ROC) curves for each machine learning model

图 9 最优机器学习模型和关键基因筛选结果

Fig. 9 Results of optimal machine learning model and key gene screening

和 SVM。残差箱线图显示 GLM 机器学习模型的残差相对较低,ROC 曲线显示 GLM 机器学习模型 AUC 最高 (AUC=0.838), 表明基于风险因子 XLOC\_005471 的 GLM 机器学习模型预测准确性较好。

### 2.9 铜死亡 DEGs 与风险因子相关性分析

如图 10 所示, XLOC\_005471 和 LIPT2、DLAT、DLD、PDHB 表现出较强的拮抗效应; XLOC\_005471 和 MTF1 表现出较强的协同效应。LIPT2、DLAT、

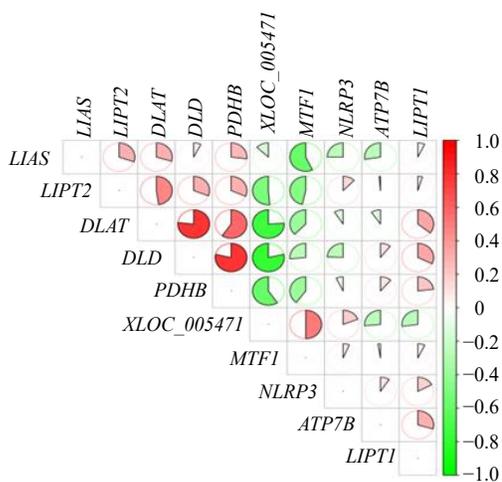


图 10 铜死亡 DEGs 与风险因子相关性分析

Fig. 10 Correlation analysis of cuproptosis DEGs and risk factors

DLD、PDHB 与 MTF1 可作为铜死亡关键 DEGs。

### 2.10 铜死亡 DEGs 的中药筛选

经过筛选共得到 29 味中药，见表 1。四气五味、归经与功效分析结果显示，药物四气多属寒、温、平，五味多属苦、甘，归经主要集中在胃、肾、心和肝经，功效多与清热补虚相关。见图 11。

### 3 讨论

由于 VaD 病理的异质性和复杂性，目前对 VaD 的治疗缺乏足够的疗效。在过去的几十年里，VaD 的抗神经退行性治疗取得了一些进展，然而基于组织学的传统分类对临床治疗依然欠缺有效的特异性指导作用<sup>[9]</sup>。因此，识别更合适的分子相关的分型可能对指导 VaD 的个体化治疗至关重要。铜死亡是最近报道的一种铜依赖细胞死亡形式，主要表现为脂酰化线粒体酶的累积，与多种疾病的进展密切相

表 1 基于铜死亡 DEGs 的中药预测

Table 1 Traditional Chinese medicine prediction based on cuproptosis DEGs

基因名称	相关中药
ATP7B	肉桂、羊肝
LIAS	牛胆、浮小麦
MTF1	鱼脑石、小鱼脑石、鱼鳔胶、枣槟榔、槟榔、西红花
NLRP3	黄蜀葵花、海盘车、人参花、人参芦、人参叶、人参、秦皮、沙苑子、桂丁、豨莶草
DLD	青蛤壳/海蛤壳、冬青卫矛、鱼脑石、小鱼脑石、鱼鳔胶、黄瓜、豌豆、牡丹皮、松节油、松叶
DLAT	苦豆草、芋
LIPT1、LIPT2、PDHB	无

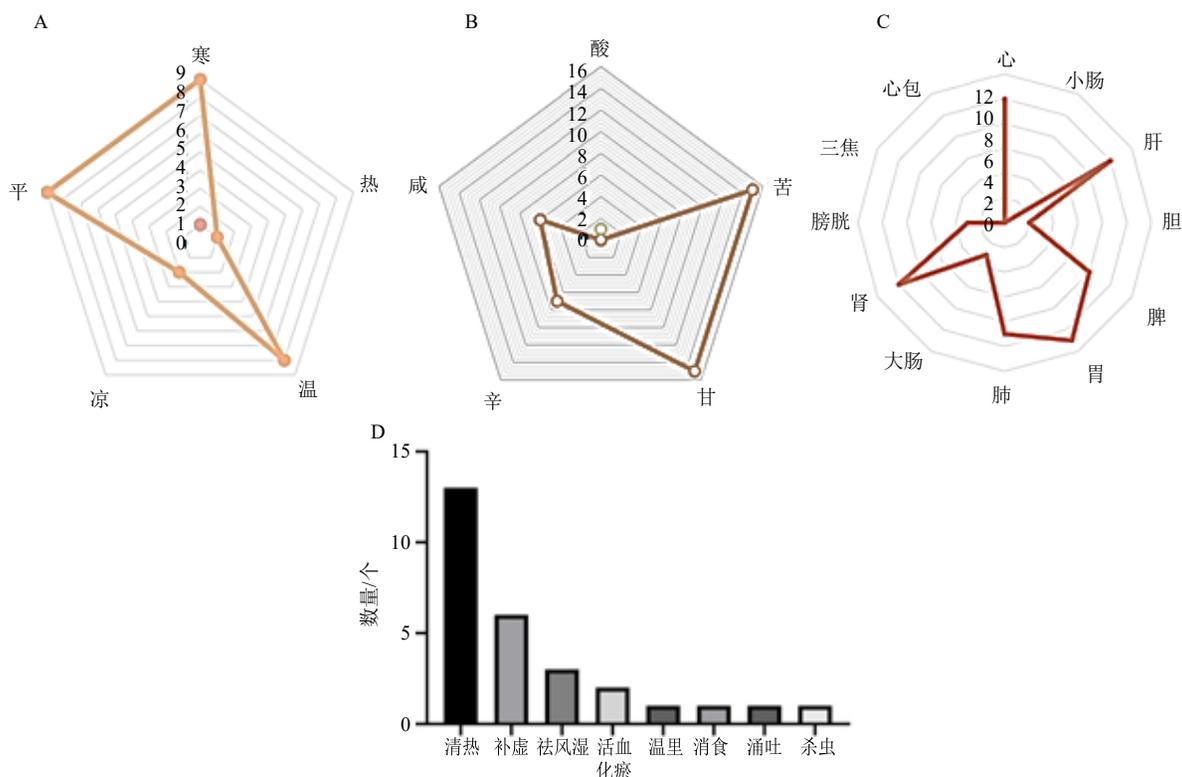
关<sup>[10]</sup>。目前，铜死亡在 VaD 中的调控机制尚未得到研究。因此，本研究试图阐明铜死亡相关基因在 VaD 发病机制中的具体作用，并利用铜死亡相关基因预测 VaD 亚型。

本研究首次全面分析了正常健康人和 VaD 患者脑组织中铜死亡调节因子的表达谱。与正常人群相比，VaD 患者中较多铜死亡相关基因表达异常，提示其在 VaD 的发生中起重要作用。随后分析了铜死亡 DEGs 之间的相关性，以阐明铜死亡调节因子与 VaD 之间的关系。结果发现一些铜死亡相关 DEGs 具有显著的协同或拮抗作用，说明它们在 VaD 发病机制中起到相互调控作用。为进一步观察铜死亡相关 DEGs 在 VaD 患者中是否存在不同的调控模式，本研究利用无监督聚类分析对 VaD 样本进行聚类分型，并确定了 2 种亚型。与亚型 1 (C1) 相比，亚型 2 (C2) 具有较强的刺猬信号通路活性。据报道，抑制刺猬信号通路能抑制脑缺血性损伤早期纤

维瘢痕的形成且不利于神经功能的恢复<sup>[11]</sup>。因此，亚型 2 的 VaD 患者可能表现出更好的预后。

近年来，风险预测列线图模型和机器学习模型越来越多地应用于神经系统疾病关键基因的筛选和预测<sup>[12-13]</sup>。为进一步筛选这 9 个铜死亡 DEGs 中的核心基因以及观察风险因子预测效能，本研究对重要基因进行风险预测列线图模型、机器学习模型和相关性分析。结果显示，GLM 模型的预测效能最高 (AUC = 0.838)，表明其具备临床应用价值；XLOC\_005471 可能是 VaD 的高风险因子，DLAT、DLD、PDHB、LIPT2、MTF1 与 XLOC\_005471 高度相关。

铜死亡主要包括铜离子载体诱导的细胞死亡和铜稳态失调导致的细胞死亡。DLAT、PDHB 和 PDHA1 共同组成丙酮酸脱氢酶复合体，催化三羧酸循环中的丙酮酸脱羧生成乙酰辅酶 A，在线粒体呼吸调节铜离子诱导细胞死亡中发挥重要作用<sup>[6,14]</sup>。



A-四气统计雷达图 B-五味统计雷达图 C-归经统计雷达图 D-功效柱状图

A-statistical radar chart for four gases B-statistical radar chart for five tastes C-statistical radar chart for longitude D-bar chart illustrating efficacy

图 11 中药筛选与分析结果

Fig. 11 Screening and analysis results of traditional Chinese medicines

Cu<sup>2+</sup>通过铜离子载体进入依赖线粒体呼吸的细胞中过度蓄积，会与硫辛酰化 DLAT 结合，诱导 DLAT 的异聚化。异聚化的 DLAT 增加可产生细胞毒性，进而诱导细胞死亡。DLAT 是硫辛酸途径的关键酶之一，其敲除后可明显缓解铜离子载体介导的细胞杀伤作用<sup>[14]</sup>。同时研究表明，铜死亡相关基因 *LIPT2* 和 *MTF1* 对肝癌患者的病程进展、预后和免疫功能等方面具有重要意义<sup>[15]</sup>。上述基因都有可靠的证据支持它们参与调控铜死亡，但关于 *DLAT*、*DLD*、*PDHB*、*LIPT2* 和 *MTF1* 调控铜死亡在 VaD 中的作用研究尚未见报道。线粒体呼吸途径是铜离子载体诱导细胞死亡的必要条件。据报道，脑缺血再灌注动物模型三羧酸循环等能量代谢途径明显异常<sup>[16]</sup>。综合本研究发现，VaD 患者中较多铜死亡基因表达异常，进一步提示铜死亡与 VaD 发病机制关系密切，*DLAT*、*DLD*、*PDHB*、*LIPT2* 和 *MTF1* 等铜死亡相关基因研究潜力较大。

中医将 VaD 归属“痴呆”“呆病”范畴，其基本病机为脏腑虚损、气血虚弱，以致脑髓失养或邪实上扰清窍，其病性特征为本虚标实。本研究对铜

死亡 DEGs 进行中药预测与筛选，发现预测的药物四气多属寒、温、平，五味多属苦、甘，归经主要集中在胃、肝、心和肾经，功效多与清热补虚相关。从四气五味角度来看，预测中药苦寒以泄邪实，温平甘以补虚，切合 VaD 本虚标实的病性特点。从归经角度来看，预测中药主要归于胃、肾、心和肝经，亦与众多学者从中焦脾胃、肾、心或者肝论治痴呆的观点一致<sup>[17]</sup>。临床上可将 VaD 分为痰浊阻窍证、肾精亏虚证、肝阳上亢证、气血亏虚证、火热内盛证及瘀血阻窍证<sup>[18]</sup>。以（方）药测证是中医临床思维的重要方法和探讨中医“证”实质的重要途径之一<sup>[19]</sup>。从功效来看，预测中药多为清热补虚类，其中补虚类中药以补气虚如人参、人参叶和补肾如沙苑子、鱼鳔胶为主，提示其对应的证型为火热内盛伴有气虚或肾精亏虚证，这也从侧面反映临床辨证 VaD 的复杂性。值得注意的是，这同时意味着 *DLAT* 等铜死亡 DEGs 很可能有助于阐释 VaD 火热内盛伴有气虚或肾精亏虚证型的实质机制。目前尚未见生物信息学结合预测中药技术与证候实质相关的研究报道。本研究运用生物信息学筛选 VaD 铜死亡

DEGs、预测中药进而推测其火热内盛伴有气虚或肾精亏虚证的实质机制。这将有望为其证候实质研究提供前期理论基础。

本研究尚存在一定的局限性。首先，所采用的芯片数据虽然已满足研究所需的样本量，但因样本量来源单一可能导致结果存在一定偏倚。其次，筛选 VaD 铜死亡 DEGs 和建立的预测模型，仍需后续的临床或实验来验证。最后，通过预测中药和以(方)药测证中医临床思维方法对 VaD 火热内盛伴有气虚或肾精亏虚证的证候实质的初步探讨，有待进一步实验阐明。

综上，本研究利用生物信息学、机器学习等方法对 VaD 的铜死亡 DEGs 进行分析、预测其相关防治中药并初步探讨 VaD 的证候实质，对后续证候实质研究及临床用药具有参考意义。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

**参考文献**

[1] Wolters F J, Ikram M A. Epidemiology of vascular dementia [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2019, 39(8): 1542-1549.

[2] Gromadzka G, Tarnacka B, Flaga A, et al. Copper dyshomeostasis in neurodegenerative diseases-therapeutic implications [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(23): 9259.

[3] Oliveri V. Selective targeting of cancer cells by copper ionophores: An overview [J]. *Front Mol Biosci*, 2022, 9: 841814.

[4] 杨会军, 郭响, 李伟青, 等. 靶向铜死亡相关基因治疗类风湿关节炎生物信息学分析及干预中药的预测 [J]. *中草药*, 2023, 54(13): 4253-4265.

[5] Calabrese V, Giordano J, Signorile A, et al. Major pathogenic mechanisms in vascular dementia: Roles of cellular stress response and hormesis in neuroprotection [J]. *J Neurosci Res*, 2016, 94(12): 1588-1603.

[6] Tsvetkov P, Coy S, Petrova B, et al. Copper induces cell death by targeting lipoylated TCA cycle proteins [J].

*Science*, 2022, 375(6586): 1254-1261.

[7] Yang L, Yu J L, Tao L, et al. Cuproptosis-related lncRNAs are biomarkers of prognosis and immune microenvironment in head and neck squamous cell carcinoma [J]. *Front Genet*, 2022, 13: 947551.

[8] 王竣立, 陶成成, 乔玲, 等. 自噬基因结肠癌预后模型建立及验证 [J]. *西部医学*, 2021, 33(2): 173-179.

[9] 蒲凡, 孟红旗. 血管性痴呆的分类、临床与诊断进展 [J]. *中国社区医师: 医学专业*, 2012, 14(21): 201-202.

[10] Tang D L, Chen X, Kroemer G. Cuproptosis: A copper-triggered modality of mitochondrial cell death [J]. *Cell Res*, 2022, 32(5): 417-418.

[11] 文君, 朱慧敏, 李雪梅, 等. 抑制 Sonic Hedgehog 信号能抑制脑缺血性损伤后纤维瘢痕形成且不利于神经功能恢复 [J]. *南方医科大学学报*, 2022, 42(6): 840-848.

[12] 臧艳静, 郑宏伟, 崔泽岩. 基于血清学指标的脑梗死患者预后列线图预测模型的建立与评估 [J]. *中华老年心脑血管病杂志*, 2022, 24(3): 277-280.

[13] 周婧, 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.

[14] Wang Y Q, Zhang L, Zhou F F. Cuproptosis: A new form of programmed cell death [J]. *Cell Mol Immunol*, 2022, 19(8): 867-868.

[15] 孟云, 董保龙, 董晓骅, 等. 铜死亡相关基因在肝细胞癌中的表达及其临床意义 [J]. *中国普通外科杂志*, 2023, 32(1): 74-86.

[16] 吴兰兰. 荷叶碱对大鼠缺血性脑损伤的保护作用及机制研究 [D]. 成都: 西南交通大学, 2021.

[17] 王飞雪, 黄小波, 裴卉, 等. 血管性痴呆中医病机理论的传承和发扬 [J]. *世界中医药*, 2022, 17(2): 221-224.

[18] 惠振亮, 阮绍萍, 曹瑾, 等. 血管性痴呆中医证型临床研究 [J]. *陕西中医*, 2014, 35(4): 465-467.

[19] 刘玉, 秦秀德, 梁伟雄. 从血管性痴呆的方药分析论其证型分布 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2010, 16(17): 222-224.

[责任编辑 潘明佳]