

• 数据挖掘与循证医学 •

基于生物信息学分析非酒精性脂肪性肝病的线粒体自噬相关基因及防治中药筛选

高松林¹, 韦柳婷¹, 管晓¹, 温文建¹, 覃雁¹, 刘沛恬¹, 廖芸旭¹, 黄贵华^{2*}

1. 广西中医药大学, 广西 南宁 530000

2. 广西中医药大学第一附属医院, 广西 南宁 530000

摘要: **目的** 基于生物信息学探讨非酒精性脂肪性肝病 (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD) 与线粒体自噬相关的特征基因, 并筛选对这些基因起调控作用的中药。**方法** 从 GSE89632 数据集中提取差异表达的线粒体自噬相关基因 (differentially expressed mitophagy-related genes, DEMRGs), 并对其进行相关性分析、蛋白互作网络构建和富集分析。根据 DEMRGs 的表达量对 NAFLD 患者进行共识聚类, 分析亚型间 DEMRGs 的表达情况和基因集变异分析。构建并预测了 4 种机器学习模型的效能, 通过列线图、校准曲线、决策曲线和外部数据集评估最佳机器学习模型的有效性, 筛选最佳机器学习模型中 NAFLD 的线粒体自噬特征基因。预测能够调控线粒体自噬特征基因治疗 NAFLD 的潜在中药。**结果** 在 NAFLD 样本和正常对照样本中获得 14 个 DEMRGs, DEMRGs 具有相互调控的作用。根据 DEMRGs 的表达量可将 NAFLD 分为 2 个亚型。随机森林 (random forest, RF) 模型是最佳模型, 可以准确地预测 NAFLD。UNC-51 样激酶 1 (UNC-51-like kinase 1, *ULK1*)、磷酸酶和张力蛋白同源物 (phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome ten, *PTEN*) 诱导的激酶 1 (*PTEN* induced putative kinase 1, *PINK1*)、FUN14 结构域蛋白 1 (FUN14 domain containing 1, *FUNDC1*)、微管相关蛋白 1 轻链 3β (microtubule associated protein 1 light chain 3 beta, *MAP1LC3B*) 和视神经蛋白 (optineurin, *OPTN*) 是 NAFLD 的线粒体自噬特征基因。具有 NAFLD 潜在治疗中药有三七、川芎、藁本等, 功效主要以补虚、清热、化痰止咳平喘和活血化瘀为主。**结论** DEMRGs 在 NAFLD 的发生和发展中起重要作用, *ULK1*、*PINK1*、*FUNDC1*、*MAP1LC3B* 和 *OPTN* 是 NAFLD 与线粒体自噬相关的特征基因, 三七、川芎、藁本可能通过调节线粒体自噬治疗 NAFLD, 为 NAFLD 的诊断和治疗提供了新思路。

关键词: 非酒精性脂肪性肝病; 线粒体自噬相关基因; 生物信息学; 机器学习; 三七; 川芎; 藁本

中图分类号: Q811.4; TP18; R285 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)19-6655-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.19.019

Analysis of mitophagy-related genes in non-alcoholic fatty liver disease based on bioinformatics and screening of traditional Chinese medicine for prevention and treatment

GAO Songlin¹, WEI Liuting¹, GUAN Xiao¹, WEN Wenjian¹, QIN Yan¹, LIU Peitian¹, LIAO Yunxun¹, HUANG Guihua²

1. Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530000, China

2. The First Affiliated Hospital of Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530000, China

Abstract: Objective To explore the characteristic genes related to mitophagy in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) based on bioinformatics, and to screen the traditional Chinese medicine which can regulate these genes. **Methods** Differentially expressed mitophagy-related genes (DEMRGs) were extracted from the GSE89632 dataset and analyzed for correlation, protein interaction network

收稿日期: 2024-04-10

基金项目: 广西研究生教育创新计划项目 (YCBZ2023148); 广西科技基地和人才专项 (桂科 AD19245168); 国医大师黄瑾明学术思想与临床诊疗传承发展研究中心建设项目 (桂中医大党 [2022] 24 号); 国家中医药管理局第七批全国老中医药专家学术经验继承工作项目 (国中医药人教函 [2022] 76 号); 黄贵华桂派中医大师培养项目 (桂中医药科教发 [2022] 6 号); 黄贵华广西名中医传承工作室项目 (桂卫中医发 [2017] 2 号)

作者简介: 高松林 (1998—), 博士研究生, 研究方向为中医药治疗脾胃病的研究。E-mail: 1115308402@qq.com

***通信作者:** 黄贵华, 教授, 主任医师, 博士研究生导师, 研究方向为中医药治疗脾胃病的研究。E-mail: hgh8828@163.com

and enrichment analyses among DEMRGs. Consensus clustering of NAFLD patients was performed according to the expression of DEMRGs. Expression of DEMRGs between subtypes was analyzed as well as gene set variant analysis. Four machine learning models were constructed and their performance were predicted. The effectiveness of the optimal machine learning model was evaluated by nomograms, calibration curves, decision curves, and external datasets. The characteristic genes related to mitophagy for NAFLD were screened in terms of optimal machine learning models. Finally, the potential traditional Chinese medicines (TCMs) that can regulate the characteristics of mitophagy for the treatment of NAFLD was inferred. **Results** A total of 14 DEMRGs were obtained in NAFLD samples and normal control samples. The DEMRGs have a mutual regulatory role. NAFLD can be categorized into two subtypes based on the expression of DEMRGs. Random forest (RF) model was the best model to predict NAFLD accurately. UNC-51-like kinase 1 (*ULK1*), phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome ten (*PTEN*) induced putative kinase 1 (*PINK1*), FUN14 domain containing 1 (*FUNDC1*), microtubule associated protein 1 light chain 3 beta (*MAP1LC3B*) and optineurin (*OPTN*) are characterized genes associated with mitophagy in NAFLD. Potential therapeutic TCMs include Sanqi (*Notoginseng Radix et Rhizoma*), Chuanxiong (*Chuanxiong Rhizoma*), and Gaoben (*Ligustici Rhizoma et Radix*), etc. The efficacy of these TCMs mainly focuses on supplementing deficiency, clearing heat, resolving phlegm, stopping coughs and calming asthma, and promoting blood circulation and removing blood stasis. **Conclusion** DEMRGs play an important role in the occurrence and progression of NAFLD. *ULK1*, *PINK1*, *FUNDC1*, *MAP1LC3B* and *OPTN* are characterized genes associated with mitophagy in NAFLD. *Notoginseng Radix et Rhizoma*, *Chuanxiong Rhizoma* and *Ligustici Rhizoma et Radix* may treat NAFLD by modulating mitophagy. This study provides new ideas for the diagnosis and treatment of NAFLD.

Key words: non-alcoholic fatty liver disease; mitophagy-related genes; bioinformatics; machine-learning; *Notoginseng Radix et Rhizoma*; *Chuanxiong Rhizoma*; *Ligustici Rhizoma et Radix*

非酒精性脂肪性肝病 (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD) 是一种以肝脏脂肪变性 >5% 为特征的代谢性疾病^[1]。NAFLD 包括从单纯性脂肪变性和非酒精性脂肪性肝炎 (non-alcoholic steatohepatitis, NASH) 到肝硬化甚至肝细胞癌的一系列疾病。NAFLD 的全球发病率和患病率在过去 30 年中均急剧上升, 目前全球成人 NAFLD 患病率为 32%, 男性 (40%) 高于女性 (26%), 造成了巨大的卫生经济负担^[2-3]。目前, 尚无药物被批准用于治疗 NAFLD, 临床上主要通过改变生活方式来治疗。然而, NAFLD 患者往往难以维持改善的生活方式。因此, 亟需探索 NAFLD 的潜在分子机制和治疗药物, 为治疗提供新的靶点和策略。

线粒体自噬是一种特异性靶向清除受损或多余线粒体以维持细胞完整性和促进细胞更新的自噬过程^[4]。研究表明线粒体自噬可以通过维持线粒体功能和蛋白质折叠过程来调节肝细胞死亡和脂质稳态^[5]。另一方面, 过多的脂质积累可能会抑制线粒体自噬, 促进 NAFLD 的炎症, 而减少脂质积累可能会恢复肝脏中的线粒体自噬, 缓解肝脏疾病^[6]。Undamatla 等^[7]发现线粒体自噬减少是 NAFLD 的早期特征。另一项研究显示芝麻素可能通过恢复受损的线粒体自噬, 减轻油酸引起的 HepG2 细胞中过度的脂质积聚^[8]。此外, Cao 等^[9]发现槲皮素能够通过促进腺苷酸活化蛋白激酶介导的肝脏线粒体自噬改善 NAFLD。可见, 调节线粒体自

噬可能是一种有前景的治疗 NAFLD 的策略。然而, 以往的研究仅探讨了特定基因介导的线粒体自噬通路对 NAFLD 的影响, 提示二者之间存在一定的相关性。线粒体自噬相关基因 (mitophagy-related genes, MRGs) 在 NAFLD 中的作用尚缺乏研究。因此, 本研究运用多种生物信息学和机器学习方法研究 NAFLD 中 MRGs 的表达和线粒体自噬相关的特征基因, 并预测对特征基因有调控作用的中药, 以期对 NAFLD 的诊断、机制研究和治疗提供参考。

1 方法

1.1 数据来源和预处理

从 GEO 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>) 下载 3 个 NAFLD 基因表达数据集 (GSE89632、GSE48452 和 GSE63067)。GSE89632 数据集中有 63 个肝脏样本, 其中 39 个为 NAFLD 患者肝脏样本、24 个为健康对照的肝脏样本。GSE48452 数据集有 32 个 NAFLD 样本和 14 个健康对照样本, GSE63067 有 11 个 NAFLD 样本和 7 个健康对照样本。将 GSE89632 数据集作为训练数据集, GSE48452 和 GSE63067 用于验证分析, 使用 “limma” R 包对原始基因表达谱进行标准化。从先前发表的文献中获得 34 个 MRGs^[10-11]。

1.2 线粒体自噬基因的表达分析

使用 “limma” R 包和 wilcox.test 检验方法^[12]分析 34 个 MRGs 在 NAFLD 样本和对照样本之间的表达差异, $P < 0.05$ 被认为是差异表达的线粒体

自噬基因 (differentially expressed mitophagy-related genes, DEMRGs), 运用 “ggpubr” R 包对其进行可视化。

1.3 DEMRGs 的相关性分析和蛋白互作 (protein-protein interaction, PPI) 网络构建

运用 “corrplot” R 包分析 DEMRGs 之间的相关性。将 DEMRGs 上传至 STRING 数据库 (<https://string-db.org/>) 构建 PPI 网络, 设置物种为 “Homo sapiens”。

1.4 富集分析

使用 “clusterProfiler” R 包对 DECRGs 进行基因本体 (gene ontology, GO) 和京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 富集分析 ($P < 0.05$)。

1.5 共识聚类

为了阐明 NAFLD 中线粒体自噬相关的表达模式, 使用 “ConsensusClusterPlus” 软件包^[13]基于 DEMRGs 的表达对 39 例 NAFLD 样本进行无监督共识聚类。通过对累积分布函数 (cumulative distribution function, CDF) 曲线、共识矩阵和一致性聚类得分的综合评价来确定最佳聚类数, 并采用主成分分析 (principal component analysis, PCA) 对聚类结果进行分析。

1.6 基因集变异分析 (gene set variation analysis, GSVA)

运用 “GSVA” R 包进行 GSVA 富集分析, 运用 “limma” R 包识别亚型间差异表达的生物学途径 ($P < 0.05$)。

1.7 机器学习模型的构建

运用 “caret” R 包构建随机森林 (random forest, RF)、极限梯度上升、支持向量机和广义线性模型, 使用 “DALEX” 软件包分析和显示残差分布及基因重要性, 使用 “pROC” R 包可视化接收器工作特性 (receiver operating characteristic, ROC) 曲线, 最终获得最有效的机器学习模型和线粒体自噬特征基因。

1.8 列线图模型的构建和验证

使用 “rms” R 包在线粒体自噬特征基因的基础上构建列线图模型, 每个特征基因根据其表达水平被赋予不同的分数, 并计算总分评估 NAFLD 的患病率。通过校准曲线和决策曲线评估列线图模型的准确性, 并通过 GSE48452 和 GSE63067 数据集进行验证。

1.9 防治 NAFLD 潜在中药预测

在 Coremine Medical 数据库 (<https://www.coremine.com/>) 中预测与线粒体自噬特征基因相关且 $P < 0.05$ 的中药。参照《中药学》^[14]和《中国药典》2020 年版^[15]对预测到的中药名称进行规范化并删除未收录的中药, 借助中医传承计算平台 (V3.5) 进行分析。

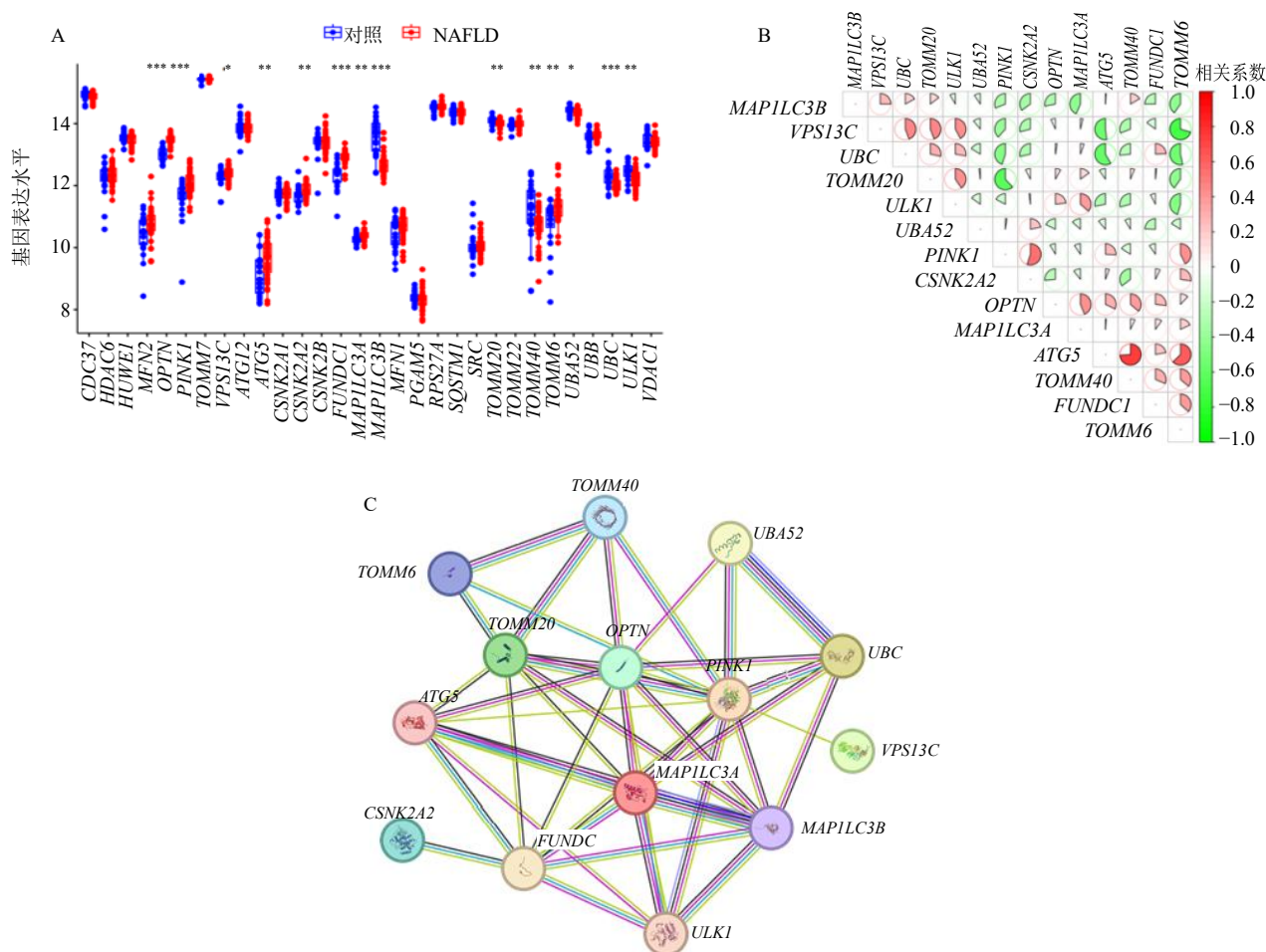
2 结果

2.1 NAFLD 线粒体自噬基因的表达、相关性分析及 PPI 网络构建

在 GSE89632 数据集中分析 34 个 MRGs 的表达情况, 最终获得 14 个 DEMRGs, 其中视神经蛋白 (optineurin, *OPTN*)、磷酸酶和张力蛋白同源物 (phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome ten, *PTEN*) 诱导的激酶 1 (*PTEN* induced putative kinase 1, *PINK1*)、液泡蛋白分选 13 同系物 C (vacuolar protein sorting 13 homolog C, *CVPS13C*)、自噬相关基因 5 (autophagy-related gene 5, *ATG5*)、酪蛋白激酶 II α 2 亚基 (casein kinase II subunit alpha 2, *CSNK2A2*)、FUN14 结构域蛋白 1 (FUN14 domain containing 1, *FUNDC1*)、微管相关蛋白 1 轻链 3 α (microtubule associated protein 1 light chain 3 alpha, *MAP1LC3A*)、线粒体外膜转位酶 6 (translocase of outer mitochondrial membrane 6, *TOMM6*) 在 NAFLD 患者中均表达上调, 而微管相关蛋白 1 轻链 3 β (microtubule associated protein 1 light chain 3 beta, *MAP1LC3B*)、*TOMM20*、*TOMM40*、泛素-核糖体融合蛋白 52 (ubiquitin A-52 residue ribosomal protein fusion product 1, *UBA52*)、泛素 C (ubiquitin C, *UBC*) 和 UNC-51 样激酶 1 (UNC-51-like kinase 1, *ULK1*) 在 NAFLD 患者中均表达下调 ($P < 0.05$) (图 1-A)。相关性分析显示 *PINK1* 与 *CSNK2A2*, *ATG5* 与 *TOMM40*、*TOMM6* 具有显著的协同作用, *TOMM20* 与 *PINK1*, *ATG5* 与 *VPS13C*、*UBC*, *TOMM6* 与 *VPS13C*、*UBC* 呈显著的拮抗作用 (图 1-B)。PPI 网络中共涉及 14 个节点, 每个节点代表 1 个 DEMRGs, 进一步证明 DEMRGs 之间存在调控关系 (图 1-C)。

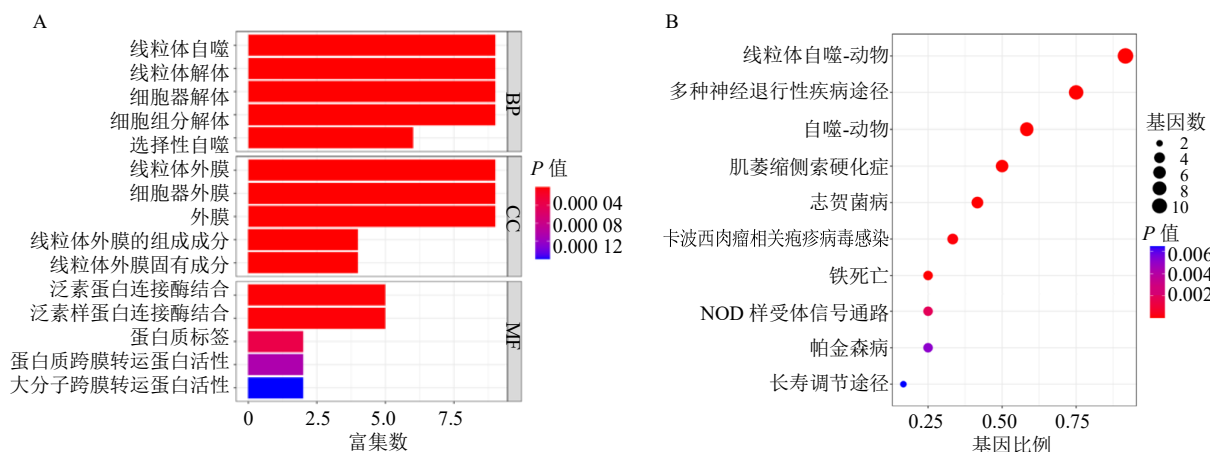
2.2 DEMRGs 的富集分析

GO 富集结果 (图 2) 显示, 在生物过程 (biological process, BP) 中, DEMRGs 在线粒体自噬、线粒体解体、细胞器解体、细胞组分解体和选择性自噬中均显著富集。在细胞成分 (cellular



A-NAFLD 组和对照组之间 MRGs 的比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$; B-NAFLD 中 DEMRGs 表达之间的相关性; C-PPI 网络图。
A-comparison of MRGs between NAFLD group and control group: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$; B-correlations of expression among DEMRGs in NAFLD samples; C-PPI networks.

图 1 NAFLD 中 DEMRGs 的表达情况
Fig. 1 Expression of DEMRGs in NAFLD



A-GO 富集分析; B-KEGG 富集分析。
A-GO enrichment analysis; B-KEGG enrichment analysis.

图 2 NAFLD 中 DEMRGs 的富集分析
Fig. 2 Enrichment analysis of DDEMRGs in NAFLD

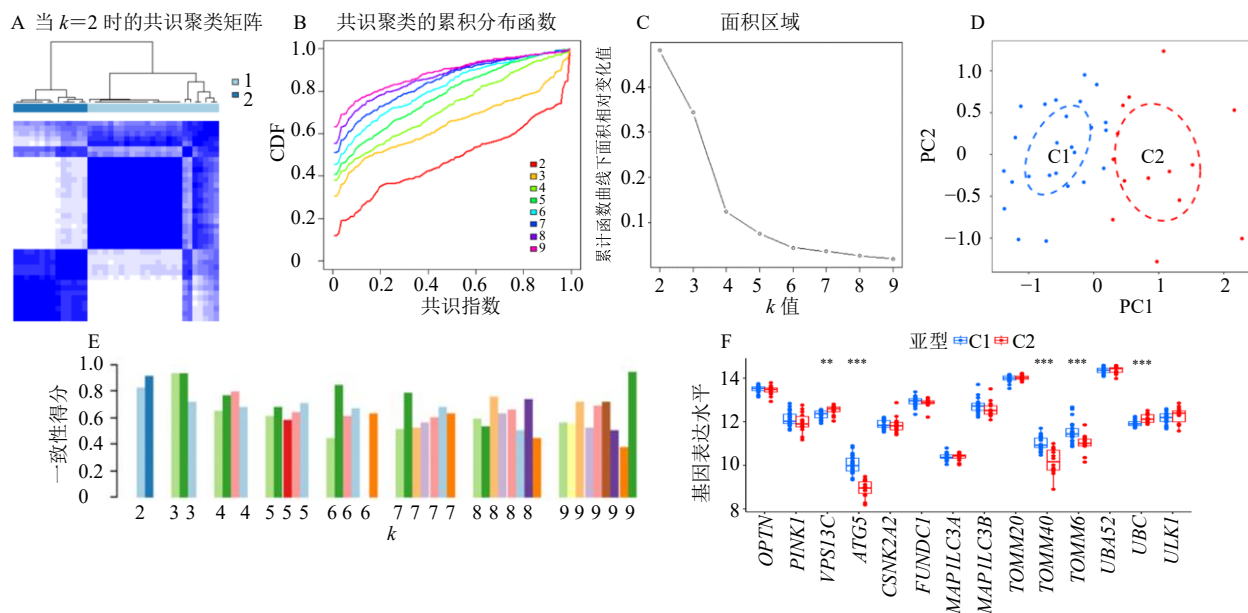
component, CC) 中, DEMRGs 主要存在于线粒体外膜、细胞器外膜和自噬体中。在分子功能 (molecular function, MF) 方面, 这些基因在几个关键功能中起着至关重要的作用, 如泛素蛋白连接酶结合、泛素样蛋白连接酶结合、蛋白标签和蛋白质跨膜转运蛋白活性。

KEGG 富集分析 (图 2) 显示, DEMRGs 主要涉及线粒体自噬、多种神经退行性疾病途径、自噬、肌萎缩侧索硬化症、铁死亡、NOD 样受体信号通路

等 13 条通路 ($P < 0.05$)。

2.3 共识聚类分析

当 $k=2$ 时, 聚类数量最稳定, CDF 曲线的波动最小, 并且每种亚型的一致性得分最高 (图 3-A、B、C、E), 因此将 39 例 NAFLD 患者样本分为 C1 (25 例) 和 C2 (14 例) 2 个亚型。PCA 结果表明 2 个亚型之间具有显著差异 (图 3-D)。ATG5、TOMM40、TOMM6 在 C1 亚型中的表达高于 C2 亚型, VPS13C、UBC 在 C2 亚型中的表达高于 C1 亚型 (图 3-F)。



A-当 $k=2$ 时的共识聚类矩阵; B-CDF 曲线; C-CDF 曲线下的面积; D-2 个亚型的 PCA 图; E-一致性聚类的得分; F-DEMRGs 在 2 个亚型中的表达箱线图, $**P < 0.01$ $***P < 0.001$ 。

A-Consensus clustering matrix when $k = 2$ B-CDF curve C-CDF delta area curves D-PCA of two clusters E-score of consensus clustering F-boxplots of DEMRGs expression between two clusters, $**P < 0.01$ $***P < 0.001$.

图 3 共识聚类分析

Fig. 3 Consensus clustering analysis

2.4 GSVA 分析

GSVA 用于评估不同类型之间的生物学功能差异, 泛素介导的蛋白水解、同源重组、长时程增强等途径在 C2 亚型中上调。此外, 味觉传导、酪氨酸代谢、Janus 激酶-信号转导及转录激活因子信号通路等途径在 C1 亚型中上调 (图 4)。

2.5 预测 NAFLD 的机器学习模型构建

通过构建 4 种机器学习模型来筛选 NAFLD 中具有高诊断价值的 DEMRGs, 即线粒体自噬特征基因。残差箱线图和残差反向累积分布图均显示 RF 模型的残差较小 (图 5-A、B), 且 ROC 曲线下面积为 1 (图 5-C), 表明 RF 模型在预测 NAFLD 方面准确性较高, 故 RF 模型是最佳机器学习模型, ULK1、PINK1、FUNDCl、MAP1LC3B 和 OPTN 是

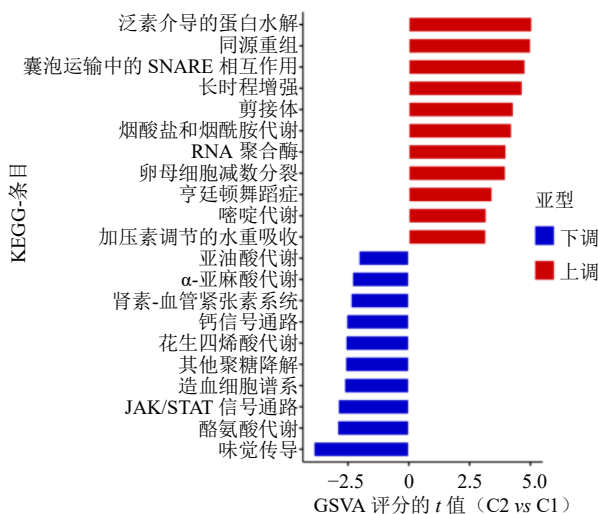
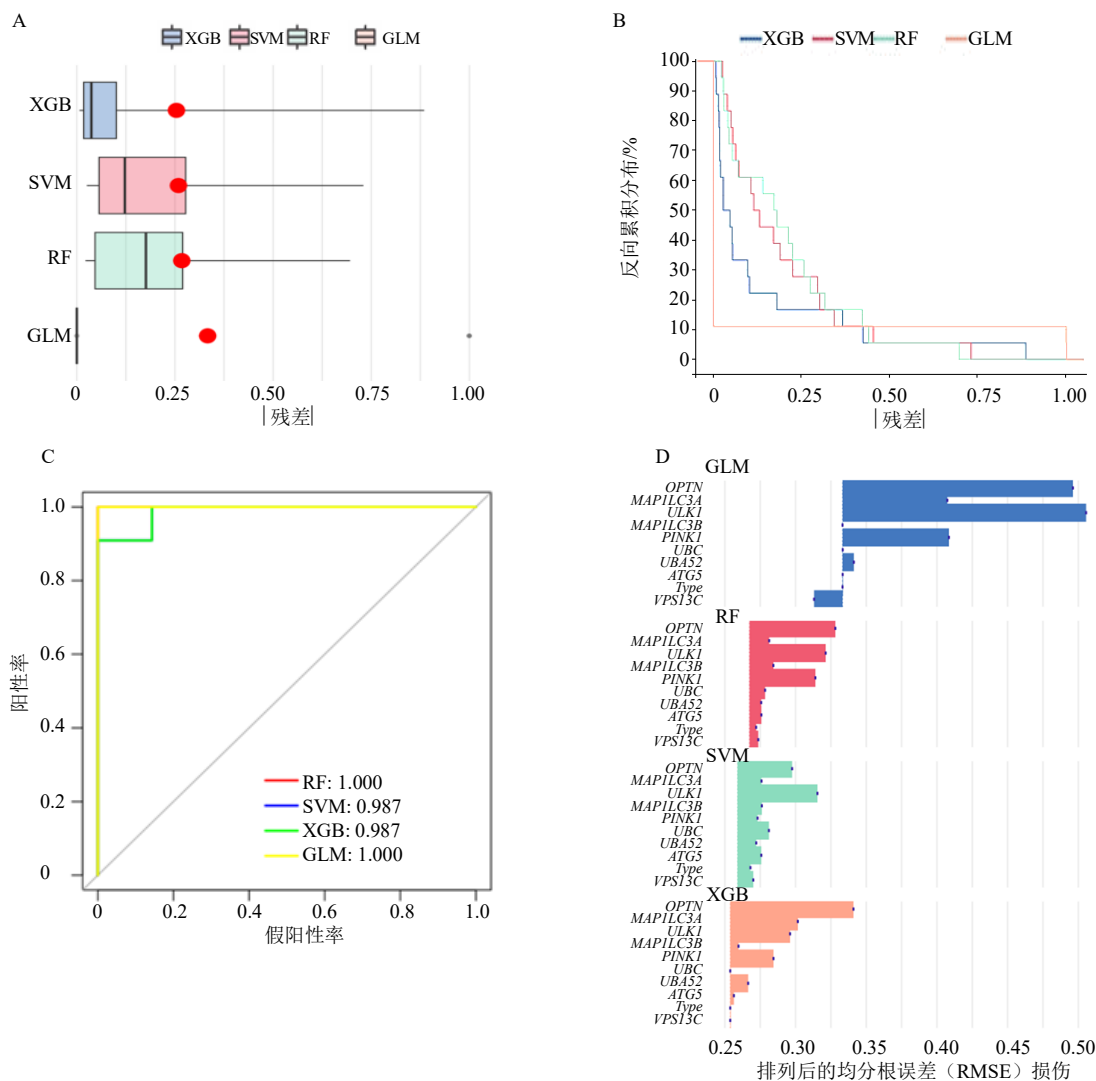


图 4 GSVA 分析

Fig. 4 Analysis of GSVA



A-残差箱线图; B-残差反向累积分布图; C-ROC 曲线; D-重要特征基因。

A-boxplots of residual; B-reverse cumulative distribution of residuals; C-ROC curve; D-significant eigengenes.

图 5 NAFLD 中机器学习模型的构建

Fig. 5 Construction of machine learning model in NAFLD

重要性排名前 5 的线粒体自噬特征基因 (图 5-D)。

2.6 列线图模型的构建和验证

为了评估 RF 模型预测 NAFLD 的效能, 基于 5 个线粒体自噬特征基因的表达构建了列线图模型 (图 6-A), 校准曲线和决策曲线显示列线图模型具有较准确的预测能力 (图 6-B、C), 可用于预测 NAFLD 的发病率。在 GSE48452 和 GSE63067 数据集的 AUC 值为分别为 0.861 和 0.833, 表明诊断模型能够成功地将 NAFLD 患者与健康人群分离 (图 6-D、E)。

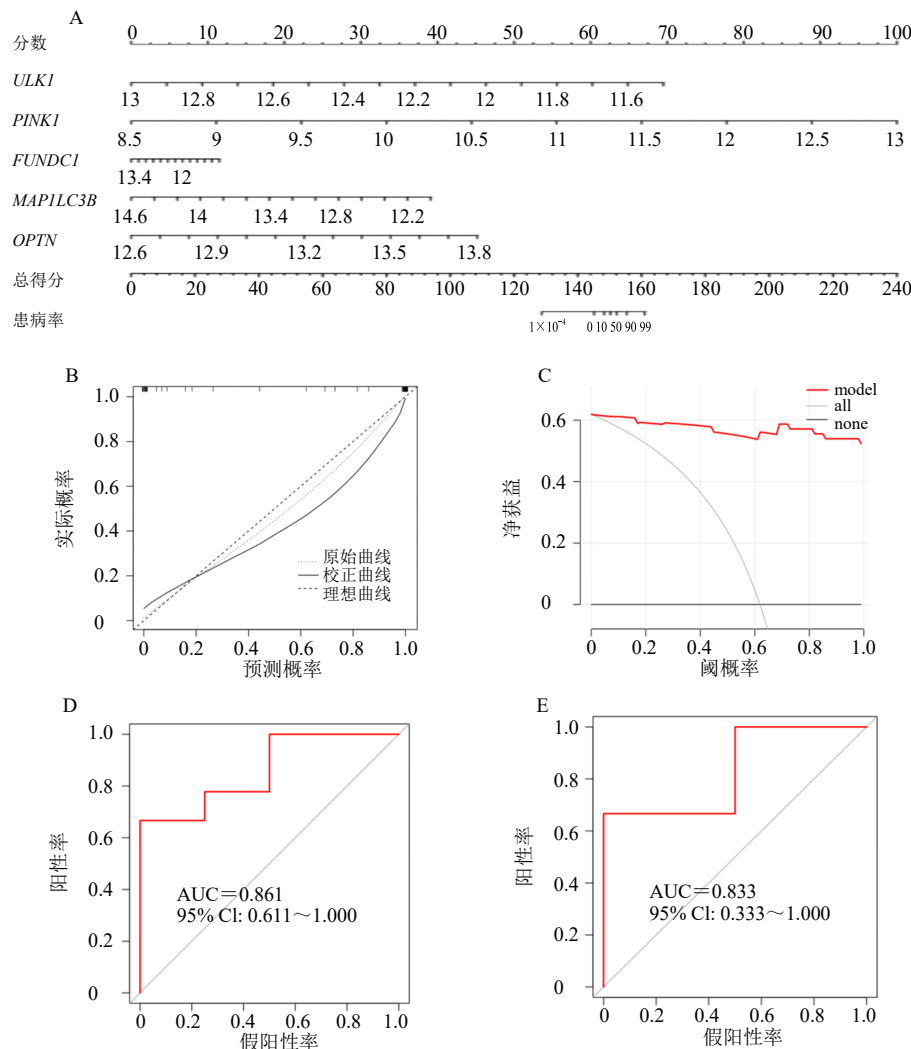
2.7 中药预测结果

经筛选后共获得 71 味中药, 这些中药的功效以

补虚、清热、化痰止咳平喘和活血化瘀为主 (图 7), 四气以寒、温为主, 五味以苦为主, 辅以甘、辛, 归经最多的是肝、肺、脾、胃经 (图 8)。三七被 *PINK1*、*FUNDC1* 和 *MAP1LC3B* 预测到, 川芎、藁本被 *ULK1*、*PINK1* 和 *MAP1LC3B* 预测到。可见其在调控线粒体自噬治疗 NAFLD 方面具有较大的潜力。

3 讨论

NAFLD 是一种高度异质性的疾病, 发病机制目前尚不明确^[16-17]。线粒体在脂肪氧化过程中起关键作用, 并在这个过程中生成活性氧 (reactive oxygen species, ROS), ROS 的过度生成可能会诱发线粒体功能障碍, 损伤肝细胞。线粒体功能障碍



A-列线图模型; B-校正曲线; C-决策曲线; D-GSE48452 数据集的 ROC 曲线; E-GSE63067 数据集的 ROC 曲线。
A-nomograph model; B-calibration curve; C-decision curve; D-ROC curve of GSE48452 data set; E-ROC curve of GSE63067 dataset.

图 6 列线图模型的构建和验证

Fig. 6 Construction and validation of nomogram model

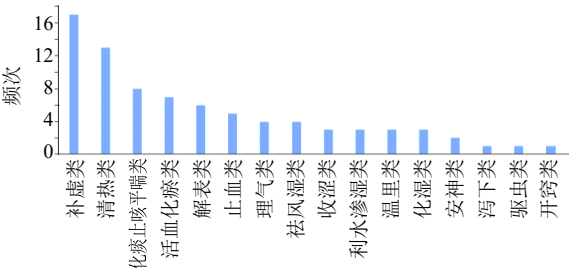


图 7 功效分类频次统计

Fig. 7 Frequency statistics of efficacy classification

相关的脂质代谢改变是 NAFLD 的共同特征, 线粒体功能障碍可加重氧化应激并促进炎症, 从而导致肝细胞进行性死亡和重度 NAFLD, 形成一种恶性循环^[18]。线粒体自噬是自噬的一种特殊形式, 其作

用是降解受损或功能失调的线粒体以维持能量平衡。Moore 等^[19]研究发现 NAFLD 严重程度的增加与线粒体自噬的损害相对应。激活肝细胞线粒体自噬可缓解脂肪堆积、氧化应激和线粒体功能障碍, 改善 NAFLD^[20-21]。目前笔者尚未见 NAFLD 中 MRGs 的生物信息学分析。因此, 本研究通过生物信息学研究 MRGs 在 NAFLD 中的调控作用。

本研究首次全面分析了 MRGs 在健康对照和 NAFLD 患者肝脏组织中的表达谱。两组中存在 14 个 DEMRGs, 其中 *OPTN*、*VPS13C*、*FUNDC1* 等 DEMRGs 在 NAFLD 患者中上调, *MAP1LC3B*、*ULK1*、*TOMM20* 等 DEMRGs 在 NAFLD 患者中下调, 其中一些已被证实与 NAFLD 有关。Wen 等^[22]

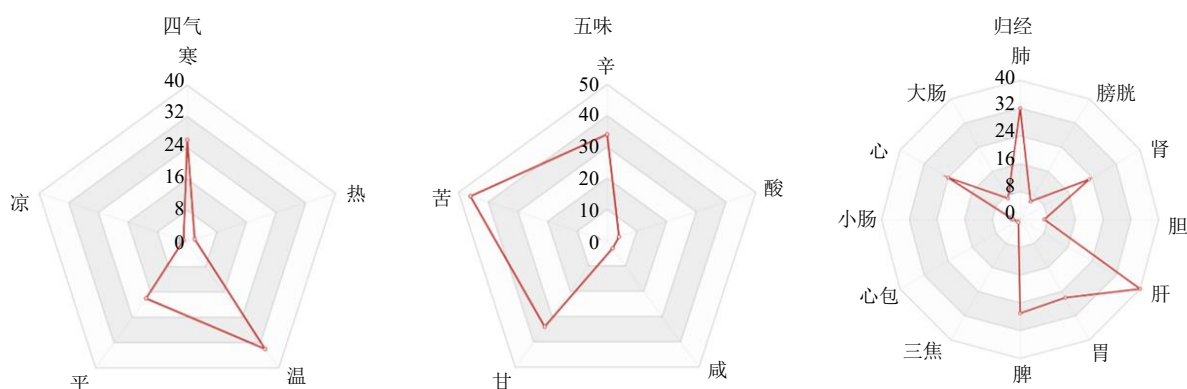


图 8 四气、五味、归经雷达图

Fig. 8 Radar plot of four qi, five flavors, meridian distribution

在棕榈酸诱导的脂肪肝模型中发现 *OPTN* 表达增加, 这与本研究的发现一致。Park 等^[23]发现在 NAFLD 患者中 *MAP1LC3B* 显著低于正常对照, 这与本研究相符。Song 等^[24]在 NAFLD/NASH 患者、NASH 小鼠模型和蛋氨酸胆碱缺乏模拟培养基培养的 HepG2 细胞中均发现 *ULK1* 显著降低, 进一步证实了本研究的结果。*MRGs* 在两组间的表达差异显著, 提示 *MRGs* 在 NAFLD 的发生发展中起着重要作用。随后, 分析了 *DEMGRs* 之间的相关性, 发现它们之间具有显著的协同或拮抗作用, 表明在 NAFLD 的 *DEMGRs* 之间具有相互调控作用。

GO 富集结果显示 14 个 *DEMGRs* 参与了线粒体自噬、线粒体解体和选择性自噬等生物学过程以及它们相关的重要功能, 如泛素蛋白连接酶结合。泛素-蛋白酶体系统和自噬是 2 个相互联系的系统, 共同介导蛋白质水解并协同维持蛋白质质量控制和细胞内稳态^[25-26]。泛素化是线粒体自噬清除细胞器所必需的过程^[27]。泛素-蛋白酶体系统对线粒体自噬的作用主要归因于帕金蛋白^[28]。此外, 泛素蛋白酶体介导的肝脏因子脂肪酸结合蛋白 1 和香叶基香叶基焦磷酸合成酶降解, 均能够抑制脂质代谢, 减轻体内和体外脂质沉积, 改善 NAFLD^[29-30]。KEGG 分析显示, 这些 *DEMGRs* 与线粒体自噬、多种神经退行性疾病、自噬、肌萎缩侧索硬化症、铁死亡、NOD 样受体信号通路有关。线粒体自噬是一种选择性的自噬形式, 在维持神经系统稳态中具有重要作用, 线粒体自噬功能缺陷或失调与肌萎缩侧索硬化症、阿尔茨海默病等神经退行性疾病的发病机制有关^[31-32]。大量研究表明 NAFLD 与神经退行性变和神经炎症密切相关^[33-34]。铁死亡是一种以铁积累和脂质过氧化为特征的细胞死亡, 在 NAFLD 的

发病机制中起着关键的调节作用^[35]。腺病毒 E1B 相互作用蛋白 3 和 Nip3 样蛋白 X 介导的线粒体自噬通过下调线粒体 ROS 抑制铁死亡^[36]。NOD 样受体家族蛋白是一组胞质模式识别受体, 在肥胖及其相关炎症反应的发生和控制中发挥着重要作用^[37]。NOD 样受体家族成员 X1 是 NOD 样受体家族中的一员, 能够通过蛋白质导入线粒体的缺陷或线粒体蛋白导入应激来控制线粒体自噬^[38]。

此外, 基于 *DEMGRs* 的表达水平, 采用无监督聚类分析来阐明 NAFLD 患者不同的线粒体自噬调节模式, 获得 2 种线粒体自噬相关亚型。*ATG5*、*TOMM40*、*TOMM6* 在 C1 亚型中的表达高于 C2 亚型, *VPS13C*、*UBC* 在 C2 亚型中的表达高于 C1 亚型。泛素介导的蛋白水解、同源重组、长时程增强等通路在 C2 亚型中上调。此外, 味觉传导、酪氨酸代谢、Janus 激酶-信号转导及转录激活因子信号通路等途径在 C1 亚型中上调。这些结果表明 NAFLD 的异质性可能与不同的线粒体生物学机制有关。

近年来, 许多机器学习算法被广泛用于预测疾病的发病率^[39-40], 表明多因素分析比单因素分析更准确。本研究建立了 4 种模型, 并对它们的预测能力进行了评估, 发现 RF 模型具有最高的预测效能。随后, 选择 RF 模型中重要性排名前 5 的基因 (*ULK1*、*PINK1*、*FUNDC1*、*MAP1LC3B* 和 *OPTN*) 作为 NAFLD 的线粒体自噬特征基因, 并构建基于这 5 个基因的列线图模型, 校准曲线、决策曲线和 2 个外部数据集均证明 RF 模型可以准确地预测 NAFLD。*ULK1* 是自噬相关基因 (autophagy-related genes, Atg) 家族的 1 个近端激酶, 能够直接磷酸化多个哺乳动物自噬机制的关键调节因子, 在自噬中起着重要作用。*ULK1* 可以通过诱导线粒体自噬

增加肝脏线粒体活性和脂质代谢, 还可以通过自噬或非自噬机制减轻脂质诱导的脂肪毒性和炎症^[41]。*PINK1* 是一种丝氨酸/苏氨酸激酶, 通过帕金森蛋白介导的线粒体自噬来调节线粒体质量控制, 其介导的线粒体自噬在改善代谢功能障碍相关的脂肪性肝病中发挥着不可或缺的作用^[42-43]。*FUNDC1* 是一种线粒体外膜蛋白, 在缺氧条件下诱导线粒体自噬^[44]。*FUNDC1* 缺失会损害线粒体质量并加重饮食诱导肥胖和代谢综合征^[45]。在 NASH 小鼠模型中, 富含果糖、棕榈酸和胆固醇的饮食也会影响 *FUNDC1* 二聚化并促进其降解^[46]。*MAP1LC3B* 是自噬级联的一个组成部分, 与磷脂酰乙醇胺结合后, 对自噬体的形成和扩展至关重要^[47]。*ULK1* 激活对受体蛋白 *FUNDC1* 及其与自噬体蛋白 *MAP1LC3B-II* 的相互作用, 诱导线粒体自噬^[48]。*OPTN* 是一种参与自噬的衔接蛋白, 参与聚集体自噬和线粒体自噬^[49]。Wen 等^[22]利用 siRNA 抑制 HepG2 细胞 *OPTN* 的表达, 结果发现 *OPTN* 基因敲除后脂肪生成效率和促炎性细胞因子水平降低, 表明 *OPTN* 可延缓脂肪肝中的脂肪生成。

中医药在辅助治疗 NAFLD 方面显示出优势^[50]。本研究发现通过调控线粒体自噬特征基因治疗 NAFLD 的潜在中药功效以补虚、清热、化痰止咳平喘和活血化瘀为主, 契合 NAFLD 以脾虚为本, 湿热、痰饮、瘀血为主要病理因素的病机特点^[51]。四气以寒、温为主, 五味以苦为主, 辅以甘、辛, 归经最多的是肝、肺、脾、胃经, 甘温健脾以助脾运, 苦寒燥湿以泄肝脾湿热, 辛能活血化瘀、理气化痰以顺肝性。三七、川芎、藁本可作用于 3 个特征基因, 表明其在调控线粒体自噬治疗 NAFLD 方面具有较大的潜力。Wang 等^[52]发现三七的人参皂苷提取物能够通过促进线粒体自噬作用减轻脂多糖诱导的 NOD 样受体蛋白 3 炎性体激活, 从而防止 NAFLD 的发展。川芎可以改善高脂饮食所致的 NAFLD 小鼠的肝功能和脂肪变程度^[53]。川芎的有效成分川芎嗪能够激活泛醌细胞色素 C 还原酶核心蛋白 2 依赖性线粒体自噬抑制混合谱系激酶结构域样蛋白介导的酒精性肝病肝细胞坏死性凋亡^[54]。藁本的有效成分阿魏酸通过改善 NAFLD 小鼠近端和远端肠屏障减轻肝脏脂质沉积和炎症反应^[55]。藁本的另一活性成分藁本内酯能够调节 *PINK1*/帕金森蛋白促进线粒体自噬, 从而改善缺血性脑卒中后神经元损伤^[56]。

综上所述, 本研究通过多种机器学习和生物信息学方法分析了线粒体自噬相关基因与 NAFLD 的关联, 筛选出了 5 个与线粒体自噬相关的特征基因 (*ULK1*、*PINK1*、*FUNDC1*、*MAP1LC3B*、*OPTN*), 并建立了预测模型, 可为 NAFLD 的诊断、机制研究和潜在治疗靶点提供参考。此外, 本研究进一步预测了能够调控这 5 个特征基因治疗 NAFLD 的中药, 可为 NAFLD 的治疗提供新思路。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Gu S X, Qiao Y F, Liu S S, *et al.* Frontiers and hotspots of adipose tissue and NAFLD: A bibliometric analysis from 2002 to 2022 [J]. *Front Physiol*, 2023, 14: 1278952.
- [2] Chen H L, Zhan Y, Zhang J X, *et al.* The global, regional, and national burden and trends of NAFLD in 204 countries and territories: An analysis from global burden of disease 2019 [J]. *JMIR Public Health Surveill*, 2022, 8(12): e34809.
- [3] Teng M L, Ng C H, Huang D Q, *et al.* Global incidence and prevalence of nonalcoholic fatty liver disease [J]. *Clin Mol Hepatol*, 2023, 29: S32-S42.
- [4] Shi H, Meng S, Qiu J, *et al.* MoAti1 mediates mitophagy by facilitating recruitment of MoAtg8 to promote invasive growth in *Magnaporthe oryzae* [J]. *Mol Plant Pathol*, 2024, 25(3): e13439.
- [5] Urbina-Varela R, Castillo N, Videla L A, *et al.* Impact of mitophagy and mitochondrial unfolded protein response as new adaptive mechanisms underlying old pathologies: Sarcopenia and non-alcoholic fatty liver disease [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(20): 7704.
- [6] Pang L J, Liu K, Liu D J, *et al.* Differential effects of reticulophagy and mitophagy on nonalcoholic fatty liver disease [J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(2): 90.
- [7] Undamatla R, Fagunloye O G, Chen J, *et al.* Reduced mitophagy is an early feature of NAFLD and liver-specific PARKIN knockout hastens the onset of steatosis, inflammation and fibrosis [J]. *Sci Rep*, 2023, 13(1): 7575.
- [8] Dong M Y, Zhang T L, Liang X L, *et al.* Sesamin alleviates lipid accumulation induced by oleic acid via *PINK1*/Parkin-mediated mitophagy in HepG2 cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2024, 708: 149815.
- [9] Cao P, Wang Y, Zhang C, *et al.* Quercetin ameliorates nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) via the promotion of AMPK-mediated hepatic mitophagy [J]. *J Nutr Biochem*, 2023, 120: 109414.
- [10] Xu W, Zhao D X, Huang X W, *et al.* The prognostic value

- and clinical significance of mitophagy-related genes in hepatocellular carcinoma [J]. *Front Genet*, 2022, 13: 917584.
- [11] Su Y, Yu G Y, Li D C, *et al.* Identification of mitophagy-related biomarkers in human osteoporosis based on a machine learning model [J]. *Front Physiol*, 2023, 14: 1289976.
- [12] Cheng L L, Li H L, Zhan H T, *et al.* Alterations of m6A RNA methylation regulators contribute to autophagy and immune infiltration in primary Sjögren's syndrome [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 949206.
- [13] Wilkerson M D, Hayes D N. ConsensusClusterPlus: A class discovery tool with confidence assessments and item tracking [J]. *Bioinformatics*, 2010, 26(12): 1572-1573.
- [14] 钟赣生. 中药学 [M]. 第 4 版. 北京: 中国中医药出版社, 2016.
- [15] 中国药典 [S]. 三部. 2020.
- [16] Xu S W, Wu X M, Wang S C, *et al.* TRIM56 protects against nonalcoholic fatty liver disease by promoting the degradation of fatty acid synthase [J]. *J Clin Invest*, 2024, 134(5): e166149.
- [17] Ding M N, Zhou F, Li Y J, *et al.* *Cassiae Semen* improves non-alcoholic fatty liver disease through autophagy-related pathway [J]. *Chin Herb Med*, 2023, 15(3): 421-429.
- [18] Paoli A, Cerullo G. Investigating the link between ketogenic diet, NAFLD, mitochondria, and oxidative stress: A narrative review [J]. *Antioxidants*, 2023, 12(5): 1065.
- [19] Moore M P, Cunningham R P, Meers G M, *et al.* Compromised hepatic mitochondrial fatty acid oxidation and reduced markers of mitochondrial turnover in human NAFLD [J]. *Hepatology*, 2022, 76(5): 1452-1465.
- [20] Dong Y Z, Yu M H, Wu Y L, *et al.* Hydroxytyrosol promotes the mitochondrial function through activating mitophagy [J]. *Antioxidants*, 2022, 11(5): 893.
- [21] Yao Z C, Li X L, Wang W T, *et al.* Corn peptides attenuate non-alcoholic fatty liver disease via PINK1/Parkin-mediated mitochondrial autophagy [J]. *Food Nutr Res*, 2023, 67: 9547.
- [22] Wen W H, Wu P L, Zhang Y G, *et al.* Comprehensive analysis of NAFLD and the therapeutic target identified [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 704704.
- [23] Park H S, Song J W, Park J H, *et al.* TXNIP/VDUP1 attenuates steatohepatitis via autophagy and fatty acid oxidation [J]. *Autophagy*, 2021, 17(9): 2549-2564.
- [24] Song Y, Yang H, Kim J, *et al.* Gemigliptin, a DPP4 inhibitor, ameliorates nonalcoholic steatohepatitis through AMP-activated protein kinase-independent and ULK1-mediated autophagy [J]. *Mol Metab*, 2023, 78: 101806.
- [25] Bonnet L V, Palandri A, Flores-Martin J B, *et al.* Arginyltransferase 1 modulates p62-driven autophagy via mTORC1/AMPk signaling [J]. *Cell Commun Signal*, 2024, 22(1): 87.
- [26] Cui Z H, Cong M Q, Yin S J, *et al.* Role of protein degradation systems in colorectal cancer [J]. *Cell Death Discov*, 2024, 10(1): 141.
- [27] Kocaturk N M, Peker N, Eberhart K, *et al.* Novel protein complexes containing autophagy and UPS components regulate proteasome-dependent PARK2 recruitment onto mitochondria and PARK2-PARK6 activity during mitophagy [J]. *Cell Death Dis*, 2022, 13(11): 947.
- [28] Sulkshane P, Ram J, Thakur A, *et al.* Ubiquitination and receptor-mediated mitophagy converge to eliminate oxidation-damaged mitochondria during hypoxia [J]. *Redox Biol*, 2021, 45: 102047.
- [29] You H, Wen X, Wang X C, *et al.* Derlin-1 ameliorates nonalcoholic hepatic steatosis by promoting ubiquitylation and degradation of FABP1 [J]. *Free Radic Biol Med*, 2023, 207: 260-271.
- [30] Ye J, Qi Y L, Chen J, *et al.* Alleviation of hepatic steatosis by 4-azidophlorizin via the degradation of geranylgeranyl diphosphate synthase by the ubiquitin-proteasome pathway *in vivo* and *in vitro* [J]. *Adv Biol*, 2023, 7(9): e2200150.
- [31] Markaki M, Tsagkari D, Tavernarakis N. Mitophagy and long-term neuronal homeostasis [J]. *J Cell Sci*, 2023, 136(11): jcs260638.
- [32] Yang K, Yan Y Q, Yu A N, *et al.* Mitophagy in neurodegenerative disease pathogenesis [J]. *Neural Regen Res*, 2024, 19(5): 998-1005.
- [33] Mondal A, Bose D, Saha P, *et al.* Lipocalin 2 induces neuroinflammation and blood-brain barrier dysfunction through liver-brain axis in murine model of nonalcoholic steatohepatitis [J]. *J Neuroinflammation*, 2020, 17(1): 201.
- [34] Kelty T J, Dashek R J, Arnold W D, *et al.* Emerging links between nonalcoholic fatty liver disease and neurodegeneration [J]. *Semin Liver Dis*, 2023, 43(1): 77-88.
- [35] Zhao S N, Guo Y, Yin X Z. Lipid peroxidation in ferroptosis and association with nonalcoholic fatty liver disease [J]. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2023, 28(12): 332.
- [36] Yamashita S I, Sugiura Y, Matsuoka Y, *et al.* Mitophagy mediated by BNIP3 and NIX protects against ferroptosis by downregulating mitochondrial reactive oxygen species [J]. *Cell Death Differ*, 2024, 31(5): 651-661.

- [37] Bauer S, Hezinger L, Rexhepi F, *et al.* NOD-like receptors-emerging links to obesity and associated morbidities [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(10): 8595.
- [38] Bi P Y, Killackey S A, Schweizer L, *et al.* NLRX1: Versatile functions of a mitochondrial NLR protein that controls mitophagy [J]. *Biomed J*, 2024, 47(1): 100635.
- [39] Zhang H, Nagai N G, Hao L, *et al.* Identification of key genes and immunological features associated with copper metabolism in Parkinson's disease by bioinformatics analysis [J]. *Mol Neurobiol*, 2024, 61(2): 799-811.
- [40] 高松林, 覃雁, 张鹏, 等. 基于生物信息学分析活动期溃疡性结肠炎铜死亡相关基因及调控中药预测 [J]. *中草药*, 2024, 55(5): 1627-1640.
- [41] Rajak S, Raza S, Sinha R A. ULK1 signaling in the liver: Autophagy dependent and independent actions [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2022, 10: 836021.
- [42] Eldeeb M A, Bayne A N, Fallahi A, *et al.* Tom20 gates PINK1 activity and mediates its tethering of the TOM and TIM23 translocases upon mitochondrial stress [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2024, 121(10): e2313540121.
- [43] Tsuji A, Yoshikawa S, Ikeda Y, *et al.* Tactics with prebiotics for the treatment of metabolic dysfunction-associated fatty liver disease via the improvement of mitophagy [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(6): 5465.
- [44] Ye H X, Li D Q, Wei X, *et al.* Focused low-intensity pulsed ultrasound alleviates osteoarthritis via restoring impaired FUNDC1-mediated mitophagy [J]. *iScience*, 2023, 26(10): 107772.
- [45] Wu H, Wang Y, Li W H, *et al.* Deficiency of mitophagy receptor FUNDC1 impairs mitochondrial quality and aggravates dietary-induced obesity and metabolic syndrome [J]. *Autophagy*, 2019, 15(11): 1882-1898.
- [46] Chen L B, Zhang Q P, Meng Y Y, *et al.* Saturated fatty acids increase LPI to reduce FUNDC1 dimerization and stability and mitochondrial function [J]. *EMBO Rep*, 2023, 24(4): e54731.
- [47] Parham L R, Williams P A, Katada K, *et al.* IGF2BP1/IMP1 deletion enhances a facultative stem cell state via regulation of MAP1LC3B [J]. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 2024, 17(3): 439-451.
- [48] Singh B K, Sinha R A, Tripathi M, *et al.* Thyroid hormone receptor and ERR α coordinately regulate mitochondrial fission, mitophagy, biogenesis, and function [J]. *Sci Signal*, 2018, 11(536): eaam5855.
- [49] Wen D, Ji Y X, Li Y Y, *et al.* OPTN gene therapy increases autophagy and protects mitochondria in SOD1-G93A-expressing transgenic mice and cells [J]. *FEBS J*, 2024, 291(4): 795-813.
- [50] 高风, 郭丽君, 黄萍萍, 等. 清热利湿类中成药治疗非酒精性脂肪性肝病的网状 Meta 分析 [J]. *中草药*, 2023, 54(22): 7511-7525.
- [51] 张莉, 季光. 非酒精性脂肪性肝病中医诊疗专家共识 (2023) [J]. *中国中西医结合消化杂志*, 2024, 32(1): 1-7.
- [52] Wang F, Park J S, Ma Y Q, *et al.* Ginseng saponin enriched in Rh $_1$ and Rg $_2$ ameliorates nonalcoholic fatty liver disease by inhibiting inflammasome activation [J]. *Nutrients*, 2021, 13(3): 856.
- [53] 王玉平, 龚瑾, 李沙沙, 等. 川芎改善非酒精性脂肪性肝炎的作用机制 [J]. *暨南大学学报: 自然科学与医学版*, 2022, 43(4): 382-392.
- [54] Zhou Y, Wu R M, Wang X Q, *et al.* Activation of UQCRC2-dependent mitophagy by tetramethylpyrazine inhibits MLKL-mediated hepatocyte necroptosis in alcoholic liver disease [J]. *Free Radic Biol Med*, 2022, 179: 301-316.
- [55] Fu J J, Yang J Y, He L Y, *et al.* Ferulic acid alleviates hepatic lipid accumulation and inflammation by improving proximal and distal intestinal barriers in NAFLD mice [J]. *Tohoku J Exp Med*, 2023, 260(2): 149-163.
- [56] Mao Z, Tian L, Liu J, *et al.* Ligustilide ameliorates hippocampal neuronal injury after cerebral ischemia reperfusion through activating PINK1/Parkin-dependent mitophagy [J]. *Phytomedicine*, 2022, 101: 154111.

[责任编辑 潘明佳]