

# 中性粒细胞胞外陷阱在溃疡性结肠炎中的作用



孟秋月<sup>1, 2#</sup>, 袁一帆<sup>3#</sup>, 李娜<sup>1, 2#</sup>, 卢嘉莉<sup>1, 2</sup>, 叶梅<sup>1, 2</sup>

1. 武汉大学中南医院消化内科 (武汉 430071)
2. 湖北省肠道与结肠疾病临床研究中心/湖北省肠道与结肠疾病重点实验室 (武汉 430071)
3. 四川大学华西医院老年病科/国家老年疾病临床医学研究中心 (成都 610041)

**【摘要】目的** 探究中性粒细胞胞外陷阱 (neutrophil extracellular traps, NETs) 在溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 中的作用机制。**方法** 从 GEO 数据库下载 UC 患者和正常对照的 RNA 数据, 筛选差异表达基因, 将筛选的基因与先前报道的 NETs 相关基因相交, 用于 GO、KEGG 和 GSEA 等功能富集分析。利用机器学习确定关键基因, 以进一步分析免疫浸润和生物功能。基于关键基因构建诊断模型, 并进行外部数据集验证, 鉴定 NETs 相关分子亚型, 利用 DGIdb 数据库预测靶向关键基因的药物。**结果** 共筛选出 38 个 NETs 相关的差异表达基因, *F3*、*MME*、*PTAFR* 和 *SLC25A37* 为关键基因, 这些基因的 mRNA 表达水平升高, 与炎症信号通路有关, 显示出良好的诊断效能。鉴定出的两种独特 NETs 相关分子亚型展现出不同的免疫特性和临床特征。22 种靶向关键基因的药物可能成为 UC 的潜在治疗药物。**结论** NETs 在 UC 患者中表达升高, 在疾病发生发展过程中起促炎作用。*F3*、*MME*、*PTAFR* 和 *SLC25A37* 关键基因可能参与 UC 的病理过程, 鉴定出的两个 NETs 亚型可为 UC 的临床治疗提供一定参考。

**【关键词】** 中性粒细胞胞外陷阱; 溃疡性结肠炎; 转录组测序; 机器学习; 分子亚型

**【中图分类号】** R 574.62 **【文献标识码】** A

## The role of neutrophil extracellular traps in ulcerative colitis

MENG Qiuyue<sup>1, 2#</sup>, YUAN Yifan<sup>3#</sup>, LI Na<sup>1, 2#</sup>, LU Jiali<sup>1, 2</sup>, YE Mei<sup>1, 2</sup>

1. Department of Gastroenterology, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan 430071, China
2. Hubei Provincial Clinical Research Center for Intestinal and Colorectal Diseases, Hubei Key Laboratory of Intestinal and Colorectal Diseases, Wuhan 430071, China
3. Department of Gerontology and Geriatrics, West China Hospital, Sichuan University, China National Clinical Research Center for Geriatric Medicine, Chengdu 610041, China

<sup>#</sup>Co-first authors: MENG Qiuyue, YUAN Yifan and LI Na

Corresponding author: YE Mei, Email: wumeiye08@163.com

**【Abstract】Objective** To investigate the role of neutrophil extracellular traps (NETs) in the pathogenesis of ulcerative colitis (UC). **Methods** RNA data from UC patients and normal controls were downloaded from the GEO database to screen for differential expression genes (DEGs), intersecting the screened genes with previously reported NETs-associated genes for functional

DOI: 10.12173/j.issn.1004-5511.202412002

<sup>#</sup> 为共同第一作者

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (82470556)

通信作者: 叶梅, 博士, 教授, 主任医师, 博士研究生导师, Email: wumeiye08@163.com

enrichment assays such as GO, KEGG, and GSEA. Use machine learning to identify key genes for further analysis of immune infiltration and biological function. Diagnostic models were constructed based on key genes and validated against external data sets, and NETs associated molecular subtypes were identified. Prediction of drugs targeting key genes using DGIdb database. **Results** A total of 38 NETs-related DEGs were screened. *F3*, *MME*, *PTAFR*, and *SLC25A37* were identified as key genes, with elevated levels of mRNA expression, and were associated with inflammatory signaling pathways and exhibited remarkable diagnostic efficacy. Two unique NETs-related subtypes derived from key genes had distinct immune and clinical characteristics. 22 targeted drugs might become potential therapeutic agents for UC. **Conclusion** NETs expression is elevated in UC patients and plays a pro-inflammatory role in disease progression. *F3*, *MME*, *PTAFR*, and *SLC25A37* were identified as potential contributors to the pathogenesis of UC. The two identified subtypes of NETs can provide some reference for the clinical treatment of UC.

**【Keywords】** Neutrophil extracellular traps; Ulcerative colitis; Single-cell and bulk RNA sequencing; Machine learning; Molecular classification

溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 是炎症性肠病的一种主要亚型, 其特征是起源于直肠并逐渐向近端蔓延的连续的黏膜及黏膜下病变, 主要发病于 20~49 岁的人群。典型症状为黏液脓血便, 并伴有腹泻、腹痛、里急后重等, 严重者可出现发热、体重下降等全身性症状。约 27% 的患者有肠外受累, 如关节、皮肤黏膜、眼部、肝脏、胆道系统病变和血栓栓塞性疾病<sup>[1-3]</sup>。UC 的病因和发病机制仍不完全清楚, 主要受环境、遗传和免疫系统失调等因素的综合影响。中性粒细胞作为肠道固有免疫的重要组成部分, 通常最先聚集在炎症部位, 发挥抗菌和抗炎作用<sup>[4]</sup>。组织病理学显示, UC 患者肠黏膜的中性粒细胞浸润表明肠道内稳态被破坏, 可能是 UC 的关键病理生理过程。中性粒细胞胞外陷阱 (neutrophil extracellular traps, NETs) 于 2004 年首次被发现, 它由细胞外染色质结构组成, 这些染色质结构被组蛋白和各种颗粒蛋白装饰<sup>[5]</sup>。中性粒细胞通过产生活性氧、释放裂解酶和部署 NETs 来增强其抗菌功能。然而, 过多的 NETs 形成会损害周围正常组织<sup>[6]</sup>。研究表明, NETs 失调参与多种自身免疫性疾病, 如系统性红斑狼疮、牛皮癣、类风湿关节炎和 UC<sup>[7-9]</sup>。UC 患者结肠活检中 NETs 相关蛋白水平升高<sup>[10]</sup>, REDD1/NETs/IL-1 轴在 UC 的发病中起关键作用<sup>[11]</sup>, NETs 通过肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) 促进 UC 炎症发展<sup>[12]</sup>。此外, NETs 会损害肠道屏障, 导致细菌易位和肠道炎症。提示 NETs 可能参与 UC 发病, 但具体机制尚不完全明确。本研究使用

RNA 测序数据来探索 NETs 在 UC 中的潜在作用, 通过机器学习识别关键基因并构建诊断模型, 分析这些关键基因的表达谱来分类与 NETs 相关的独特亚型, 探索 NETs 在 UC 中可能的作用机制, 为 UC 疾病诊断和个性化治疗提供参考。

## 1 资料与方法

### 1.1 微阵列数据集和 NETs 相关基因

本研究数据来源于 Gene Expression Omnibus (GEO) 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>), 包括 GSE116222、GSE87466、GSE16879、GSE73661 和 GSE206285 数据集。GSE116222 包含来自结肠活检的单细胞 RNA 测序 (scRNA-seq), 包括 3 例健康个体 (健康组) 和 3 例 UC 患者病变区域 (炎症组) 的样本。GSE87466 纳入 87 例 UC 患者和 21 例正常对照, GSE16879 纳入 24 例未使用生物制剂的 UC 患者和 6 例正常对照。GSE73661 包含 44 例使用维得利珠单抗 (VDZ) 治疗的 UC 患者, 23 例使用英夫利昔单抗 (IFX) 治疗的 UC 患者和 12 例正常对照。GSE206285 包括 364 名接受乌司奴单抗 (UST) 治疗的 UC 患者, 186 名接受安慰剂治疗的患者和 18 名健康对照者。其中, 数据集 GSE87466 和 GSE73661 仅使用基线数据。NETs 相关基因 (NRGs) 来源于 Zhang 等<sup>[13]</sup> 在癌症中鉴定的 69 个 NRGs, 其整合了 NETs 在多种免疫和相关疾病中的基因, 主要包括刺激 NETs 形成的配体和受体、下游相关信号以及鉴定出的黏附在 NETs 框架下的分子。本研究的设计流程图见附件图 1。

1.2 scRNA-seq数据处理与分析

使用 R 语言 Seurat 包处理 scRNA-seq 数据，质控标准为核糖体基因大于 3%，线粒体基因小于 15%，红细胞基因小于 0.1%，细胞表达基因小于 7 500 个。使用 harmony 包去除批次效应，使用 ScaleData 函数执行数据规范化。随后进行主成分分析（principle component analysis, PCA），使用 RunUMAP 函数降维。通过 FindClusters 函数（分辨率设置为 0.8）实现细胞聚类，使用 SingleR 包进行细胞类型注释。使用 FindAllMarkers 函数在不同的集群中识别标记基因。从 MSigDB 数据库（<http://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/index.jsp>）提取 hallmark 通路，使用 GSVA 包对这些通路评分，并用 pheatmap 包进行可视化。

1.3 差异表达基因的数据处理与鉴定

通过 R 语言 sva 包完成 RNA 测序的数据集整合，用 limma 包去除批次效应，并用 FactoMineR 和 factoextra 包生成 PCA 图来评估<sup>[14]</sup>。为减少异常值的影响，使用 preprocessCore 包进行数据归一化，使用 limma 包检测差异表达基因（differential expression genes, DEGs），调整  $P$  值  $< 0.05$ ，绝对对数倍变化  $> 0.5$ 。利用火山图和热图将 DEGs 可视化。将 DEGs 与 NRGs 相交的子集定义为 DE-NRGs，并使用维恩图显示。

1.4 功能富集分析及蛋白-蛋白相互作用网络构建

使用 R 语言 clusterProfiler 包进行 GO 分析和 KEGG 通路分析，以及单基因基因集富集分析（gene set enrichment analysis, GSEA）。利用 GSVA 包进行基因集变异分析（gene set variation analysis, GSVA），确定不同亚型之间生物学途径的差异。使用 STRING 数据库（<https://string-db.org/>）构建 PPI 网络。

1.5 机器学习

使用两种机器学习方法识别潜在的关键基因。使用 R 语言 glmnet 和 randomForest 包分别进

行 Lasso 回归和随机森林算法<sup>[15]</sup>。通过这两个基因群的交集确定关键基因，并通过 circlize 包进行可视化。

1.6 关键基因的qRT-PCR验证

从武汉大学中南医院招募了 16 例确诊为活动性 UC 的患者，所有 UC 患者都诊断明确，并均未接受免疫抑制剂、类固醇或生物制剂的治疗。UC 患者的结肠黏膜组织在内镜手术或手术中取得并保存在液氮中。同时选取 16 例年龄和性别匹配的健康志愿者作为对照组。本研究已获得武汉大学中南医院医学伦理委员会批准（批号：科研论 [2022011K]）。

使用 TRIzol 试剂（Invitrogen，美国）从结肠黏膜组织中提取总 RNA，使用 TOYOBO ReverTra Ace 试剂盒（TOYOBO，日本），按照制造商的说明将每个 RNA 样品转化为 cDNA。使用 UltraSYBR 混合物（CWBIO，中国）进行 qRT-PCR，用 LightCycler96 实时荧光 PCR 仪（Roche，美国）进行 mRNA 表达的定量。采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  定量方法，以人 GAPDH 为内参。引物由中国武汉青岛生物科技有限公司生产，引物序列见表 1。

1.7 免疫浸润分析

ssGSEA 是一种广泛应用于免疫浸润分析的技术。通过 R 语言 GSVA 包实现 ssGSEA 功能，评估 UC 和对照样品的免疫学特性。使用 ggplot2 包将关键基因与免疫细胞浸润的相关性可视化，重点关注有显著相关性的免疫细胞（ $P < 0.05$ ）。

1.8 诊断模型的构建与验证

采用 mlr3 框架构建 8 种分类模型（逻辑回归、LDA、SVM、朴素贝叶斯、KNN、决策树、随机森林和 XGBoost）。模型参数设置如下：随机森林包含 1 000 棵决策树，XGBoost 设置 100 轮迭代和 0.3 学习率，SVM 使用径向基核函数（ $C=1$ ,  $\gamma=0.1$ ）。通过 5 折交叉验证重复 10 次评估模型性能，采用分层抽样保持类别平衡。最终选择交叉验证 AUC 值最高的模型进行

表1 引物序列  
Table 1. Primer sequence

| 基因       | 物种 | 正向引物 (5'→3')           | 反向引物 (5'→3')            |
|----------|----|------------------------|-------------------------|
| F3       | 人  | CCCAAACCCGTCATCAAGTC   | CCAAGTACGTCTGCTTCACAT   |
| MME      | 人  | TGGATCTTGTAAGCAGCCTCA  | GCACAACGTCTCCAAGTTGC    |
| PTAFR    | 人  | GTGCTCGGGGTCAATTGCTAAT | GCCCTGGTTTTTGCTAGTAGACA |
| SLC25A37 | 人  | GATGGGGACAGCCGAGATG    | ACCGGGTACATGACCGAGT     |
| GAPDH    | 人  | GTCTCCTCTGACTTCAACAGCG | ACCACCCTGTGCTGTAGCCAA   |

外部验证,使用 pROC 包计算测试集 AUC 及其 95%CI。

1.9 NETs相关基因表达亚型的鉴定

数据准备:从 UC 患者基线期(Week 0)基因表达矩阵中提取目标基因,进行 log2 转化和标准化处理。采用非负矩阵分解(NMF)对基因表达数据进行多秩分析(k=1-10),通过 100 次迭代计算各秩的 Cophenetic 相关系数以评估聚类稳定性。选择 Cophenetic 值首次显著下降前的秩(k=2)作为最佳聚类数。使用 brunet 算法构建 k=2 的分解模型,迭代 100 次至收敛。根据系数矩阵将样本划分为 2 种表达亚型。共识矩阵热图:通过 consensusmap 函数展示样本共聚类概率,矩阵块状结构反映亚型内一致性。采用 Wilcoxon 检验评估亚型间连续变量(如发病时间)差异,卡方检验分析分类变量差异。通过 MCP-counter 算法计算免疫细胞丰度,利用热图及箱线图可视化亚型间浸润差异。

1.10 药物预测

DGIdb (Drug-Gene Interaction Database) 是一个包含基因、基因产物、药物和药物-基因相互作用的在线数据库<sup>[16]</sup>。利用该数据库预测针对关键基因的潜在药物。

1.11 统计学分析

使用 R 4.2.2 软件进行统计学分析。采用配对 *t* 检验评估 UC 组与对照组靶基因相对 mRNA 表达水平的差异。采用 Wilcoxon 检验评估 UC 两种亚型之间连续变量的差异。采用 Spearman 相关分析来评价相关性。以 *P* < 0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 NRGs的scRNA-seq数据分析、富集分析和细胞类型特异性分析

从 GSE116222 数据集中获得 UC 患者和健康志愿者结肠活检样本的 scRNA-seq 数据。通过降维和 UMAP 可视化,鉴定了 18 个细胞簇,并将其注释为 6 种细胞类型,包括上皮细胞、自然杀伤细胞(natural killer, NK)细胞、普通髓系祖细胞、巨噬细胞、T 细胞和 B 细胞。随后,对每种细胞类型的标记基因进行鉴定,并描绘出每种细胞类型中表达水平最高和最低的前 5 个基因(附件图 2)。检测 NRGs 在各细胞类型中的表达水平,与其他细胞类型相比,巨噬细胞中 NRGs 的表达量最多,根据 NRGs 的细胞个体表达相对于各自细胞类别中的平均表达水平将细胞分为高分组和低分组,结果显示,免疫细胞在高分组中占主导地位(图 1)。

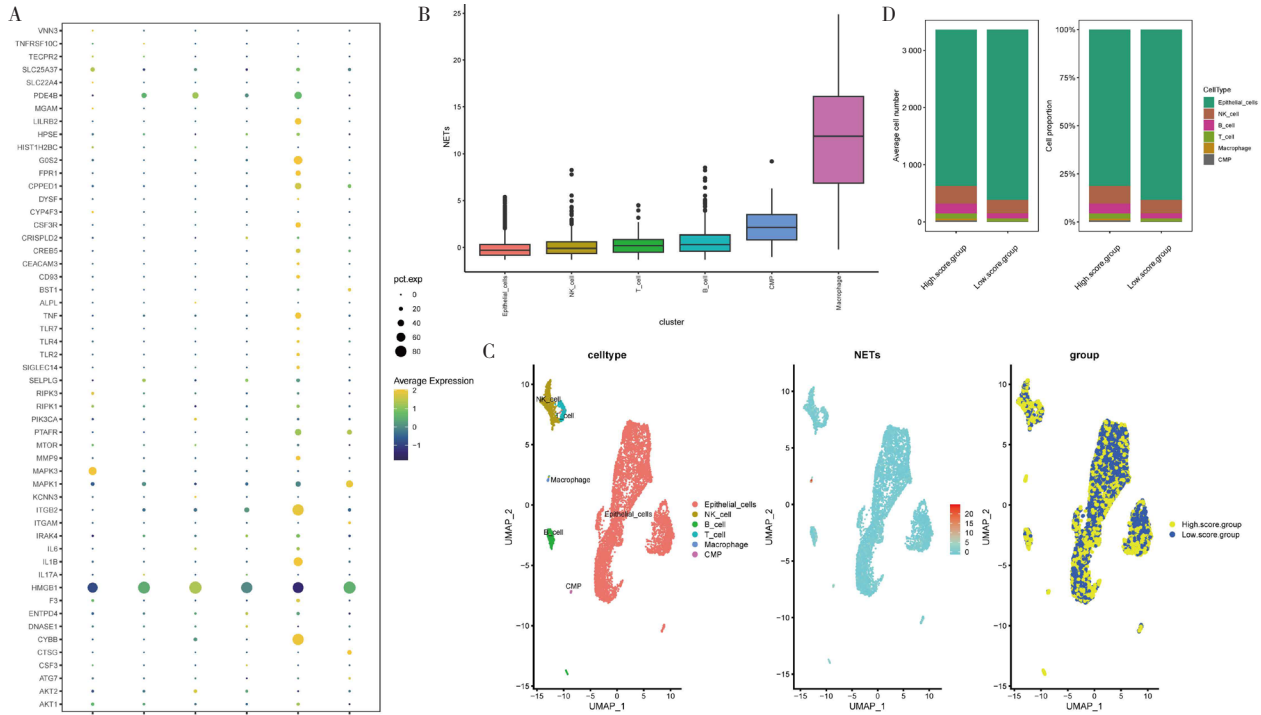


图1 单细胞亚群水平的NETs相关基因分析

Figure 1. Analysis of NETs-related genes at the single-cell subpopulation level

注: A.不同细胞类型NETs相关基因表达水平点图; B.不同细胞类型NETs相关基因表达箱式图; C.不同细胞类型中NRGs表达水平和NETs评分 UMAP图; D.NETs评分高、低组中不同细胞类型的平均细胞数及相对比例。

2.2 DEGs筛选及功能富集分析

去除 GSE87466 和 GSE16879 的批次效应后，得到 138 例样本的数据集，对数据进行标准化，在 UC 和对照样本之间共鉴定出 3 278 个 DEGs，其中包括 1 831 个上调基因和 1 447 个下调基因，热图显示前 20 个上调和下调的基因（图 2）。

GO 分析显示，与细胞因子产生、受体配体活性、含胶原的细胞外基质、信号受体激活剂活性、质膜外侧和细胞黏附相关的 DEGs 显著富集，KEGG 分析显示细胞黏附分子、趋化因子信号通路和细胞因子 - 细胞因子受体相互作用的通路显著富集（附件图 3）。

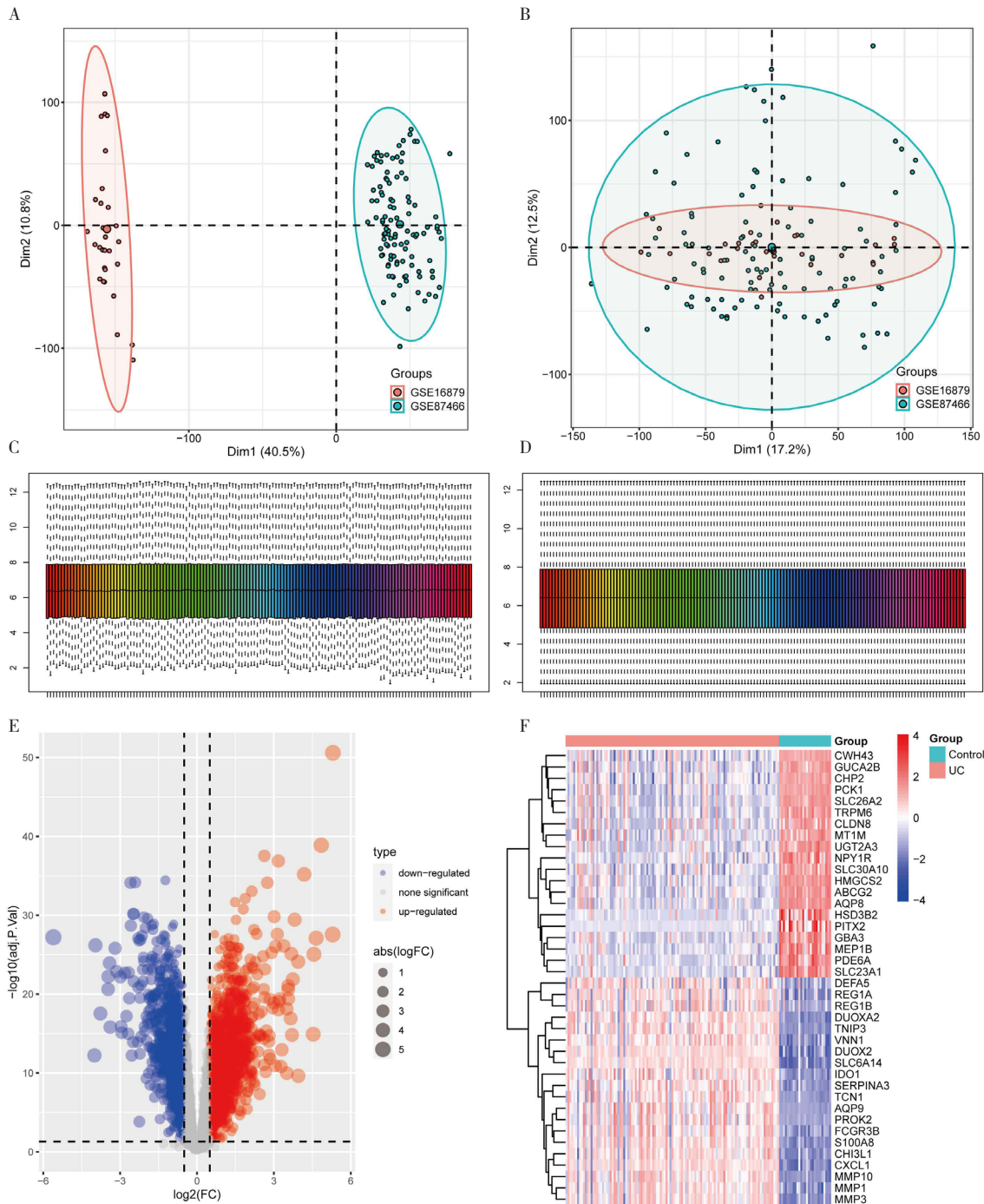


图2 筛选常规转录组测序数据集的差异表达基因

Figure 2. Screening for DEGs in conventional transcriptome sequencing datasets

注：A.整合数据集GSE87466并去除批次效应；B.整合数据集GSE16879并去除批次效应；C.对整合数据集GSE87466进行标准化处理；D.对整合数据集GSE16879进行标准化处理；E.绘制火山图对DEGs进行可视化；F.热图显示了差异表达基因。

2.3 DE-NRGs的选择与分析

在 UC 组与对照组之间共筛选出 38 个 DE-NRGs, 除 SLC22A4 外, UC 组中所有基因均上调 (附件图 4)。功能分析表明, DE-NRGs 在白细胞迁移、促炎细胞因子产生、分泌颗粒膜、免疫受

体活性、细胞因子-细胞因子受体相互作用中富集。KEGG 富集分析显示, 与疟疾、NETs 形成、利什曼病、军团菌病和金黄色葡萄球菌感染相关的通路显著富集 (图 3)。使用 STRING 数据库生成 38 个 DE-NRGs 的 PPI 网络 (附件图 5)。

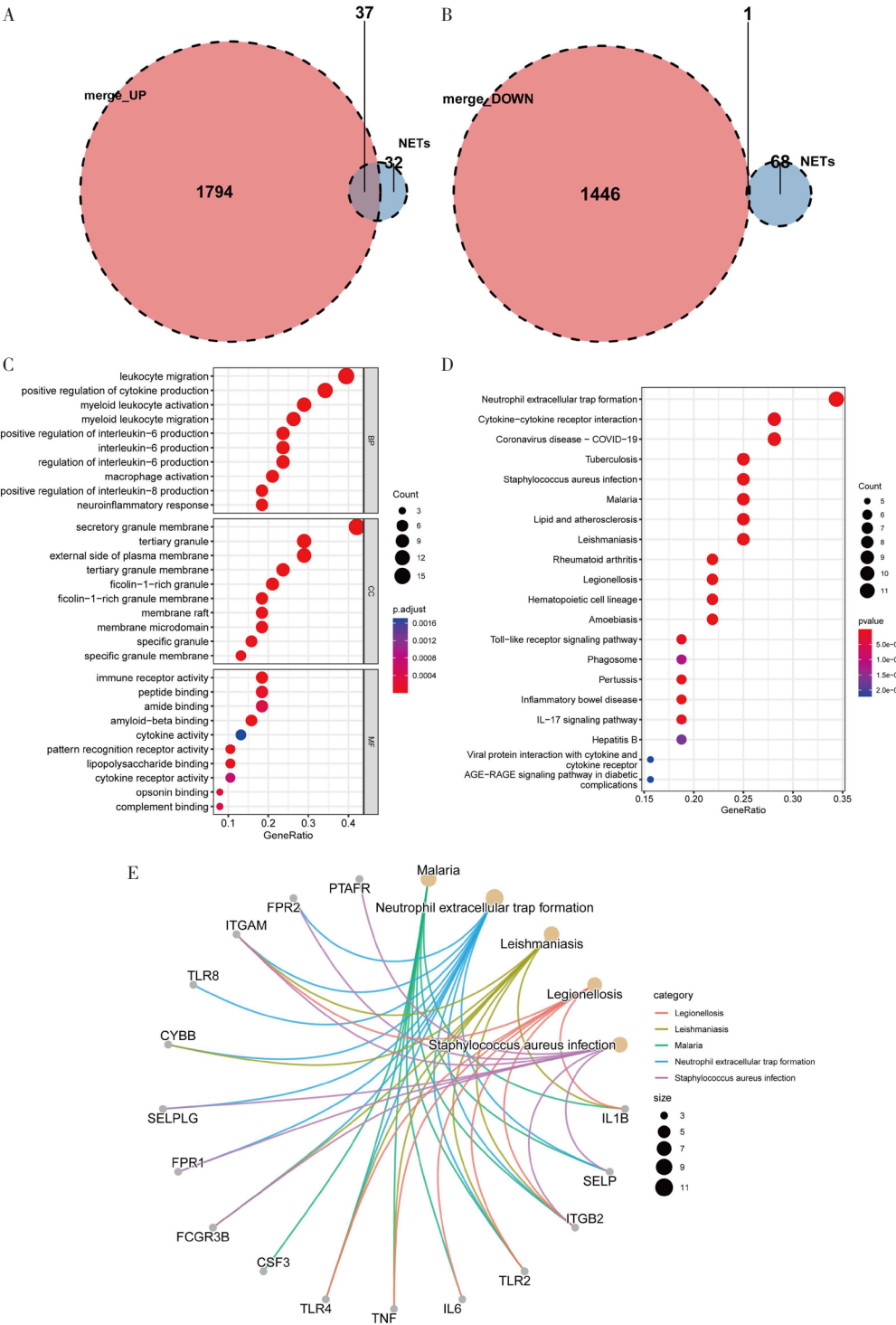


图3 NETs相关差异表达基因的鉴定和功能分析

Figure 3. Identification and functional analysis of DEGs related with NETs

注: A.维恩图显示了NETs相关基因与表达上调基因的交集; B.维恩图显示了NETs相关基因与表达下调基因的交集; C.DE-NRGs的GO富集分析; D.DE-NRGs的KEGG富集分析; E.KEGG分析中富集最显著的5条通路与基因的对应关系。

2.4 关键DE-NRGs的选择与分析

应用 Lasso 回归和随机森林算法检测 DE-NRGs 的特征，分别筛选出 10 个和 15 个基因，其中重叠的 4 个基因 *SLC25A37*、*F3*、*PTAFR* 和 *MME* 被鉴定为关键基因，它们之间存在显著的正相关（图4）。收集 16 例 UC 患者和 16 例健康志愿者的肠黏膜样本进行 qRT-PCR 分析，结果显示，UC 患者中关键基因的 mRNA 表达水平较健康志愿者显著增加（图 5）。

2.5 免疫浸润及单基因GSEA分析

免疫浸润分析显示，除 CD56dim NK 细胞外，

大多数浸润性免疫细胞与 UC 之间存在显著的正相关，UC 组中 CD56dim NK 细胞的丰度较对照组更低，而其他免疫细胞的丰度水平均较高，4 个关键基因与大多数免疫细胞（如中性粒细胞、单核细胞和巨噬细胞）的浸润呈较强的正相关，与 CD56dim NK 细胞浸润呈负相关（图 6）。单基因 GSEA 分析显示关键基因与细胞因子信号、白细胞介素信号、细胞外基质组织和胶原形成相关的通路存在正相关，与呼吸电子传递呈负相关（图 7）。

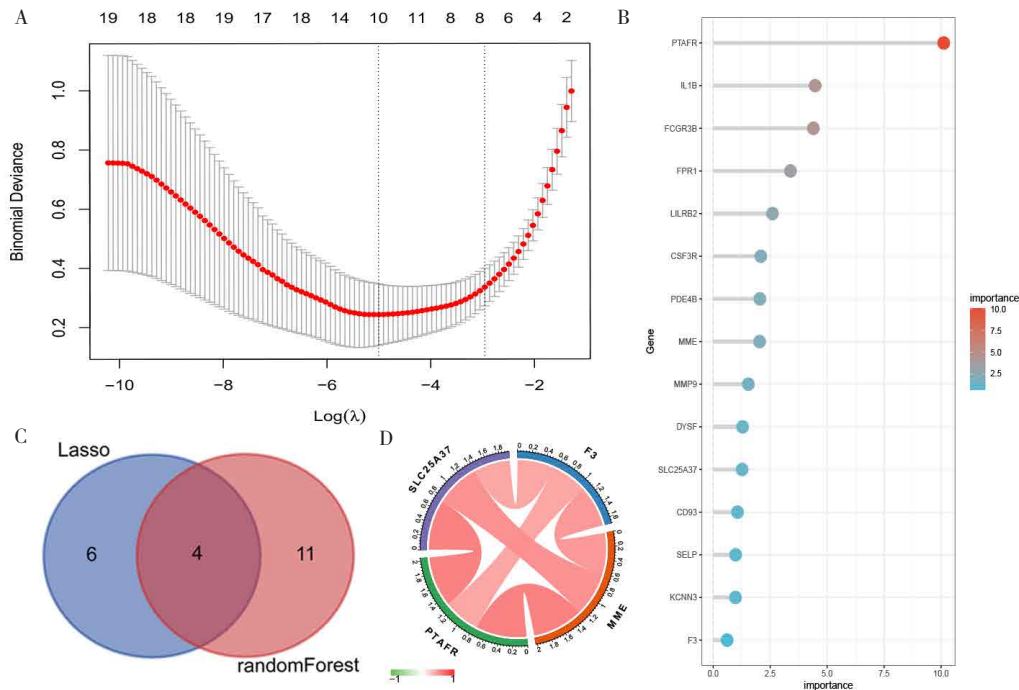


图4 NETs相关关键基因的鉴定

Figure 4. Identification of key genes associated with NETs

注：A.Lasso回归检测DE-NRGs中的特征基因；B.随机森林算法检测DE-NRGs中的特征基因；C.NETs相关关键基因；D.NETs相关关键基因相关性分析。

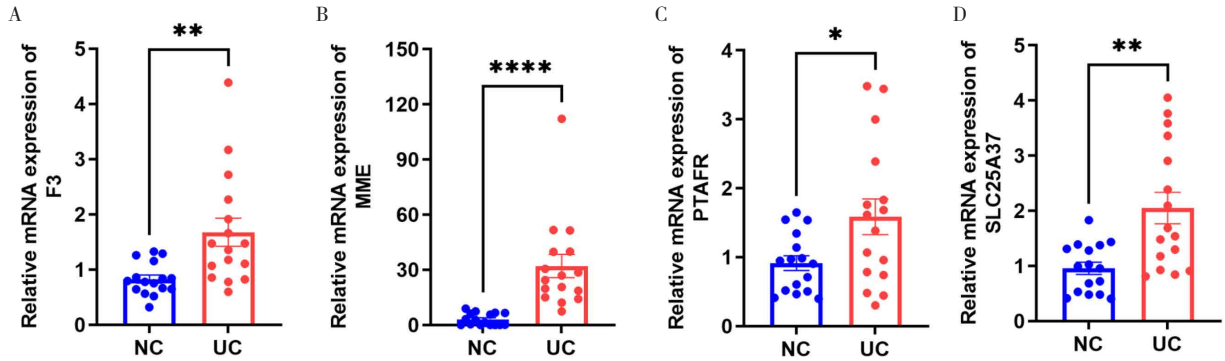
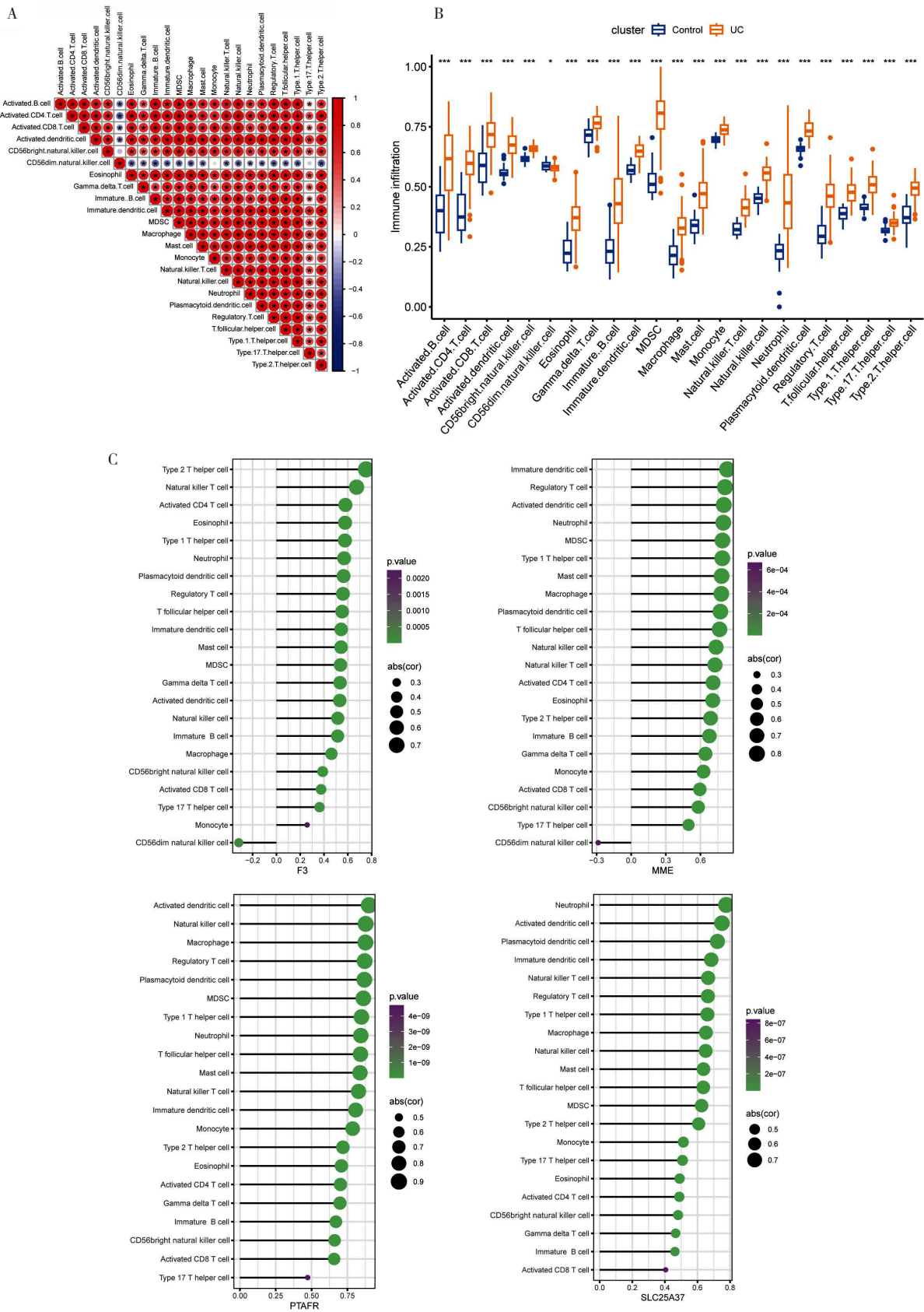


图5 在人体标本中验证关键基因的mRNA表达

Figure 5. mRNA expression of key genes in human specimens

注：A.*F3*在UC和正常对照的mRNA表达水平；B.*MME*在UC和正常对照的mRNA表达水平；C.*PTAFR*在UC和正常对照的mRNA表达水平；D.*SLC25A37*在UC和正常对照的mRNA表达水平；\* $P<0.05$ ，\*\* $P<0.01$ ，\*\*\*\* $P<0.0001$ 。



注：A.UC患者免疫浸润细胞相关性热图；B.UC组与对照组23个免疫细胞的浸润差异；C.4个关键基因与免疫细胞的相关性；\* $P<0.05$ ，\*\* $P<0.01$ ，\*\*\* $P<0.001$ 。

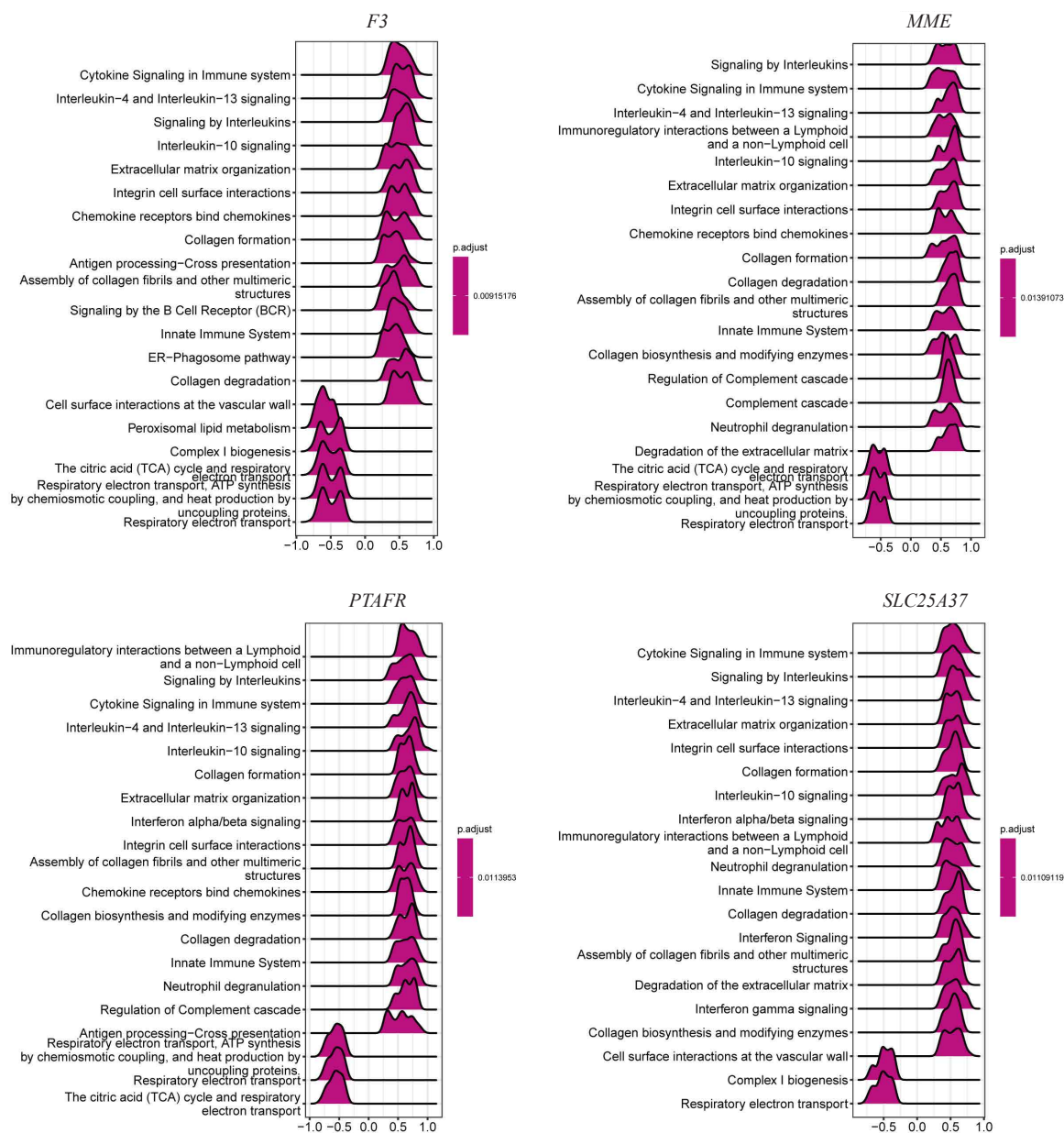


图7 4个关键基因的单基因GSEA脊图  
Figure 7. Single gene GSEA ridge map of 4 key genes

2.6 诊断模型的构建及评价

使用不同的机器学习算法构建 8 个诊断模型，每个模型的稳健性通过在训练集上进行 10 次重复的五折交叉验证来测试。所有模型的 AUC 均大于 0.75，表明具有较强的诊断效能，重复五折交叉验证的结果显示，8 个模型均具有较好的稳定性，其中朴素贝叶斯算法构建的模型性能最好。因此，在 GSE73661 和 GSE206285 中选择该模型进行外部验证，朴素贝叶斯模型在上述两个外部验证集的 AUC 分别为 0.792 和 0.921，表明该模型对 UC 的诊断价值较高（图 8）。

2.7 NETs相关亚型的鉴定与分析

使用 NMF 算法，确定不同的 NETs 相关亚型，并将 GSE73661 数据集的 UC 患者分为两个亚型，其中亚型 1 的关键基因的表达水平更高，在这两个亚型中鉴定出 1 591 个 DEGs。GO 和 KEGG 富集分析显示，这些 DEGs 与 T 细胞活化、细胞因子产生的正调节、细胞因子-细胞因子受体相互作用相关（附件图 6）。在生物途径差异方面，亚型 1 在各种免疫炎症反应途径中大量富集，包括白细胞介素相关信号通路、干扰素  $\gamma$ （interferon- $\gamma$ ，IFN- $\gamma$ ）反应和通过 NF- $\kappa$ B 介导的 TNF- $\alpha$  信号

通路(附件图7)。除 CD56bright NK 细胞、CD56dim NK 细胞和辅助 T 细胞 17(Th17 细胞)外,亚型 1 中免疫细胞的浸润程度显著高于亚型 2。根据 UC 患者对不同生物制剂的反应和临床活动度对其进行了分层,亚型 2 患者对 IFX 治疗的反应率更高,临床活动度更低,但两类患者对 VDZ 治疗的反应率无统计学差异(图9)。

## 2.8 靶向药物预测

在 DGIdb 在线数据库中检索 22 种药物靶向 *F3*、*MME*、*PTAFR* 和 *SLC25A37* 基因的药物,其中靶向 *F3* 的药物 5 种,靶向 *PTAFR* 的药物 6 种,靶向 *MME* 的药物 11 种,未报道靶向 *SLC25A37* 的药物,其中靶向 *PTAFR* 的药物 DERSALAZINE 已完成 II 期临床试验(表2)[17-18]。

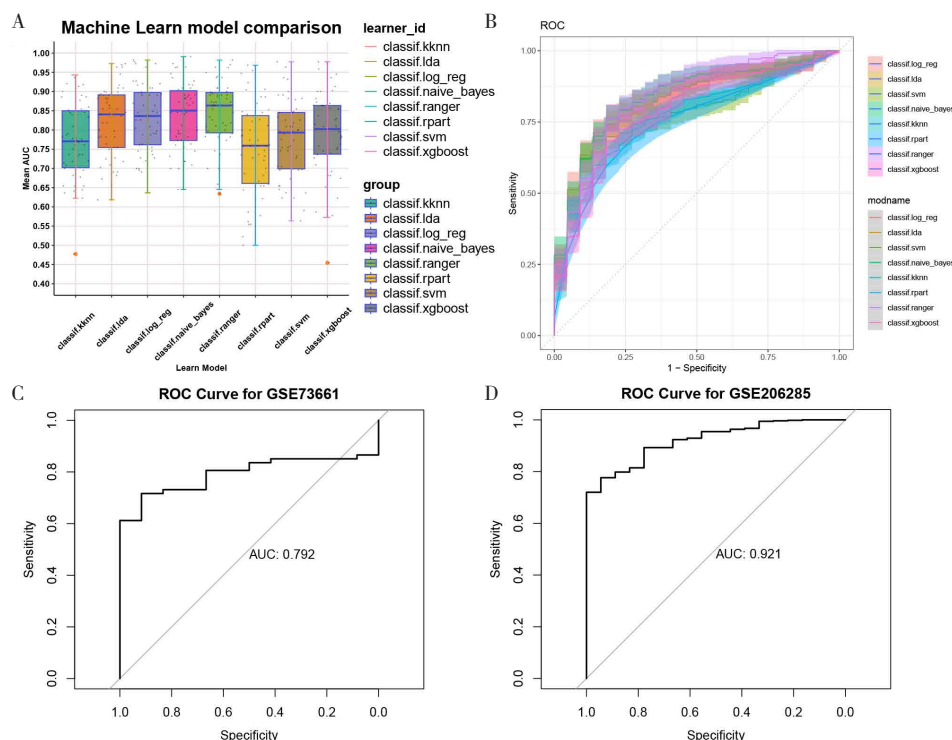


图8 基于关键基因的诊断模型构建及有效性验证

Figure 8. Construction and validation of diagnostic model based on key genes

注: A.诊断模型AUC箱线图; B.重复五折交叉验证的ROC曲线; C.数据集GSE73661验证朴素贝叶斯模型的ROC曲线; D.数据集GSE206285验证朴素贝叶斯模型的ROC曲线。

## 3 讨论

UC 的确切发病机制尚不明确,但普遍认为与遗传易感性和环境因素有关,肠道屏障受损导致食物抗原和细菌的易位,从而使中性粒细胞聚集<sup>[19]</sup>。NETs 通过分解细菌毒力因子和杀死细菌来增强抗菌活性,在中性粒细胞清除病原体的过程中发挥重要作用;NETs 还可作为物理屏障,防止感染的进一步扩散。NETs 在 UC 中展现出双面性,在有效消灭微生物的同时,也会损伤肠上皮细胞,破坏肠上皮屏障的完整性<sup>[20]</sup>。本研究发现 4 个 NETs 相关的关键基因(*F3*、*MME*、*PTAFR*、*SLC25A37*)可能参与 UC 的发病和进展,有望成为诊断生物标志物和治疗靶点。

凝血因子 III (coagulation factor III, F3), 又称组织因子,是外源性血凝级联反应的主要启动因子<sup>[21]</sup>。F3 可通过蛋白酶激活受体促进炎症信号传导,导致 IL-1、IL-6、TNF- $\alpha$  等细胞因子的合成以及其他促炎信号的合成,在炎症反应中,DNA 纤维或核染色质释放到细胞质中,与细胞质蛋白、颗粒蛋白、组蛋白和 F3 结合,包裹细胞质,最终形成 NETs,导致组织损伤<sup>[22]</sup>。在 UC 中,F3 可能通过参与 NETs 的形成从而发挥促炎作用。膜金属内肽酶(membrane metalloendopeptidase, *MME*)是一种跨膜糖蛋白,在系统性红斑狼疮、牙周炎等炎症中表达上调,且与疾病的严重程度呈正相关,*MME* 主要在中性粒细胞和成纤维细胞上表达,表明 *MME* 可能通过调控中性粒

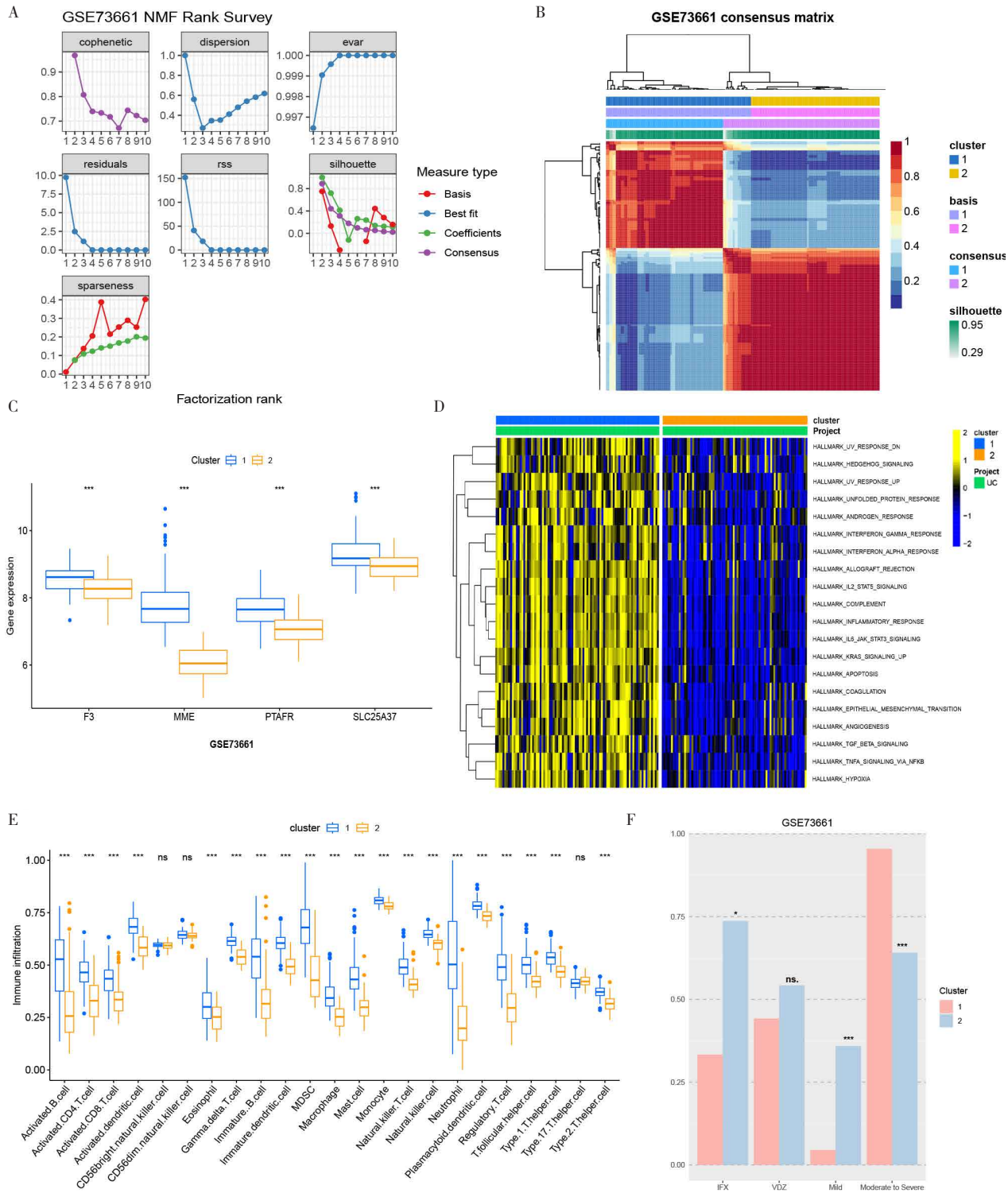


图9 基于关键基因的两个NETs相关亚型的鉴定与分析

Figure 9. Identification and analysis of two NETs-related subtypes based on key genes

注：A.在数据集GSE73661中，通过NMF算法将UC患者分为2个亚型；B.2个亚型的聚类分析；C.2个亚型的关键基因的表达差异；D.2个亚型的Hallmarks通路富集分析；E.2个亚型的免疫浸润分析；F.2个亚型对生物制剂的治疗反应和临床活动度的差异；\* $P < 0.05$ ，\*\* $P < 0.01$ ，\*\*\* $P < 0.001$ 。

细胞的免疫反应形成 NETs 在 UC 中发挥促炎作用<sup>[23-25]</sup>。血小板活化因子受体（platelet-activating factor receptor, PTAFR）主要分布在巨噬细胞和中性粒细胞中，是 NETs 形成的重要调控因子，

在慢性阻塞性肺疾病、支气管哮喘、类风湿性关节炎和炎症性肠炎等炎症性疾病中发挥重要作用，参与炎症性肠炎肠外表现的调节，在 DSS 诱导的小鼠结肠炎模型中，PTAFR 的表达上调，其

表2 靶向关键基因的药物  
Table 2. Drugs targeting key genes

| 靶点           | 药物                                            | 相互作用类型    | 来源                                                                                                      | PMID                 |
|--------------|-----------------------------------------------|-----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------|
| <i>F3</i>    | ALT-836                                       | –         | Therapeutic Target Database                                                                             | 22340260             |
| <i>F3</i>    | MORAB-066                                     | –         | Therapeutic Target Database                                                                             | –                    |
| <i>F3</i>    | RECOMBINANT NEMATODE ANTICOAGULANT PROTEIN C2 | –         | The Druggable Genome                                                                                    | –                    |
| <i>F3</i>    | TISOTUMAB VEDOTIN-TFTV                        | binder    | The ChEMBL Bioactivity Database                                                                         | –                    |
| <i>F3</i>    | SIMVASTATIN                                   | –         | PharmGKB                                                                                                | 19027114             |
| <i>PTAFR</i> | TICLOPIDINE                                   | –         | Therapeutic Target Database                                                                             | –                    |
| <i>PTAFR</i> | MINOPAFANT                                    | inhibitor | The ChEMBL Bioactivity Database                                                                         | –                    |
| <i>PTAFR</i> | LEXIPAFANT                                    | –         | Therapeutic Target Database                                                                             | –                    |
| <i>PTAFR</i> | ISRAPAFANT                                    | –         | Therapeutic Target Database                                                                             | –                    |
| <i>PTAFR</i> | DERSALAZINE                                   | –         | Therapeutic Target Database                                                                             | 21790535<br>25192498 |
| <i>PTAFR</i> | RUPATADINE                                    | inhibitor | Therapeutic Target Database<br>The ChEMBL Bioactivity Database                                          | –                    |
| <i>MME</i>   | PL37                                          | –         | The Druggable Genome<br>Therapeutic Target Database                                                     | –                    |
| <i>MME</i>   | DAGLUTRIL                                     | inhibitor | The ChEMBL Bioactivity Database<br>Therapeutic Target Database                                          | –                    |
| <i>MME</i>   | CANDOXATRIL                                   | –         | Therapeutic Target Database<br>Trends in the exploitation of novel drug targets<br>The Druggable Genome | –                    |
| <i>MME</i>   | SLV-334                                       | –         | Therapeutic Target Database                                                                             | –                    |
| <i>MME</i>   | SACUBITRIL                                    | inhibitor | The ChEMBL Bioactivity Database                                                                         | –                    |
| <i>MME</i>   | RACECADOTRIL                                  | inhibitor | The ChEMBL Bioactivity Database                                                                         | –                    |
| <i>MME</i>   | GALLOPAMIL                                    | –         | Therapeutic Target Database                                                                             | –                    |
| <i>MME</i>   | SACUBITRIL/VALSARTAN                          | –         | Therapeutic Target Database                                                                             | –                    |
| <i>MME</i>   | ILEPATRIL                                     | inhibitor | The ChEMBL Bioactivity Database<br>The Druggable Genome                                                 | –                    |
| <i>MME</i>   | SAMPATRILAT                                   | –         | Therapeutic Target Database                                                                             | –                    |
| <i>MME</i>   | PEPINEMAB                                     | –         | Therapeutic Target Database                                                                             | –                    |

作用机制是通过 NLRP3 炎性小体激活 IL-1 $\beta$  发挥促炎作用，提示在 UC 患者发病过程中可能通过类似的机制发挥促炎作用<sup>[26–29]</sup>。编码丝裂铁蛋白-1 的溶质载体家族 25 成员 37 (*SLC25A37*) 基因与多发性硬化和骨关节炎等炎症密切相关，在小鼠败血症模型中发现 *SLC25A37* 在外周血中性粒细胞中表达升高，提示 *SLC25A37* 在细菌性炎症中的抗菌作用。*SLC25A37* 基因有转录因子 RelB 的结合位点，推测在 UC 中在 TNF- $\alpha$  刺激下可能通过非经典 NF- $\kappa$ B 通路调控 *SLC25A37* 基因表达发挥促炎作用<sup>[30]</sup>。

本研究发现 4 个关键基因之间存在正相关，提示潜在的协同效应。免疫浸润分析表明，这些基因与大多数免疫细胞（包括中性粒细胞、单核细胞和巨噬细胞）的浸润呈正相关，而与 CD56dim NK 细胞的浸润呈负相关。单基因 GSEA

结果显示，关键基因与免疫系统细胞因子信号转导、胶原形成、细胞外基质组织和白细胞介素信号转导呈正相关。这些发现与 UC 患者肠道的免疫细胞浸润一致。UC 的炎症反应和细胞因子信号通路由多种免疫细胞驱动，包括巨噬细胞、树突状细胞、中性粒细胞、T 细胞和 B 细胞<sup>[31–32]</sup>。免疫细胞浸润和激活后释放细胞因子（如 IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-23、TNF、IFN- $\gamma$  和与 T 辅助 17 细胞途径相关的细胞因子）进入肠黏膜和外周循环，发挥促炎作用<sup>[33–34]</sup>。胶原蛋白是肠道细胞外基质的重要组成部分，在 UC 病理状态下，包括中性粒细胞弹性酶（NETs 的组成部分）在内的蛋白酶活性增加，破坏了细胞外基质降解和合成之间的平衡，影响肠道组织稳态，最终导致组织损伤和无效愈合<sup>[35]</sup>。呼吸电子传递是真核生物线粒体的基本功能，线粒体功能障碍与结肠炎

症密切相关，在活动性 UC 患者中，线粒体功能明显下调<sup>[36]</sup>。

本研究通过 NMF 分析将 UC 患者分为 2 种亚型，其中关键基因均在亚型 1 中高表达。GSVA 和免疫浸润分析显示，亚型 1 的炎症反应增强。此外，这两个亚型对生物制剂的反应和临床活动度也不同，亚型 2 的患者 IFX 治疗的有效率更高，临床活动度更低。既往研究表明，UC 患者外周血中 TNF- $\alpha$  刺激中性粒细胞可诱导 NETs 形成，NETs 反过来刺激固有层单核细胞 TNF- $\alpha$  的分泌形成正反馈，形成炎症的恶性循环，而抗 TNF- $\alpha$  治疗可打破这一循环，控制炎症，缓解临床症状<sup>[37]</sup>。DERSALAZINE 是唯一报道的用于 UC 的药物，其由 PTAFR 拮抗剂和 5-ASA 组成的化合物。一项在轻度至中度 UC 患者中进行的为期 4 周的 II 期临床试验表明，DERSALAZINE 比美沙拉秦更有效，但差异无统计学意义，其临床价值有待进一步研究证实<sup>[38]</sup>。

本研究也存在一定的局限性。朴素贝叶斯模型表现出了较高稳定性和良好性能，但在临床应用中仍面临挑战，医生可能需要更多信息来支持临床决策，数据质量和一致性是影响模型泛化能力的关键，优化运行效率和提升跨平台兼容性将有助于推动临床实际应用。本研究基于生物信息学，不能模拟真实病理过程，结论的可靠性有待进一步验证。虽然在人体标本上验证了关键基因的表达，但样本量较少，未来仍需更大样本量的研究验证。

综上，本研究通过生物信息学方法，确定了 4 个关键基因，建立了良好的诊断模型，并鉴定出两个独特的 NETs 相关亚型，为制定新的诊断标志物、治疗靶点和制定个性化治疗策略提供依据。

附件见《医学新知》官网附录 ( <https://yxxz.whuznhmedj.com/futureApi/storage/appendix/202412002.pdf> )

**伦理声明：**本研究已获得武汉大学中南医院医学伦理委员会批准（批号：科研论[2022011K]）

**作者贡献：**研究设计、数据采集、数据分析、论文撰写：孟秋月、袁一帆、李娜；实验操作：卢嘉莉；论文审定、经费支持：叶梅

**数据获取：**本研究中使用和（或）分析的数据可在 Gene Expression Omnibus (GEO) 数据库 ( [https://](https://yxxz.whuznhmedj.com)

[www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/) ) 获取

**利益冲突声明：**无

**致谢：**不适用

## 参考文献

- 1 Le Berre C, Honap S, Peyrin-Biroulet L. Ulcerative colitis[J]. Lancet, 2023, 402(10401): 571–584. DOI: [10.1016/S0140-6736\(23\)00966-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(23)00966-2).
- 2 Gros B, Kaplan GG. Ulcerative colitis in adults: a review[J]. JAMA, 2023, 330(10): 951–965. DOI: [10.1001/jama.2023.15389](https://doi.org/10.1001/jama.2023.15389).
- 3 Kilic Y, Kamal S, Jaffar F, et al. Prevalence of extraintestinal manifestations in inflammatory bowel disease: a systematic review and Meta-analysis[J]. Inflamm Bowel Dis, 2024, 30(2): 230–239. DOI: [10.1093/ibd/izad061](https://doi.org/10.1093/ibd/izad061).
- 4 Saez A, Herrero-Fernandez B, Gomez-Bris R, et al. Pathophysiology of inflammatory bowel disease: innate immune system[J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(2): 1526. DOI: [10.3390/ijms24021526](https://doi.org/10.3390/ijms24021526).
- 5 Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria[J]. Science, 2004, 303(5663): 1532–1535. DOI: [10.1126/science.1092385](https://doi.org/10.1126/science.1092385).
- 6 Wigerblad G, Kaplan MJ. Neutrophil extracellular traps in systemic autoimmune and autoinflammatory diseases[J]. Nat Rev Immunol, 2023, 23(5): 274–288. DOI: [10.1038/s41577-022-00787-0](https://doi.org/10.1038/s41577-022-00787-0).
- 7 Neubert E, Meyer D, Kruss S, et al. The power from within – understanding the driving forces of neutrophil extracellular trap formation[J]. J Cell Sci, 2020, 133(5): jcs241075. DOI: [10.1242/jcs.241075](https://doi.org/10.1242/jcs.241075).
- 8 Kaplan MJ, Radic M. Neutrophil extracellular traps: double-edged swords of innate immunity[J]. J Immunol, 2012, 189(6): 2689–2695. DOI: [10.4049/jimmunol.1201719](https://doi.org/10.4049/jimmunol.1201719).
- 9 Dos Santos Ramos A, Viana GCS, de Macedo Brigido M, et al. Neutrophil extracellular traps in inflammatory bowel diseases: Implications in pathogenesis and therapeutic targets[J]. Pharmacol Res, 2021, 171: 105779. DOI: [10.1016/j.phrs.2021.105779](https://doi.org/10.1016/j.phrs.2021.105779).
- 10 Bennike TB, Carlsen TG, Ellingsen T, et al. Neutrophil extracellular traps in ulcerative colitis: a proteome analysis of intestinal biopsies[J]. Inflamm Bowel Dis, 2015, 21(9): 2052–2067. DOI: [10.1097/MIB.0000000000000460](https://doi.org/10.1097/MIB.0000000000000460).
- 11 Angelidou I, Chrysanthopoulou A, Mitsios A, et al. REDD1/autophagy pathway is associated with neutrophil-driven IL-1 $\beta$  inflammatory response in active ulcerative colitis[J]. J Immunol, 2018, 200(12): 3950–3961. DOI: [10.4049/jimmunol.1701643](https://doi.org/10.4049/jimmunol.1701643).
- 12 Dinallo V, Marafini I, Di Fusco D, et al. Neutrophil extracellular traps sustain inflammatory signals in ulcerative colitis[J]. J Crohns Colitis, 2019, 13(6): 772–784. DOI: [10.1093/ecco-jcc/jjy215](https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjy215).
- 13 Zhang Y, Guo L, Dai Q, et al. A signature for pan-cancer prognosis based on neutrophil extracellular traps[J]. J Immunother Cancer, 2022, 10(6): e004210. DOI: [10.1136/jitc-2021-004210](https://doi.org/10.1136/jitc-2021-004210).
- 14 Leek JT, Johnson WE, Parker HS, et al. The sva package for removing batch effects and other unwanted variation in high-throughput experiments[J]. Bioinformatics, 2012, 28(6): 882–883.

- DOI: [10.1093/bioinformatics/bts034](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts034).
- 15 Friedman J, Hastie T, Tibshirani R. Regularization paths for generalized linear models via coordinate descent[J]. *J Stat Softw*, 2010, 33(1): 1–22. DOI: [10.18637/jss.v033.i01](https://doi.org/10.18637/jss.v033.i01).
- 16 Cannon M, Stevenson J, Stahl K, et al. DGIdb 5.0: rebuilding the drug–gene interaction database for precision medicine and drug discovery platforms[J]. *Nucleic Acids Res*, 2024, 52(D1): D1227–D1235. DOI: [10.1093/nar/gkad1040](https://doi.org/10.1093/nar/gkad1040).
- 17 Camuesco D, Rodríguez-Cabezas ME, Garrido-Mesa N, et al. The intestinal anti-inflammatory effect of darsalazine sodium is related to a down-regulation in IL-17 production in experimental models of rodent colitis[J]. *Br J Pharmacol*, 2012, 165(3): 729–740. DOI: [10.1111/j.1476-5381.2011.01598.x](https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01598.x).
- 18 Pontes C, Vives R, Torres F, et al. Safety and activity of darsalazine sodium in patients with mild-to-moderate active colitis: double-blind randomized proof of concept study[J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2014, 20(11): 2004–2012. DOI: [10.1097/MIB.0000000000000166](https://doi.org/10.1097/MIB.0000000000000166).
- 19 Bernstein CN. Review article: changes in the epidemiology of inflammatory bowel disease—clues for aetiology[J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2017, 46(10): 911–919. DOI: [10.1111/apt.14338](https://doi.org/10.1111/apt.14338).
- 20 Jorch SK, Kubes P. An emerging role for neutrophil extracellular traps in noninfectious disease[J]. *Nat Med*, 2017, 23(3): 279–287. DOI: [10.1038/nm.4294](https://doi.org/10.1038/nm.4294).
- 21 Rauch U, Nemerson Y. Circulating tissue factor and thrombosis[J]. *Curr Opin Hematol*, 2000, 7(5): 273–277. DOI: [10.1097/00062752-200009000-00003](https://doi.org/10.1097/00062752-200009000-00003).
- 22 Witkowski M, Landmesser U, Rauch U. Tissue factor as a link between inflammation and coagulation[J]. *Trends Cardiovas Med*, 2016, 26(4): 297–303. DOI: [10.1016/j.tcm.2015.12.001](https://doi.org/10.1016/j.tcm.2015.12.001).
- 23 Depondt C, Donatello S, Rai M, et al. MME mutation in dominant spinocerebellar ataxia with neuropathy (SCA43)[J]. *Neurol Genet*, 2016, 2(5): e94. DOI: [10.1212/NXG.0000000000000094](https://doi.org/10.1212/NXG.0000000000000094).
- 24 Li M, Wang L, Zhan Y, et al. Membrane metalloendopeptidase (MME) suppresses metastasis of esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) by inhibiting FAK–RhoA signaling axis[J]. *Am J Pathol*, 2019, 189(7): 1462–1472. DOI: [10.1016/j.ajpath.2019.04.007](https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2019.04.007).
- 25 Ding JT, Li CX, Shu KX, et al. Membrane metalloendopeptidase (MME) is positively correlated with systemic lupus erythematosus and may inhibit the occurrence of breast cancer[J]. *Plos One*, 2023, 18(8): e0289960. DOI: [10.1371/journal.pone.0289960](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0289960).
- 26 Hyland IK, O'Toole RF, Smith JA, et al. Progress in the development of platelet-activating factor receptor (PAFr) antagonists and applications in the treatment of inflammatory diseases[J]. *ChemMedChem*, 2018, 13(18): 1873–1884. DOI: [10.1002/cmde.201800401](https://doi.org/10.1002/cmde.201800401).
- 27 Edwards LJ, Constantinescu CS. Platelet activating factor/platelet activating factor receptor pathway as a potential therapeutic target in autoimmune diseases[J]. *Inflamm Allergy Drug Targets*, 2009, 8(3): 182–190. DOI: [10.2174/187152809788681010](https://doi.org/10.2174/187152809788681010).
- 28 Liu G, Mateer SW, Hsu A, et al. Platelet activating factor receptor regulates colitis-induced pulmonary inflammation through the NLRP3 inflammasome[J]. *Mucosal Immunol*, 2019, 12(4): 862–873. DOI: [10.1038/s41385-019-0163-3](https://doi.org/10.1038/s41385-019-0163-3).
- 29 Ye C, Zhao Y, Yu W, et al. Identifying PTAfr as a hub gene in atherosclerosis: implications for NETosis and disease progression[J]. *Hum Genomics*, 2024, 18(1): 139. DOI: [10.1186/s40246-024-00708-3](https://doi.org/10.1186/s40246-024-00708-3).
- 30 Derakhshani A, Safarpour H, Abdoli Shadbad M, et al. The role of hemoglobin subunit delta in the immunopathy of multiple sclerosis: mitochondria matters[J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 709173. DOI: [10.3389/fimmu.2021.709173](https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.709173).
- 31 Mitsialis V, Wall S, Liu P, et al. Single-cell analyses of colon and blood reveal distinct immune cell signatures of ulcerative colitis and Crohn's disease[J]. *Gastroenterology*, 2020, 159(2): 591–608, e10. DOI: [10.1053/j.gastro.2020.04.074](https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.04.074).
- 32 Bressenot A, Salleron J, Bastien C, et al. Comparing histological activity indexes in UC[J]. *Gut*, 2015, 64(9): 1412–1418. DOI: [10.1136/gutjnl-2014-307477](https://doi.org/10.1136/gutjnl-2014-307477).
- 33 Chen ML, Sundrud MS. Cytokine networks and T-cell subsets in inflammatory bowel diseases[J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2016, 22(5): 1157–1167. DOI: [10.1097/MIB.0000000000000714](https://doi.org/10.1097/MIB.0000000000000714).
- 34 Rosen MJ, Karns R, Vallance JE, et al. Mucosal expression of type 2 and type 17 immune response genes distinguishes ulcerative colitis from colon-only Crohn's disease in treatment-naïve pediatric patients[J]. *Gastroenterology*, 2017, 152(6): 1345–1357, e7. DOI: [10.1053/j.gastro.2017.01.016](https://doi.org/10.1053/j.gastro.2017.01.016).
- 35 Mortensen JH, Lindholm M, Langholm LL, et al. The intestinal tissue homeostasis—the role of extracellular matrix remodeling in inflammatory bowel disease[J]. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*, 2019, 13(10): 977–993. DOI: [10.1080/17474124.2019.1673729](https://doi.org/10.1080/17474124.2019.1673729).
- 36 Haberman Y, Karns R, Dexheimer PJ, et al. Ulcerative colitis mucosal transcriptomes reveal mitochondriopathy and personalized mechanisms underlying disease severity and treatment response[J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 38. DOI: [10.1038/s41467-018-07841-3](https://doi.org/10.1038/s41467-018-07841-3).
- 37 Dinallo V, Marafini I, Di Fusco D, et al. Neutrophil extracellular traps sustain inflammatory signals in ulcerative colitis[J]. *J Crohns Colitis*, 2019, 13(6): 772–784. DOI: [10.1093/ecco-jcc/jjy215](https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjy215).
- 38 Pontes C, Vives R, Torres F, et al. Safety and activity of darsalazine sodium in patients with mild-to-moderate active colitis: double-blind randomized proof of concept study[J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2014, 20(11): 2004–2012. DOI: [10.1097/MIB.0000000000000166](https://doi.org/10.1097/MIB.0000000000000166).

收稿日期: 2024 年 12 月 01 日 修回日期: 2025 年 02 月 06 日  
本文编辑: 桂裕亮 曹 越

引用本文: 孟秋月, 袁一帆, 李娜, 等. 中性粒细胞胞外陷阱在溃疡性结肠炎中的作用[J]. 医学新知, 2025, 35(3): 289–302. DOI: [10.12173/j.issn.1004-5511.202412002](https://doi.org/10.12173/j.issn.1004-5511.202412002).  
Meng QY, Yuan YF, Li N, et al. The role of neutrophil extracellular traps in ulcerative colitis[J]. *Yixue Xinzhi*, 2025, 35(3): 289–302. DOI: [10.12173/j.issn.1004-5511.202412002](https://doi.org/10.12173/j.issn.1004-5511.202412002).