

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2023.13.024

基于 GEO 数据库联合临床检测指标分析生物标志物 对冠心病的诊断价值

翟斌¹, 韩梅¹, 蒙莉萍¹, 张钰坤², 姚炎燚^{3△}

1. 内蒙古自治区包头市第八医院检验科, 内蒙古包头 014040; 2. 内蒙古迪安丰信医疗科技有限责任公司, 内蒙古呼和浩特 010000; 3. 内蒙古自治区包头市第八医院院长办公室, 内蒙古包头 014040

摘要:目的 挖掘冠心病(CHD)发展过程中的关键差异表达基因, 了解其参与的主要生物过程, 结合临床检测指标综合分析, 并对核心基因进行蛋白印记实验验证。方法 从 GEO 数据库获得两个 CHD 基因表达芯片原始数据, 通过插件 GEO2R 对差异表达基因进行筛选, 采用生物信息学技术进行基因本体(GO)分析、京都基因与基因组百科全书(KEGG)分析和蛋白质互作网络(PPI)分析, 结合常规检测指标综合评价, 以 CHD 大鼠模型心肌组织验证核心基因表达情况。结果 两个数据库共筛选出 458 个共有差异表达基因, 主要涉及炎症过程和脂质代谢通路。PPI 分析显示 Toll 样受体 4(TLR4)、共济失调毛细血管扩张突变(ATM)和亚甲基四氢叶酸还原酶(MTHFR)等关键基因参与了 CHD 中炎症相关通路; 临床检测指标中 CHD 患者总胆固醇、同型半胱氨酸、超敏 C 反应蛋白等与健康人群比较, 差异均有统计学意义($P < 0.05$); CHD 大鼠心肌组织 TLR4 和 ATM 蛋白低表达。结论 炎症反应和脂质代谢异常在 CHD 发展中发挥了重要作用, TLR4、ATM 基因有望成为诊断 CHD 的潜在生物标志物。

关键词:冠心病; 生物信息分析; 生物标志物; 临床检测指标

中图法分类号: R543.3

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2023)13-1926-05

Diagnostic value of biomarkers in coronary heart disease based on GEO database combined with clinical detection indicators

ZHAI Bin¹, HAN Mei¹, MENG Liping¹, ZHANG Yukun², YAO Yanyi^{3△}

1. Department of Clinical Laboratory, Baotou Municipal Eighth Hospital, Baotou, Inner Mongolia 014040, China; 2. Inner Mongolia Dian Fengxin Medical Technology Co., Ltd., Hohhot, Inner Mongolia 010000, China; 3. Office of Dean, Baotou Municipal Eighth Hospital, Baotou, Inner Mongolia 014040, China

Abstract: **Objective** To dig the key differentially expressed genes in the development process of coronary heart disease (CHD) and understand their involvement in the main biological processes, and to conduct the comprehensive analysis by combining with the clinical detection indexes and Western blot verification on the core genes. **Methods** The original data of two CHD gene expression chips were obtained from GEO database, and the differentially expressed genes were screened by GEO2R plug-in. The bioinformatics analysis was used to conduct the gene ontology (GO) analysis, Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) analysis and protein-protein interaction network (PPI) analysis, and the comprehensive evaluation by combining with the conventional detection indicators, and the expressions of core genes were verified by using the myocardial tissue of CHD rat model. **Results** A total of 458 common differentially expressed genes were screened, which were mainly involved in the inflammatory processes and lipid metabolic pathways. The PPI analysis showed that the key genes such as TLR4, ATM, and MTHFR genes participated in the inflammation related pathway in CHD. Among the clinical test indexes, TC, Hcy and hs-CRP had statistically significant difference between the patients with CHD and healthy people ($P < 0.05$). TLR4 and ATM protein were lowly expressed in myocardial tissue of rats with CHD. **Conclusion** The inflammatory reaction and lipid metabolism abnormality play an important role in the development of CHD. TLR4 and ATM gene may be expected to be the potential biomarkers for diagnosing CHD.

Key words: coronary heart disease; bioinformatics analysis; biomarkers; clinical test indicators

冠心病(CHD)是心血管疾病中最常见的一种类型,发病率和病死率逐年上升且已经超过大多数肿瘤性疾病。有研究表明,高脂血症、糖尿病、高血压和吸烟是 CHD 高发的危险因素,且随着年龄的增加,CHD 发病率也显著提高^[1]。当冠状动脉发生粥样硬化,会引起管腔狭窄或闭塞,造成心肌缺血、缺氧性损伤或坏死。CHD 的发生是由不同因素所致,病因尚不完全清楚,目前较多研究表明,脂质代谢异常和激活的炎症反应在 CHD 中起关键作用^[2-3]。近年来,许多研究发现,炎症因子参与和调控着 CHD 的发生、发展过程,临床检测指标,如同型半胱氨酸(Hcy)、超敏 C 反应蛋白(hs-CRP)、白细胞介素等已经成为诊断 CHD 的关键指标被广泛研究^[4-5]。本研究旨在通过生物信息学分析技术从 GEO 数据库下载 CHD 基因表达芯片数据,对差异表达基因进行分析,揭示 CHD 发生中涉及的相关生物过程和参与的信号通路,了解生物标志物潜在的分子机制,结合临床检测指标综合分析并对相关基因进行验证,为 CHD 的诊断与预防提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 基因微阵列数据的获取 以“Coronary Heart Disease”为关键词在 GEO 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)进行检索获得样本的基因表达芯片,下载 GSE71226 和 GSE66360 两个数据集。其中 GSE71226 包括 3 例 CHD 患者样本和 3 例健康对照样本;GSE66360 包括 21 例 CHD 患者样本和 22 例健康对照样本的基因表达矩阵,实验平台均来自 Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array。

1.2 方法

1.2.1 原始数据预处理及差异表达基因的挖掘 下载原始数据,利用 R 语言对芯片数据进行差异表达分析(以 $P<0.05$, $|\log FC|\geq 0.5$ 为筛选条件)和聚类分析,获得差异表达基因。

1.2.2 共有差异表达基因 Venn 分析 通过 TBtools 软件对两个数据集的共有差异表达基因进行分析,得到交叉表达基因 Venn 图及共有基因列表信息。

1.2.3 基因本体(GO)和京都基因与基因组百科全书(KEGG)分析 GO 分析是高通量基因数据功能分析最常用的方法,研究目标基因在细胞组分、分子功能和生物过程 3 个层面的功能作用。KEGG 分析包含了多种生物化学通路,可以更清楚地了解目标基因参与人体哪些通路。通过将待分析基因列表上传至 DAVID 生物信息学资源数据库,即可关联到基因相关功能注释和通路富集情况,将结果下载为文本文件,使用 R 语言(ggplot)对结果进行可视化处理。

1.2.4 基因富集(GSEA)分析 GSEA 分析对基因表达量矩阵进行计算,分析基因集合,可以更全面地分析基因的富集情况。下载两个数据集的基因表达

原始数据并进行整理,使用 GSEA 线上软件(<https://www.omicshare.com/tools/Home/>)进行可视化分析,筛选条件为 $P<0.01$,错误发现的比率(FDR) $<25\%$ 。

1.2.5 蛋白质互作网络(PPI)分析 PPI 分析使用 STRING(<https://cn.string-db.org/>)在线软件。将基因列表上传即可展示 PPI 分析结果,下载数据后通过 Cytoscape 插件筛选 Hub 基因,并对 PPI 图进行可视化。采用 GeneMINIA 在线分析软件对 Hub 基因进行基因功能预测。

1.2.6 临床指标检测 根据心血管病学会介入心脏病病学组制订的 CHD 诊断标准,选取包头市第八医院收治的 CHD 患者 74 例[平均年龄(57.53 ± 5.37)岁]和健康体检者 71 例[平均年龄(52.44 ± 8.43)岁]。排除标准:并自身免疫性疾病和急/慢性感染性疾病;合并恶性肿瘤、肾功能不全和肝胆疾病;近 1 个月服用过糖皮质激素和免疫抑制剂。检测指标包括白细胞计数(WBC)、中性粒细胞计数(NEUT#)、淋巴细胞计数(LYMPH#)、单核细胞计数(MONO#)、红细胞计数(RBC)、血红蛋白(Hb)、血小板计数(PLT)、hs-CRP、总胆红素(TBIL)、总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)和 Hcy。本研究获得包头市第八医院伦理委员会审批,所有研究对象知情并同意参与本研究。

1.2.7 蛋白印记法(Western blot)检测大鼠 Toll 样受体(TLR)4、共济失调毛细血管扩张突变(ATM)蛋白表达 选取清洁级 SD 大鼠 15 只,体质量 220~250 g。随机抽取 9 只每天给予高脂饲料连续喂养 6 周后,腹腔注射垂体后叶素 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$,连续 3 次,间隔 24 h,建立 CHD 大鼠模型,选取建模成功的 CHD 模型 6 只,其余 6 只作为对照组。取大鼠心肌组织 100 mg 加入适量放射免疫沉淀测定(RIPA)裂解液提取蛋白,使用试剂盒进行蛋白定量。将蛋白溶液与缓冲液进行混合并煮沸,短暂离心后根据目标蛋白相对分子质量配制不同浓度分离胶,设置电泳时间,电泳后的样本转移至聚偏二氟乙烯膜(PVDF)上,按照顺序放置于转印夹低温转印 150 min;取出 PVDF 用 Tris 缓冲液(TBS)清洗 1 min,快速转移至一抗中,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,次日取出用加吐温 20 的 TBS(TBST)清洗 10 min,共 3 次,移入荧光二抗中避光孵育 2 h,移出用 TBST 清洗 10 min,共 3 次,随后进行 X 光显影检测。

1.3 统计学处理 Western blot 实验结果采用 Image J 软件进行统计分析。临床检测指标采用 SPSS21.0 统计软件进行统计分析,符合正态分布的计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用独立样本 t 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 差异基因的筛选 为寻找 CHD 相关差异表达基因,进一步分析疾病发生中基因的相互作用,以 $P<0.05$, $|\log FC|\geq 0.5$ 为筛选条件进行分析。

GSE71226 中共鉴定出 3 348 个差异基因,其中包括 1 509 个上调基因,1 839 个下调基因;GSE66360 共鉴定出 2 820 个差异基因,其中包括 1 724 个上调基因,1 096 个下调基因。

2.2 共有差异表达基因的 Venn 分析 为找到 CHD 患者具有显著差异的共表达基因,通过 Venn 分析将两个数据集的差异表达基因进行筛选,结果显示,两个数据集有 458 个共有差异表达基因,其中上调基因 171 个,下调基因 287 个。见图 1。

2.3 GO 和 KEGG 分析 为了解两个数据集中 CHD 患者共有差异表达基因的生物学功能,对 458 个共有差异表达基因进行了 GO 分析,结果显示,CHD 中共有差异表达基因主要参与的生物学功能包括 RNA 聚合酶 II 启动子转录调控和 DNA 模板化;

所属的细胞成分主要包括细胞核、细胞质等;其分子功能主要为蛋白质结合、金属离子结合。KEGG 分析显示,共有差异表达基因显著富集的信号通路包括单纯疱疹病毒 I 型感染、破骨细胞分化、花生四烯酸代谢通路、核因子(NF)-κB 信号通路等,表明这些基因主要参与一些病毒感染、炎症和免疫相关代谢通路。见表 1。

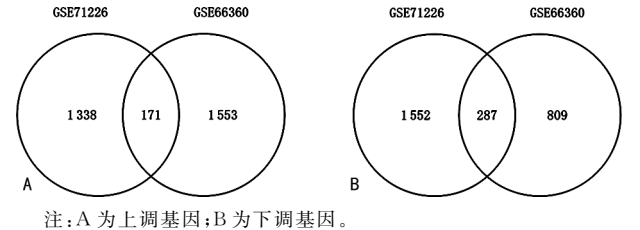


图 1 共有差异表达基因 Venn 分析

表 1 部分共有差异表达基因 KEGG 通路分析

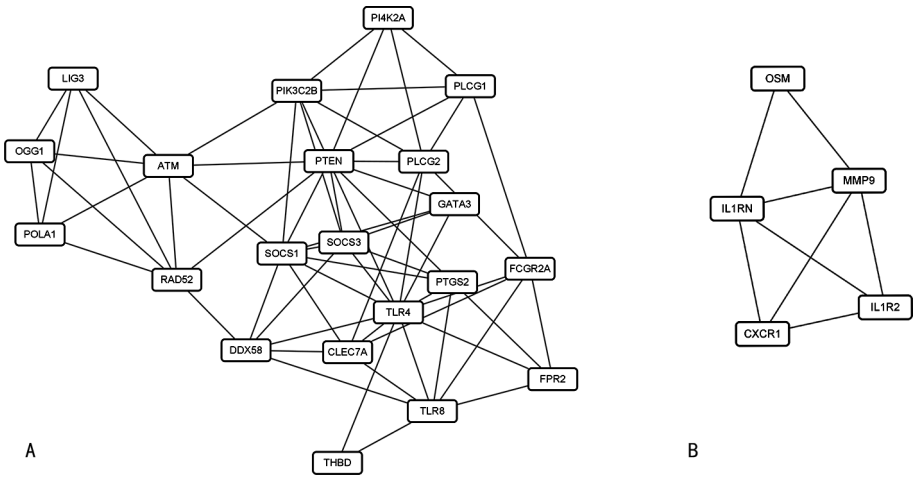
KEGG 通路	基因数(n)	基因信息
单纯疱疹病毒 I 型感染	24	ZNF320、ZNF382、ZNF140、SRSF1、POU2F2、ZNF57、EIF2S1、ZFP90、SOCS3、OAS2、ZNF814、ZNF84、ZNF439、AKT3、ZNF30、ZNF404、ZNF568、ZNF567、ZNF677、ZNF578、ZNF721、ZNF226、ZNF248、ZNF302
癌症通路	20	RALB、ROCK1、EPAS1、MAX、DAPK2、PTCH1、TCF7、PTEN、PTGS2、MMP9、RASGRP4、RASGRP3、NFKB2、BMP4、AKT3、MDM2、PLCG2、GNAS、PLCG1、IL13RA1
肺结核	10	EEA1、ITGAM、NFYB、CLEC7A、VDR、AKT3、ATP6V0A2、PLA2R1、TLR4、FCGR2C
破骨细胞分化	9	SOCS3、SOCS1、AKT3、BLNK、PLCG2、SIRPA、FCGR2C、SIRPB1、NFKB2
NF-κB 信号通路	8	BLNK、PLCG2、ATM、PLCG1、LTBR、PTGS2、TLR4、NFKB2
白细胞经内皮细胞迁移	7	ITGAM、ROCK1、PLCG2、ESAM、PLCG1、ARHGAP5、MMP9
花生四烯酸代谢通路	6	PTGIS、GPX3、CYP4F2、CYP4F3、PTGS2、PTGES
肌醇磷酸盐代谢	6	INPP4A、PTEN、PLCG2、PLCG1、PI4K2A、PIK3C2B
幽门螺杆菌感染中的上皮细胞信号传导	6	CLEC7A、AKT3、MDM2、PLCG2、PTGS2、NFKB2
霍乱弧菌感染	5	TJPI、PLCG2、ATP6V0A2、GNAS、PLCG1

2.4 GSEA 富集分析 为进一步分析 CHD 差异表达基因可能参与的信号通路,对两个数据集的基因表达谱进行 GSEA 分析,结果显示,两个数据集差异表达基因主要富集于 Toll 样受体信号通路、炎症反应、白细胞迁移和花生四烯酸代谢通路等,表明 CHD 中差异表达基因主要在炎症反应中富集,并表现为负反馈调节,与 KEGG 分析结果一致。

2.5 PPI 分析 为筛选 CHD 中的关键基因,对 458 个共有差异表达基因进行 PPI 分析,使用 MCODE 插件对 PPI 图进行聚类(node score cut-off = 0.2, K-core=2),通过 K-means 聚类算法将得分排序,筛选出前两条基因簇。见图 2。使用 Cytohubba 插件以 MCC 算法筛选出 20 个关键基因。上调基因包括细胞因子信号传导抑制因子 3(SOCS3)、白细胞介素 1 受体拮抗剂(IL1RN)、整合素 αM(ITGAM)、CXC 基序趋化因子受体 1(CXCR1)、双特异性磷酸酶 1(DUSP1)、Fc γ 受体 II A(FCGR2A)、甲酰胺受体 2

(FPR2)、含 7A 的 C 型凝集素结构域(CLEC7A)、细胞因子信号传导抑制因子 1(SOCS1)等,下调基因包括前列腺素-过氧化内合酶 2(PTGS2)、磷酸酶和张力素同系物(PTEN)、过氧化物酶体增殖物激活受体 α(PPARA)、TLR8、TLR4、基质金属蛋白酶 9(MMP9)、GATA 结合蛋白 3(GATA3)、ATM 基因、维甲酸诱导基因 I(DDX58)、白细胞介素 1 受体 II 型(IL1R2)、人抑瘤素 M(OSM)等。这提示这些基因的异常表达可能与 CHD 的发生与发展有着密切关联。使用 GeneMINIA 软件对 Hub 基因互作关系进行分析,结果显示,TLR4、ATM 基因和亚甲基四氢叶酸还原酶(MTHFR)基因相互作用明显,表明其可能在 CHD 的发生中共同参与调控。

2.6 临床检测指标结果 CHD 患者 MONO #、hs-CRP、TC、Hcy 水平均明显高于健康对照者,LYMPH #、Hb 水平均明显低于健康对照者,差异均有统计学意义(P<0.05)。见表 2。



注:A 为基因簇 1(score:5.8);B 为基因簇 2(score:4.0)。

图 2 共表达差异基因 PPI 图

表 2 CHD 患者与健康对照者临床检测指标水平比较($\bar{x}\pm s$)

项目	<i>n</i>	WBC ($\times 10^9$ /L)	NEUT # ($\times 10^9$ /L)	LYMPH # ($\times 10^9$ /L)	MONO # ($\times 10^9$ /L)	RBC ($\times 10^{12}$ /L)	Hb (g/L)
健康对照者	71	6.44±0.23	3.63±0.16	2.19±1.04	0.30±0.11	4.85±0.55	150.70±2.05
CHD 患者	74	6.52±0.22	4.08±0.19	1.81±0.69	0.38±0.15	4.86±0.54	147.26±1.57
<i>t</i>		−0.162	−1.412	−0.618	−3.954	0.078	−1.343
<i>P</i>		0.871	0.158	0.009	<0.001	0.473	0.028

项目	<i>n</i>	PLT($\times 10^9$ /L)	hs-CRP(mg/L)	TBIL(μ mol/L)	TC(mmol/L)	TG(mmol/L)	Hcy(mmol/L)
健康对照者	71	242.15±6.67	1.03±0.20	16.28±0.88	4.11±0.16	2.07±0.24	15.49±1.23
CHD 患者	74	205.25±7.07	2.01±0.24	13.79±0.83	4.82±0.12	1.90±0.18	21.15±1.92
<i>t</i>		−3.791	−2.533	−1.916	−3.918	−0.757	−2.836
<i>P</i>		0.727	0.011	0.055	<0.001	0.449	0.005

2.7 TLR4、ATM 在 CHD 大鼠心肌组织中的表达水平 与健康大鼠心肌组织比较,CHD 大鼠心肌组织 TLR4、ATM 蛋白表达水平显著下调,差异均有统计学意义($P<0.05$)。见表 3。

表 3 TLR4、ATM 在 CHD 大鼠心肌组织和健康大鼠心肌组织中蛋白表达水平比较($\bar{x}\pm s$)

项目	<i>n</i>	TLR4/GAPDH	ATM/GAPDH
健康大鼠	6	1.021±0.05	1.029±0.050
CHD 大鼠	6	0.896±0.04	0.931±0.050

3 讨 论

我国心血管疾病的死亡人数仍在快速增长,患病人群以老年人为主,伴有并发症多和病死率高的风险。冠状动脉造影术不仅给患者带来痛苦,还要承担昂贵的医疗费用^[6]。CHD 发生机制复杂,尚无确切阐述,但已有大量实验证实,动脉粥样硬化与血管壁炎症及脂质代谢紊乱密切相关^[3,7]。本研究通过生物信息学分析技术,筛选 CHD 差异表达基因,探究其发生、发展中参与的生物过程,结合临床检测指标综合分析,对核心基因进行验证,旨在为疾病的早期诊断

提供思路。
NF-κB 是细胞中对免疫与炎症进行调节的重要因子,具有促进炎症细胞因子活化、调节细胞增殖的作用^[8]。TLR4 是 Toll 样受体家族在炎症反应中一类高度保守的模式识别受体,其与特异性配体结合后通过激活一系列下游蛋白质级联反应将刺激信号传递到细胞核,激活免疫应答基因,如 NF-κB,进而诱导与炎症反应相关的各种细胞因子和黏附分子的表达^[9]。本研究临床指标中检测到 Hcy、hs-CRP、TC 水平在 CHD 患者中显著升高。C 反应蛋白(CRP)是机体受到感染或组织损伤后血浆中急剧上升的一种急性蛋白质,是经典补体途径的激活剂^[10]。PANG 等^[11]发现,Hcy 通过刺激 CRP 来启动血管平滑肌细胞的炎症反应,而 CRP 通过 NMDAr-ROS-ERK1/2/p38-NF-κB 信号通路介导炎症反应、刺激内皮细胞表达黏附分子、抑制 NO 的产生而损伤内皮细胞,从而促进动脉粥样硬化的进展。血脂异常在 CHD 中起着关键作用,机体内 TC 水平过高也是导致动脉粥样硬化的重要因素。XIAO 等^[12]发现,TC 水平也与 TLR4/NF-κB 通路的激活有关。

本研究在对 Hub 基因互作关系研究中发现, TLR4、ATM 与 MTHFR 存在相互作用关系^[13]。MTHFR 基因是 Hcy 代谢的关键酶, 其 677 位容易发生突变从而导致该酶活性降低, Hcy 代谢能力受阻, 导致体内 Hcy 水平升高^[14]。同时, MTHFR 基因可通过损伤患者内皮细胞使血管弹性降低, 从而促进冠状动脉斑块形成^[15]。ATM 蛋白属于磷脂酰肌醇 3-OH 家族成员, 是细胞管家基因, 在 DNA 修复和细胞凋亡中起着至关重要的作用^[16]。动脉粥样硬化常伴随氧化应激程度升高, 其特征是血管壁中的脂质和蛋白质氧化, 血管内皮细胞损伤。动脉粥样硬化发生的氧化应激和 DNA 损伤均已被证明能激活 ATM 基因^[17-18]。本研究 KEGG 分析发现, ATM 基因也参与了 NF- κ B 信号通路的调控, 通过调节细胞因子而发挥作用。氧化激活的 ATM 激酶具有促细胞增殖作用, 通过磷酸化下游底物, 参与多条相关通路以维持氧化还原稳态、调控代谢功能和增强信号通路^[19]。本研究在 CHD 大鼠心肌组织 Western blot 实验中发现, TLR4 和 ATM 蛋白在心肌组织中低表达 ($P < 0.05$), 提示在 CHD 发生过程中这两个基因参与了调控, 证实了本研究结果, 因此, 这两个基因有望成为 CHD 的候选标志物。

综上所述, CHD 的发生与发展伴随着炎症反应和脂质代谢异常。TLR4、ATM 参与的生物过程在动脉粥样硬化发生过程中起着重要作用, 通过对 CHD 患者有显著差异表达的指标与差异表达基因参与的通路进行综合分析, 了解 CHD 关键指标检测的重要性, 为高危人群的筛查及诊断提供思路。本研究还具有一定的局限性: 首先, 样本量较小导致一些检测指标差异不明显; 其次, 针对核心基因的验证实验还不够完善。后续将通过更加完善的研究对 CHD 的发生机制进行探索, 为疾病的诊断和预防提供更有意义的指导。

参考文献

[1] GUAN J, WU L, XIAO Q, et al. Levels and clinical significance of serum homocysteine (Hcy), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C), vaspin, and visfatin in elderly patients with different types of coronary heart disease [J]. *Ann Palliat Med*, 2021, 10(5): 5679-5686.

[2] 何巍巍, 何媛, 王文娟. 冠心病患者血清 IL-1 β 、sIL-1R II 检测的临床意义 [J]. *实验与检验医学*, 2020, 38(3): 496-497.

[3] 马晓慧, 刘江涵子, 罗淦清, 等. 磷脂过氧化在冠心病发病机制中的研究进展 [J]. *中国药理学通报*, 2022, 38(8): 1121-1127.

[4] CHENG M, CHENG M, WEI Q. Association of myeloperoxidase, homocysteine and high-sensitivity C-reactive protein with the severity of coronary artery disease and their diagnostic and prognostic value [J]. *Exp Ther*

Med, 2020, 20(2): 1532-1540.

[5] 扈家源, 吴雨晴, 董博华, 等. 血清白细胞介素-10、超敏 C 反应蛋白水平与急性冠脉综合征的关系 [J]. *中国煤炭工业医学杂志*, 2022, 25(3): 284-288.

[6] 黄泽峰, 刘金丰, 王为岗, 等. 冠状动脉 CT 血管成像诊断冠心病的临床价值 [J]. *中国当代医药*, 2021, 28(11): 162-164.

[7] 卢慧敏, 樊炜静, 黄仁燕, 等. 生长分化因子 15 调控巨噬细胞炎症影响动脉粥样硬化的机制研究 [J]. *毒理学杂志*, 2022, 36(3): 258-261.

[8] 张玲, 李明, 林红. 蛇床子素对糖尿病肾病大鼠 NF- κ B 信号通路介导的炎症反应的影响 [J]. *中华中医药学刊*, 2023, 41(1): 201-205.

[9] BRUNING E E, COLLIER J K, WARDILL H R, et al. Site-specific contribution of Toll-like receptor 4 to intestinal homeostasis and inflammatory disease [J]. *J Cell Physiol*, 2021, 236(2): 877-888.

[10] 惠波, 蔡宇豪, 邵一兵. 冠心病患者血液循环中易损斑块相关预测指标分析 [J]. *兰州大学学报(医学版)*, 2022, 48(10): 76-80.

[11] PANG X, LIU J, ZHAO J, et al. Homocysteine induces the expression of C-reactive protein via NMDAR-ROS-MAPK-NF- κ B signal pathway in rat vascular smooth muscle cells [J]. *Atherosclerosis*, 2014, 236(1): 73-81.

[12] XIAO L, LUO G, GUO X, et al. Macrophage iron retention aggravates atherosclerosis: evidence for the role of autocrine formation of hepcidin in plaque macrophages [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*, 2020, 1865(2): 158531.

[13] LIN A, WANG R T, AHN S, et al. A genome-wide map of human genetic interactions inferred from radiation hybrid genotypes [J]. *Genome Res*, 2010, 20(8): 1122-1132.

[14] WU C, GONG Y, SUN A, et al. The human MTHFR rs4846049 polymorphism increases coronary heart disease risk through modifying miRNA binding [J]. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 2013, 23(7): 693-698.

[15] 王佳美, 钱美琪, 魏军等. 利用 GEO 数据库分析糖尿病患者冠心病易感相关基因表达差异的生物信息学分析 [J]. *中国急救复苏与灾害医学杂志*, 2023, 18(1): 12-17.

[16] AKI T, UEMURA K. Cell death and survival pathways involving ATM protein kinase [J]. *Genes (Basel)*, 2021, 12(10): 1581.

[17] SUN G B, QIN M, YE J X, et al. Inhibitory effects of myricitrin on oxidative stress-induced endothelial damage and early atherosclerosis in ApoE^{-/-} mice [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2013, 271(1): 114-126.

[18] ESPACH Y, LOCHNER A, STRIJDOM H, et al. ATM protein kinase signaling, type 2 diabetes and cardiovascular disease [J]. *Cardiovasc Drugs Ther*, 2015, 29(1): 51-8.

[19] 唐石伏, 吴婉君, 阳建伶, 等. ATM 蛋白激酶促细胞增殖作用研究进展 [J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2020, 12(02): 249-252.