

网络出版时间:2024-10-21 12:07:38 网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20241018.0940.019

◇ 预防医学研究 ◇

## 基于生物信息学分析筛选 矽肺患者肺泡巨噬细胞中线粒体靶向标志物

程鸿明<sup>1</sup>,何海兰<sup>1,2</sup>,王 袁<sup>3</sup>,郝小惠<sup>1,2</sup>,王宏丽<sup>1,2</sup>,刘和亮<sup>1,2,4</sup>

(<sup>1</sup> 华北理工大学公共卫生学院,唐山 063210;<sup>2</sup> 河北省器官纤维化重点实验室,唐山 063210;

<sup>3</sup> 华北理工大学附属医院,唐山 063000;<sup>4</sup> 唐山职业技术学院,唐山 063300)

**摘要** 目的 筛选矽肺患者肺泡巨噬细胞中线粒体靶向差异基因,探究线粒体稳态在矽肺患者肺泡巨噬细胞中的作用。方法 下载高通量测序数据集 GSE174725,使用 R 软件以  $P < 0.05$ ,  $|\log_2(\text{Fold Change})| > 1$  筛选差异表达基因,将其与线粒体基因库 MitoCarta3.0 取交集得到线粒体靶向差异表达基因,再开展富集分析得到差异基因参与的生物过程和通路,构建差异表达基因蛋白质-蛋白质相互作用网络。此外,收集矽肺患者对照人群肺泡巨噬细胞,利用 RT-qPCR 法检测差异基因的表达水平以及利用 Western blot 探究线粒体相关因子线粒体融合蛋白-1(MFFN1)、视神经萎缩蛋白-1(OPA1)、动力蛋白相关蛋白-1(DRPI)在矽肺患者肺泡巨噬细胞中的表达情况。结果 在矽肺患者中共筛选出差异表达基因 204 个,包括上调差异基因 62 个,下调差异基因 142 个,其中线粒体靶向差异表达基因 22 个。线粒体靶向差异表达基因富集分析显示,其主要富集的细胞组成包括线粒体膜、内质网膜管侧的组成部分等,主要富集的生物过程包括线粒体电子传递还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸到泛醌、炎症反应、免疫反应等,主要富集的分子功能包括质子转运腺嘌呤核苷三磷酸合酶活性旋转机制、NADH 脱氢酶活性、趋化因子活动等,京都基因与基因组百科全书富集分析主要集中在参与化学致癌-活性氧、白细胞介素 17 信号通路、toll 样受体信号通路、趋化因子信号通路、肿瘤坏死因子信号通路等。此外,RT-qPCR 结果显示,矽肺患者中线粒体细胞色素 C 氧化酶 1、线粒体细胞色素 C 氧化酶 2、线粒体细胞色素 C 氧化酶 3、线粒体编码的 NADH 脱氢酶 1、线粒体编码的 NADH 脱氢酶 3、线粒体编码的 NADH 脱氢酶 5、超氧化物歧化酶和线粒体编码的 ATP 合酶 6 表达下调( $P < 0.05$ ),Western blot 和 RT-qPCR 结果显示,矽肺患者中 MFN1、OPA1 表达降低( $P < 0.05$ ),DRPI 表达增高( $P < 0.05$ )。结论 经生物信息学分析及验证最终得到 8 个线粒体靶向差异基因 MT-CO1、MT-CO2、MT-CO3、MT-ND1、MT-ND3、MT-ND5、SOD 和 MT-ATP6,富集线粒体呼吸链和氧化应激等途径,可能在矽肺进程中发挥重要作用。

**关键词** 矽肺;巨噬细胞;线粒体分裂;线粒体融合;生物信息学

**中图分类号** R 135.2

**文献标志码** A **文章编号** 1000-1492(2024)10-1828-08

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.10.019

2024-07-10 接收

基金项目:国家自然科学基金项目(编号:U21A20334);河北省自然科学基金项目(编号:H2022209021、H2022209039)

作者简介:程鸿明,女,硕士研究生;

刘和亮,男,教授,硕士生导师,通信作者,E-mail:liuheliang@ncst.edu.cn

矽肺是中国目前最常见且危害严重的职业病之一,以肺部炎症和进行性肺纤维化为主要病症,由于其发病机制复杂,且尚无有效的治疗方法<sup>[1]</sup>。因此,探寻矽肺的发病机制,寻找有效的治疗靶点迫在眉睫。据以往研究<sup>[2]</sup>报道,二氧化硅进入机体后可到达终末气道和肺泡处,随后被肺泡巨噬细胞吞噬

and BNIP3, and improve the pathological state of synovitis.

**Key words** rheumatoid arthritis; leflunomide; HIF-1 $\alpha$  signal pathway; autophagy; synovitis

**Fund programs** Scientific and Technological Plan Project of Guizhou Province (Nos. Qiankehe Platform Talent [2020] No. 2202, Qiankehe Basic-ZK [2023] General 435); National and Provincial Science and Technology Innovation Talent Team Cultivation Project of Guizhou University of Traditional Chinese Medicine (No. Guizhou University of TCM TD Hezi [2022] No. 004); Postgraduate Education Innovation Plan Project of Guizhou University of TCM (No. YCXKYB2023006)

**Corresponding author** Tang Fang, E-mail:64550932@qq.com

引发一系列炎症和纤维化反应。线粒体作为能量工厂,参与调控多种信号通路,对于维持细胞功能至关重要。据报道,在特发性肺纤维化患者的原代肺泡巨噬细胞中线粒体编码的 OXPHOS 基因表达降低,mtROS 的产生显著增加<sup>[3]</sup>。此外,研究表明增加线粒体自噬可减缓二氧化硅诱导的肺部炎症和纤维化<sup>[4]</sup>。这些结果表明线粒体在矽肺进程中可能发挥重要作用。因此,筛选线粒体靶向生物标志物,探索新的干预靶点对于阐明矽肺的发病机制至关重要。

该研究基于生物信息学技术分析和筛选矽肺患者的线粒体靶向生物标志物,通过 RT-qPCR 对收集的矽肺患者肺泡巨噬细胞样本进行差异基因验证。并检测线粒体功能障碍相关标志物在矽肺患者肺泡巨噬细胞中的表达情况,探究线粒体功能障碍在矽肺进程中的作用。

## 1 材料与方法

**1.1 研究对象的选取** 选取 2021 年 3 月—2023 年 12 月在北戴河疗养院首次进行大容量全肺灌洗术的 3 例矽肺患者作为病例组,病例组矽肺患者是根据《职业性尘肺病的诊断》(GBZ 70—2015)经 X 射线胸片确诊的矽肺病例。以同期该院进行大容量全肺灌洗术的 1 例误吸患者及两例尘肺观察对象作为对照组。排除罹患传染性疾病、肺炎、心脏病及肺部纤维化疾病的患者。

**1.2 样本采集** 收集研究对象的肺泡灌洗液,将其用纱布过滤后,在离心半径为 10 cm 的离心机中以 1 000 r/min 后弃去上清液,用生理盐水洗 3 次,最后将得到的细胞沉淀用 1640 培养基(含 10% 血清)在细胞培养箱中培养 2 h 后进行纯化后将细胞 -80 °C 冻存备用。

**1.3 差异基因的筛选** 从公共数据库 GEO (gene expression omnibus, GEO) 中搜索下载矽肺患者数据集 GSE174725,使用 R -4.2.3 的“Seurat”包对数据集 GSE174725 进行分析,其中包括 2 例正常和 3 例矽肺患者的肺泡灌洗液测序数据,以  $|\text{LogFC}| > 1$ ,  $P < 0.05$  选择矽肺患者差异表达基因。从 MitoCarta3.0 数据库中获得线粒体相关基因并将上述获得的矽肺患者差异基因与之取交集从而获得线粒体差异表达基因。利用 R 软件绘制火山图,进行 KEGG 和 GO 通路的富集分析,并利用 STRING 进行 PPI 分析。

**1.4 RT-qPCR 检测差异表达基因及线粒体功能障**

**碍相关因子的表达水平** 使用 TRIzol 裂解液裂解肺泡巨噬细胞,三氯甲烷、异丙醇提取细胞总 RNA,并使用 TaKa 逆转录试剂盒(北京宝日生物技术有限公司)进行逆转录,逆转录体系见表 1,使用 Takara PCR 试剂盒(北京宝日生物技术有限公司)进行 RT-qPCR 的扩增反应,反应体系见表 2,使用实时荧光定量 PCR 仪(德国 Analytik Jena 公司)测定循环数,采用  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  法分析数据,引物序列见表 3。

表 1 逆转录反应体系

Tab. 1 Reverse transcription reaction system

Reagent name	Use dose
PrimeScript Buffer(for Real Time) (5 ×)	2.0 μl
PrimeScript RT Enzyme Mix I	0.5 μl
Oligo dT Primer(50 μmol/L)	0.5 μl
Random 6 mers(100 μmol/L)	0.5 μl
Total RNA	500.0 ng
RNase Free dH <sub>2</sub> O	up to 10.0 μl

表 2 PCR 反应体系

Tab. 2 PCR reaction system

Reagent name	Use dose(μl)
TB Green Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus) (2 ×)	10.0
PCR Forward Primer(10 μmol/L)	0.8
PCR Reverse Primer(10 μmol/L)	0.8
ROX Reference Dye or Dye II (50 ×)	0.4
cDNA	2.0
RNase Free dH <sub>2</sub> O	6.0
Total	20.0

表 3 引物序列

Tab. 3 Primers sequence

Gene name	Primer sequence(5'-3')
MT-CO1	F: ATACCAAACGCCCTCTTCG R: TGTTGAGTTGCGGTCTGTT
MT-CO2	F: CGGCTTCGACCTATATCCC R: TGTAGGGCTCATGGTAGGGG
MT-CO3	F: TCACCCGCTAAATCCCTA R: TGACGTGAAGTCCGTGGAAG
MT-ND1	F: CGATTCCGCTACGACCAACT R: AGGTTTGAAGGGGAATGCTG
MT-ND3	F: CGGCTTCGACCTATATCCC R: TGTAGGGCTCATGGTAGGGG
MT-ND5	F: TCATCGCTACCTCCCTGACA R: ATCCTGCGAATAGGCTTCCG
SOD	F: GCTGGAAGCCATCAAACGTG R: GCCTGTTGTTCTTGCAGTG
MT-ATP6	F: GAAGCGCCACCCTAGCAATA R: GCTTGGATTAAGCGCACAGC

### 1.5 免疫印迹法检测线粒体相关蛋白的表达水平

向细胞中加入裂解液并超声,再以 12 000 r/min,上清液即为细胞总蛋白,用二喹啉甲酸白浓度试剂盒检测蛋白浓度后,对样品蛋白电泳、转膜,再使用 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h,再将其放含一抗的抗体盒中 4 ℃ 孵育过夜,过夜后继续二抗室温孵育 2 h,使用凝胶成像系统拍照,使用 Image J 计算灰度值,以目的蛋白与内参的比值表示目的蛋白的相对表达水平。

**1.6 统计学处理** 使用统计软件 SPSS 23.0 进行统计学分析,对于正态分布的计量资料采用  $\bar{x} \pm s$  进行统计描述,对于两组间数据的比较采用两独立样本的 *t* 检验进行统计分析, $P < 0.05$  表示差异有统计学意义,检验水准为  $\alpha < 0.05$ 。

## 2 结果

**2.1 差异基因的筛选** 利用 R 软件对数据集 GSE174725 进行生物信息学分析,共筛选出 228 个差异基因在矽肺患者肺泡巨噬细胞中差异表达(图 1),其中表达上调的基因有 62 个,表达下调的基因有 166 个。此外,将差异表达基因与 MitoCarta3.0 数据库取交集后共得到 22 个线粒体差异表达基因。见图 2。

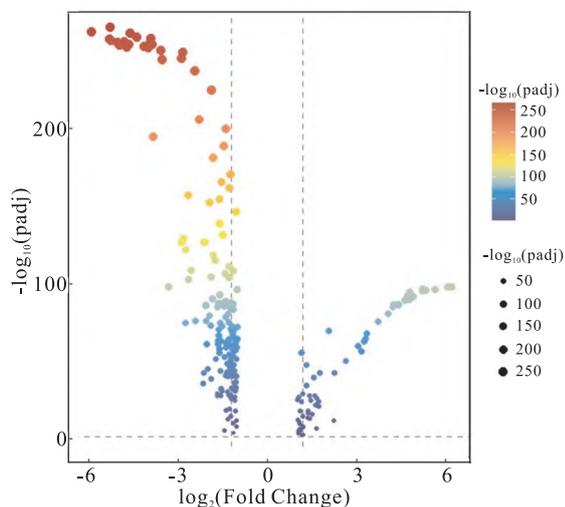


图 1 矽肺患者差异基因分布火山图  
Fig. 1 Volcano map of differential gene distribution in silicosis patients

**2.2 差异基因的富集分析** 对 22 个线粒体差异表达基因进行富集分析显示细胞组分主要集中在线粒体膜内质网膜管侧的组成部分等。生物过程主要集中在细胞呼吸、线粒体电子传递 NADH 到泛醌、炎

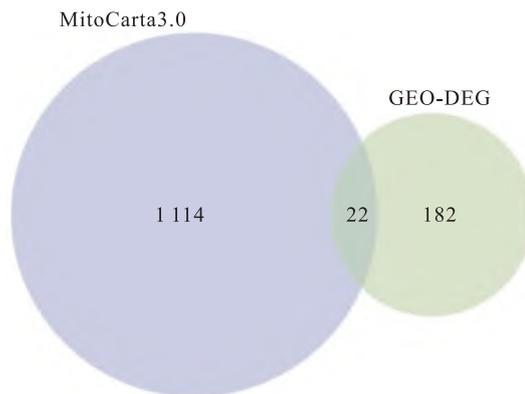


图 2 线粒体基因库与差异基因交集的韦恩图  
Fig. 2 Venn diagram of intersection of mitochondrial gene pool and differential gene

症反应、免疫反应等。分子功能主要集中在质子转运 ATP 合酶活性旋转机制、NADH 脱氢酶活性、CCRS 趋化因子受体结合、T 细胞受体结合、细胞色素 C 氧化酶活性、趋化因子活动等(图 3)。KEGG 信号通路富集结果显示(图 4),差异基因主要参与化学致癌-ROS、抗原加工与提呈、Th1 和 Th2 细胞分化、氧化磷酸化、细胞黏附分子、趋化因子信号通路等。此外,使用在线工具 STRING 绘制差异基因的蛋白质互作网络,见图 5。

**2.3 差异基因的验证** 收集肺泡灌洗液巨噬细胞,并对筛选出的 7 个线粒体差异表达基因进行 RT-qPCR 验证,结果显示,MT-CO1、MT-CO2、MT-CO3、MT-ND1、MT-ND3、MT-ND5、SOD、MT-ATP6 表达均下调,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),与生物信息学分析结果一致。见图 6。

**2.4 矽肺患者肺泡巨噬细胞中线粒体功能障碍相关指标表达变化** RT-qPCR 结果显示(见表 4 和图 7),与对照组相比,矽肺患者肺泡巨噬细胞中线粒体融合因子 MFN1 和 OPA1 的 mRNA 表达水平均降低( $P < 0.05$ ),线粒体分裂因子 DRP1 的 mRNA 表达水平升高( $P < 0.05$ ),免疫印迹结果显示(图 8),与对照组相比,矽肺患者肺泡巨噬细胞中线粒体融

表 4 线粒体损伤因子的 mRNA 相对表达量( $n = 3, \bar{x} \pm s$ )

Tab. 4 Relative mRNA expression of mitochondrial damage factors ( $n = 3, \bar{x} \pm s$ )

Group	MFN1	OPA1	DRP1
Control	1.000 ± 0.184	1.000 ± 0.059	1.000 ± 0.516
Silicosis	0.608 ± 0.071	0.759 ± 0.040	8.014 ± 0.396
<i>t</i> value	3.444	5.859	-18.688
<i>P</i> value	0.026	0.004	<0.001

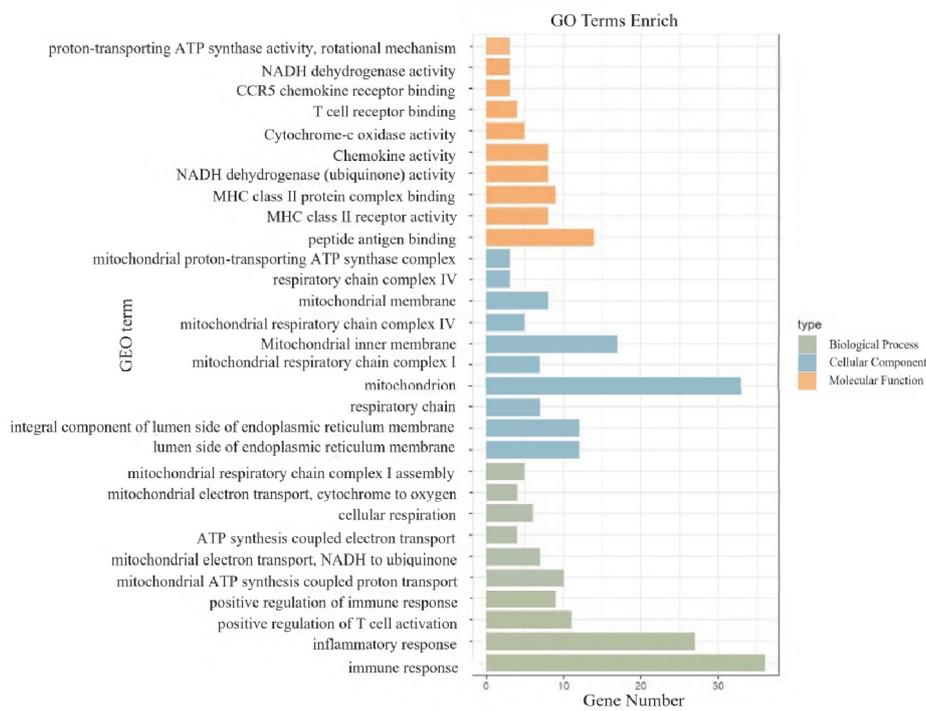


图3 线粒体靶向差异基因的 GO 富集分布图

Fig. 3 GO enrichment distribution of mitochondria-targeted differential genes

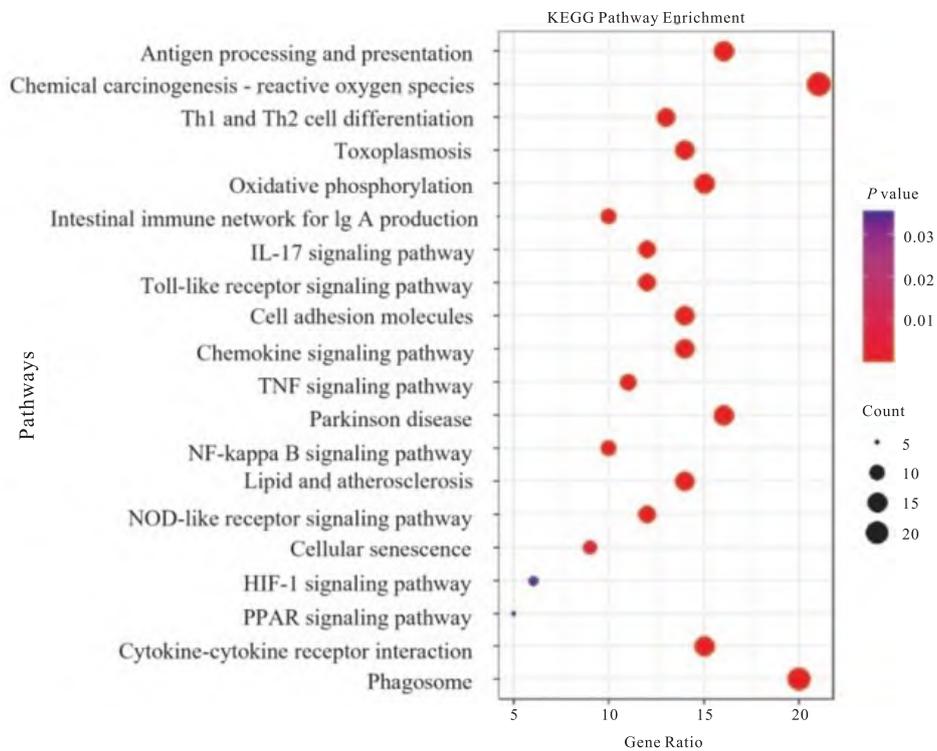


图4 线粒体靶向差异基因的 KEGG 通路富集分布图

Fig. 4 KEGG pathway enrichment distribution of mitochondria-targeted differential genes

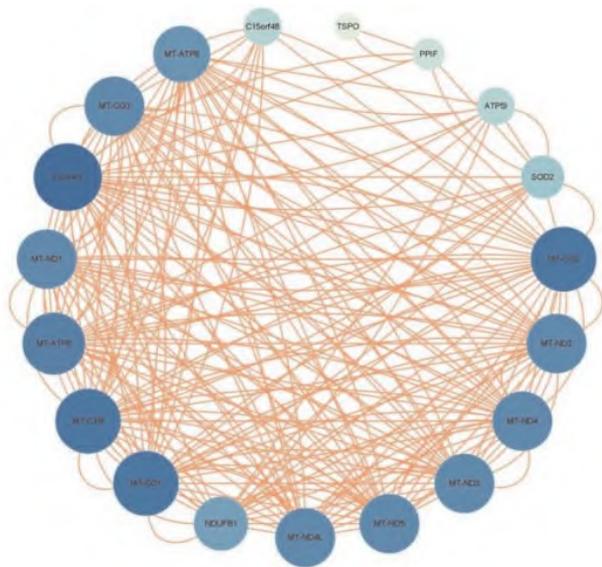


图5 线粒体靶向差异基因的共表达网络图  
Fig.5 Coexpression network of mitochondria-targeted differential genes

合因子 MFN1 和 OPA1 的蛋白表达水平均降低,线粒体分裂因子 DRP1 的蛋白表达水平升高 ( $P < 0.05$ )。

### 3 讨论

矽肺的致病机制尚不清楚<sup>[5]</sup>,其特征是炎症、矽结节的形成最终导致不可逆的纤维化<sup>[6]</sup>。肺泡巨噬细胞是矽肺发病机制的关键靶点,巨噬细胞吞噬二氧化硅颗粒后,线粒体募集到吞噬体上产生线粒体活性氧,炎性因子释放<sup>[7]</sup>。因此,探究线粒体在矽肺进程中的作用具有重要意义。

线粒体是细胞的能量中心,拥有自己的基因组,线粒体蛋白大多数是由核基因编码后输入线粒体中的,参与细胞关键的中央代谢途径。正常的线粒体可以根据细胞的需求调整能量生产以维持细胞的正常功能,同时也在促炎反应中发挥重要作用,线粒体是 ROS 产生的主要场所,ROS 的过度积累和不受控制的增长可能会对细胞产生危害,进一步导致线粒

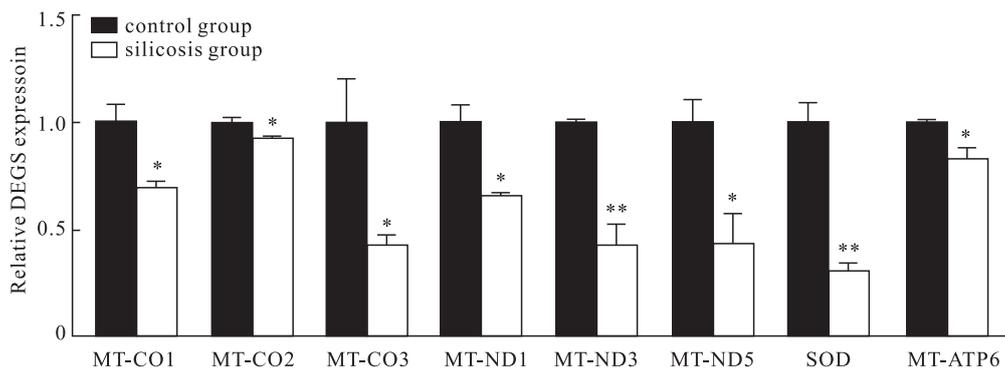


图6 差异基因的验证

Fig.6 Verification of differential genes  
\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs control group.

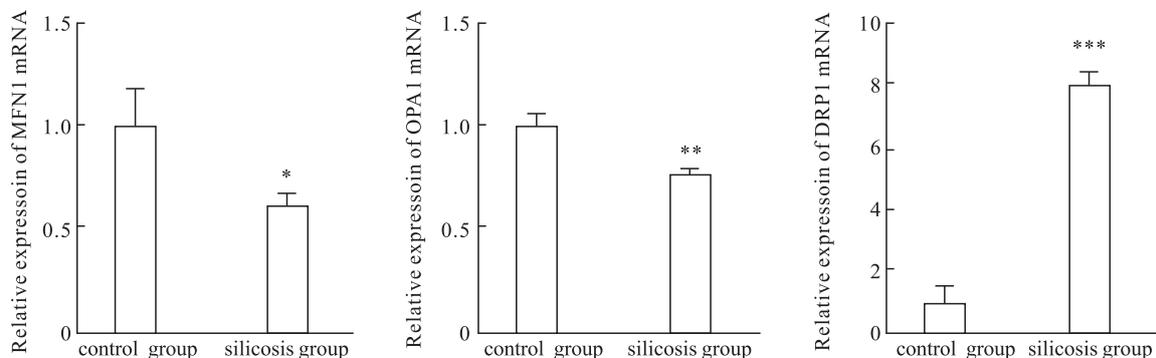


图7 线粒体损伤因子基因的相对表达情况

Fig.7 Relative expression of mitochondrial damage factor genes  
\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$  vs control group.

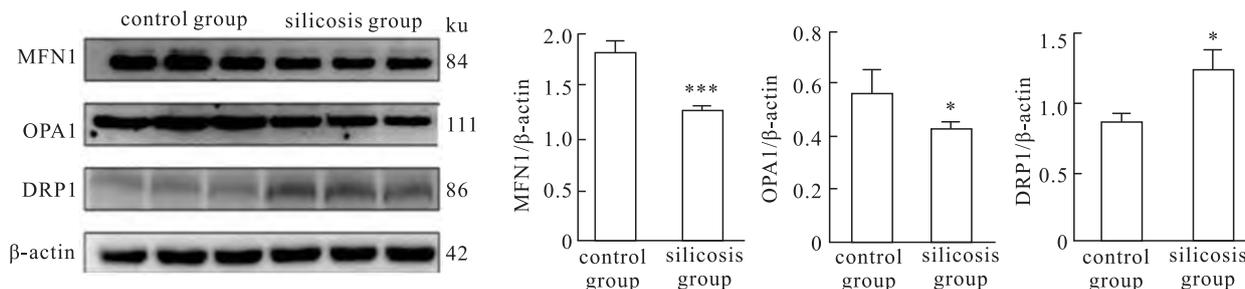


图8 线粒体损伤因子的蛋白相对表达量(n=3)

Fig.8 Relative protein expression of mitochondrial damage factors (n=3)

\* P &lt; 0.05, \*\*\* P &lt; 0.001 vs control group.

体和组织损伤,在病原体感染过程中可以通过影响氧化磷酸化(oxidative phosphorylation, OXPHOS)等过程来影响线粒体功能<sup>[8-10]</sup>。该研究对矽肺患者肺泡巨噬细胞的线粒体靶向差异基因进行筛选,分析发现这些差异基因主要富集在氧化磷酸化、线粒体呼吸链等过程,提示矽肺进程中肺泡巨噬细胞存在氧化磷酸化失衡。研究<sup>[11]</sup>表明,超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)催化超氧负离子自由基歧化生成氧和过氧化氢,在机体抗氧化平衡中起到重要作用。线粒体细胞色素氧化酶(cytochrome oxidase, COX)在线粒体内有氧化中起到关键作用,MT-CO1、MT-CO2、MT-CO3是其最大的三个亚基<sup>[12]</sup>,与对照组相比,其在矽肺患者肺泡巨噬细胞中的表达降低。MT-ND1、MT-ND3、MT-ND5是NADH脱氢酶的三种亚基,参与线粒体氧化应激过程,该研究中矽肺患者肺泡巨噬细胞的MT-ND1、MT-ND3、MT-ND5表达下调。线粒体是高度动态的细胞器,通过分裂和融合来维持线粒体的形态和功能的稳定。线粒体融合由两个阶段组成,首先由线粒体融合因子MFN1和MFN2介导线粒体外膜融合,再由OPA1介导内膜融合,同时OPA1的遗传缺失会导致线粒体断裂而过度表达则会诱导线粒体伸长,线粒体融合还参与线粒体的能量转移和信号通讯修复线粒体DNA(mtDNA)突变,在线粒体分裂期间,动力蛋白相关蛋白-1(dynamamin-related protein 1, Drp1)被募集到线粒体内膜上,在线粒体周围形成环状结构使线粒体膜变窄,线粒体裂变不仅使线粒体增殖还能修复融合中产生的错误<sup>[13-14]</sup>。在该研究中,线粒体融合因子的表达被显著抑制,受损线粒体的组装和修复能力降低,线粒体分裂因子的表达增加以修复线粒体融合过程中的错误,但由于ROS的过度积累导致DRP1持续激活从而导致线粒体结

构异常<sup>[15-17]</sup>。

该研究基于生物信息技术分析筛选出了矽肺患者中线粒体靶向差异表达基因,初步探究了线粒体损伤因子在矽肺患者肺泡巨噬细胞中的表达情况,为探究线粒体在矽肺进程中的作用机制提供了新的思路。该研究尚有不足之处,后续应通过加大样本量来进一步验证实验所得结果,并构建矽肺大鼠模型对所得结果进行深入研究,揭示线粒体功能障碍在矽肺中的分子作用机制。

#### 参考文献

- [1] Handra C M, Gurzu I L, Chirila M, et al. Silicosis: new challenges from an old inflammatory and fibrotic disease[J]. Front Biosci (Landmark Ed), 2023, 28(5): 96. doi:10.31083/j.fbl2805096.
- [2] Li T, Yang X, Xu H, et al. Early identification, accurate diagnosis, and treatment of silicosis[J]. Can Respir J, 2022, 2022: 3769134. doi:10.1155/2022/3769134.
- [3] Li Y, Chen H, Xie X, et al. PINK1-mediated mitophagy promotes oxidative phosphorylation and redox homeostasis to induce drug-tolerant persister cancer cells[J]. Cancer Res, 2023, 83(3): 398-413. doi:10.1158/0008-5472.CAN-22-2370.
- [4] Du S, Li C, Lu Y, et al. Dioscin alleviates crystalline silica-induced pulmonary inflammation and fibrosis through promoting alveolar macrophage autophagy[J]. Theranostics, 2019, 9(7): 1878-92. doi:10.7150/thno.29682.
- [5] Krefft S, Wolff J, Rose C. Silicosis: an update and guide for clinicians[J]. Clin Chest Med, 2020, 41(4): 709-22. doi:10.1016/j.ccm.2020.08.012.
- [6] Wei Y, You Y, Zhang J, et al. Crystalline silica-induced macrophage pyroptosis interacting with mitophagy contributes to pulmonary fibrosis via modulating mitochondria homeostasis[J]. J Hazard Mater, 2023, 454: 131562. doi:10.1016/j.jhazmat.2023.131562.
- [7] 鲁雅茹, 翟岳松, 崔洁, 等. 基于生物信息学的矽肺差异基因筛选及验证[J]. 中国工业医学杂志, 2022, 35(5): 387-

- 92, 397, 481. doi:10.13631/j.cnki.zgggyx.2022.05.001.
- [7] Lu Y R, Zhai Y S, Cui J, et al. Screening of silicosis differential genes based on bioinformatics and verifying *in vivo*[J]. *Chin J Ind Med*, 2022, 35(5): 387–92, 397, 481. doi:10.13631/j.cnki.zgggyx.2022.05.001.
- [8] Zorov D B, Vorobjev I A, Popkov V A, et al. Lessons from the discovery of mitochondrial fragmentation (fission): a review and update [J]. *Cells*, 2019, 8(2): 175. doi: 10.3390/cells8020175.
- [9] Opalińska M, Jańska H. AAA proteases: guardians of mitochondrial function and homeostasis[J]. *Cells*, 2018, 7(10): 163. doi:10.3390/cells7100163.
- [10] Andrieux P, Chevillard C, Cunha-Neto E, et al. Mitochondria as a cellular hub in infection and inflammation[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(21): 11338. doi:10.3390/ijms222111338.
- [11] Ammesley S J, Fisher P R. Mitochondria in health and disease [J]. *Cells*, 2019, 8(7): 680. doi:10.3390/cells8070680.
- [12] 吕 达, 杨慧楠, 刘春城, 等. 二氧化硅染尘小鼠肺纤维化相关炎症和氧化应激因子的响应及关键基因表达[J]. *环境与职业医学*, 2021, 38(10): 1150–5. doi:10.13213/j.cnki.jeom.2021.21061.
- [12] Lv D, Yang H N, Liu C C, et al. Responses of inflammatory factors and oxidative stress factors and expressions of key genes associated with pulmonary fibrosis in silica-exposed mice[J]. *J Environ Occup Med*, 2021, 38(10): 1150–5. doi:10.13213/j.cnki.jeom.2021.21061.
- [13] 颜 鹏, 邓育琼, 黄杏兰, 等. 地塞米松对哮喘模型小鼠肺组织活性氧及线粒体基因 MTCOI 的影响[J]. *实用医学杂志*, 2022, 38(6): 731–7. doi:10.3969/j.issn.1006–5725.2022.06.016.
- [13] Yan P, Deng Y Q, Huang X L, et al. Effects of dexamethasone on the reactive oxygen species and MT-COI in lung tissues of asthma mice [J]. *J Pract Med*, 2022, 38(6): 731–7. doi:10.3969/j.issn.1006–5725.2022.06.016.
- [14] Zhang Z Q, Zhang C Z, Shao B, et al. Effects of abnormal expression of fusion and fission genes on the morphology and function of lung macrophage mitochondria in SiO<sub>2</sub>-induced silicosis fibrosis in rats *in vivo* [J]. *Toxicol Lett*, 2019, 312: 181–7. doi:10.1016/j.toxlet.2019.04.029.
- [15] Tilokani L, Nagashima S, Paupe V, et al. Mitochondrial dynamics: overview of molecular mechanisms [J]. *Essays Biochem*, 2018, 62(3): 341–60. doi:10.1042/EBC20170104.
- [16] 杨 杰, 王 平, 王 广, 等. 基于“线粒体-氧化应激”损伤机制从“痰”论治血管性痴呆[J]. *中国中医基础医学杂志*, 2024, 30(2): 199–203. doi:10.19945/j.cnki.issn.1006–3250.2024.02.006.
- [16] Yang J, Wang P, Wang G, et al. Treatment of vascular dementia from the perspective of “phlegm” based on the damage mechanism of “mitochondrial-oxidative stress” [J]. *J Basic Chin Med*, 2024, 30(2): 199–203. doi:10.19945/j.cnki.issn.1006–3250.2024.02.006.
- [17] 沈 灿, 张龙标, 彭晓清, 等. 线粒体质量控制与高血压血管重塑[J]. *安徽医科大学学报*, 2023, 58(9): 1607–11. doi:10.19405/j.cnki.issn1000–1492.2023.09.029.
- [17] Shen C, Zhang L B, Peng X Q, et al. Mitochondrial quality control and vascular remodeling in hypertension [J]. *Acta Univ Med Anhui*, 2023, 58(9): 1607–11. doi:10.19405/j.cnki.issn1000–1492.2023.09.029.

## Screening of mitochondria-targeting markers in alveolar macrophages of silicosis patients based on bioinformatics analysis

Cheng Hongming<sup>1</sup>, He Hailan<sup>1,2</sup>, Wang Yuan<sup>3</sup>, Hao Xiaohui<sup>1,2</sup>, Wang Hongli<sup>1,2</sup>, Liu Heliang<sup>1,2,4</sup>

(<sup>1</sup>School of Public Health, North China University of Science and Technology, Tangshan 063210;

<sup>2</sup>Hebei Key Laboratory of Organ Fibrosis, Tangshan 063210; <sup>3</sup>Affiliated Hospital of North China University of Science and Technology, Tangshan 063000; <sup>4</sup>Tangshan Vocational and Technical College, Tangshan 063300)

**Abstract Objective** To screen mitochondria-targeting differential genes in alveolar macrophages of silicosis patients and explore the role of mitochondrial homeostasis in alveolar macrophages of silicosis patients. **Methods** High-throughput sequencing dataset GSE174725 was downloaded, and differentially expressed genes were screened with R software and  $P < 0.05$ ,  $|\text{LogFC}| > 1$ , and then intermixed with mitochondrial gene bank MitoCarta3.0 to obtain mitochondria-targeted differentially expressed genes. Then enrichment analysis was carried out to obtain the biological processes and pathways involved in differential genes, and the protein-protein interaction network was constructed. In addition, alveolar macrophages from silicosis patients and healthy controls were collected, the expression levels of differential genes were detected by RT-qPCR, and the expressions of mitochondria-related factors mitochondrial fusion protein 1 (MFN1), optic atrophy 1 (OPA1) and dynamin-related protein 1 (DRP1) in alveolar macrophages of silicosis patients were investigated by Western blot. **Results** A total of 204 differentially expressed (下转第 1841 页)

$\mu\text{m}$ ), and the growth curves were measured. The bacterial activity was determined by CCK-8 (cell counting kit-8). The level of intracellular reactive oxygen species (ROS) was determined by fluorescence probe. The biofilm forming ability was determined by crystal violet staining. Real-time quantitative fluorescent PCR (qRT-PCR) was used to detect the relative expression levels of biofilm-forming genes (*luxS*, *mrkA*, *wbbM*, *pgaA*, *wzm*) and virulence genes (*ureA*, *uge*, *wabG*, *fimH*). **Results** A high concentration (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) of 0.1  $\mu\text{m}$  PS-MPs had a stronger inhibitory effect on the growth and activity of *Klebsiella pneumoniae*, and the intracellular ROS level significantly increased, indicating that smaller particle size and higher concentration of PS-MPs were more toxic to bacteria. PS-MPs of 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  particle size groups (0.1, 1.0 and 5.0  $\mu\text{m}$ ) significantly promoted the biofilm formation of *Klebsiella pneumoniae*. The relative expression levels of biofilm formation related genes (*luxS*, *mrkA*, *wbbM*, *pgaA*, *wzm*) and virulence genes (*ureA*, *uge*, *wabG*, *fimH*) increased. **Conclusion** By inducing *Klebsiella pneumoniae* to produce a high level of ROS, PS-MPs can cause oxidative stress, inhibit the growth and activity of bacteria, and enhance the biofilm formation ability and virulence, thus affecting the biological characteristics of *Klebsiella pneumoniae*.

**Key words** microplastics; *Klebsiella pneumoniae*; oxidative stress; biofilm formation; virulence

**Fund programs** National Key Research and Development Program of China(No. 2023YFF0614204); National Natural Science Foundation of China(No. 52070193)

**Corresponding author** Zhang Chuanfu, E-mail: hnzcf@126.com

(上接第 1834 页)

genes were screened in silicosis patients, among which 62 differentially expressed genes were up-regulated, 142 differentially expressed genes were down-regulated, and 22 differentially expressed genes were mitochondria-targeted. The concentration analysis of differentially expressed genes targeted by mitochondria showed that the cell components mainly enriched included mitochondrial membrane, endoplasmic membrane side components, etc. The biological processes mainly enriched included mitochondrial electron transfer from NADH to ubiquinone, inflammatory response, immune response, etc. The main molecular functions enriched included the rotation mechanism of proton transport ATP synthase activity, NADH dehydrogenase activity, chemokine activity, etc. KEGG enrichment analysis mainly focused on the involvement in chemical carcinogenesis-ROS, IL-17 signaling pathway, toll-like receptor signaling pathway, chemokine signaling pathway, TNF signaling pathway, etc. In addition, RT-qPCR results showed that the expressions of mitochondrial cytochrome oxidase 1, mitochondrial cytochrome oxidase 2, mitochondrial cytochrome oxidase 3, mitochondrially encoded NADH dehydrogenase 1, mitochondrially encoded NADH dehydrogenase 3, mitochondrially encoded NADH dehydrogenase 5, superoxide dismutase and mitochondrially encoded ATP synthase 6 gene were down-regulated in silicosis patients ( $P < 0.05$ ). Western blot and RT-qPCR results showed that, in silicosis patients, the expression of MFN1 and OPA1 decreased ( $P < 0.05$ ), while the expression of DRP1 increased ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Bioinformatics analysis and validation, eight mitochondrial targeted differential genes (MT-CO1, MT-CO2, MT-CO3, MT-ND1, MT-ND3, MT-ND5, SOD and MT-ATP6) were finally obtained, which were enriched in mitochondrial respiratory chain and oxidative stress pathways and might play an important role in the process of silicosis.

**Key words** silicosis; macrophage; mitochondrial fission; mitochondrial fusion; bioinformatics

**Fund programs** National Natural Science Foundation of China (No. U21A20334); Natural Science Foundation of Hebei Province (Nos. H2022209021, H2022209039)

**Corresponding author** Liu Heliang, E-mail: liuheliang@ncst.edu.cn