

线粒体相关的程序性细胞死亡基因在慢阻肺中的鉴定

靖志涛 周广 谢文丽 邱诗林*

广西医科大学第一附属医院 广西南宁 530000

摘要: 目的: 为了研究线粒体相关的程序性细胞死亡基因在慢性阻塞性肺疾病 (COPD) 中的表达, 探讨线粒体相关的程序性细胞死亡基因在慢阻肺中的可能发病机制。方法: 先从 GEO 数据库下载慢阻肺数据集 GSE76925, 然后用 WGCNA 选出关键的 blue 模块, 将得到的 blue 模块与 PCD 相关基因与线粒体相关基因取交集得到 12 个关键基因。然后对 12 个关键基因进行 GO 富集分析和 KEGG 通路富集分析。对 12 个关键基因进行 Lasso 分析, 选出 8 个关键基因。在数据集 GSE76925、GSE38974、GSE42057、GSE20257、GSE11784 分别验证 8 个关键基因的表达情况, 选出最有意义的 2 个关键基因 GHITM、CISD1, 并用 CIBERSORT 算法计算这两个基因在与 COPD 相关的免疫细胞中的相关性。结果: 关键基因 GHITM、CISD1 在慢阻肺人肺数据集 GSE76925、GSE38974 中表达有统计学意义。GHITM 在慢阻肺人血数据集 GSE42057 中有统计学意义, CISD1 在慢阻肺人血数据集 GSE42057 中无统计学意义。GHITM、CISD1 在慢阻肺人肺上皮细胞数据集 GSE20257、GSE11784 中表达有统计学意义。GHITM 与 $\gamma\delta$ T 细胞、M2 型巨噬细胞正相关, 且具有统计学意义。发现 CISD1 与 $\gamma\delta$ T 细胞、初始 B 细胞正相关, 且具有统计学意义。结论: 线粒体与程序性细胞死亡关键基因 GHITM、CISD1 参与了 COPD 的发生发展, 可能是预防吸烟相关 COPD 的潜在靶点。

关键词: 慢阻肺; 线粒体; 程序性细胞死亡; 加权基因共表达网络分析; 生物信息学

研究背景:

慢性阻塞性肺疾病 (COPD) 是一种终末期肺病, 目前临床无法治愈, 且会造成严重的医疗负担, 重症患者也会因为器官衰竭死亡。目前慢阻肺主张以预防为主, 慢阻肺病因复杂, 目前不能完全认知, 可能与多种因素综合作用有关。现已证明吸烟是慢阻肺的主要危险因素, 吸烟者慢阻肺的患病率比不吸烟者高 2-8 倍, 慢阻肺的主要病理特征是肺气肿。但是不吸烟也会引起慢阻肺, 比如 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶缺乏也会引起慢阻肺, 目前新的慢阻肺预防靶点正在研究中。香烟烟雾 (CS) 诱导的线粒体损伤积累与慢性阻塞性肺疾病 (COPD) 的发病机制有广泛的关系^[1]。线粒体结构和功能完整性受损伴随着活性氧 (ROS) 的过量产生, 导致 CS 暴露过程中程序性细胞死亡 (PCD) [2,3]。研究发现肺泡破坏主要与线粒体结构功能障碍、氧化应激发生、蛋白酶/抗蛋白酶的平衡破坏和细胞凋亡等过程有关^[4]。香烟烟雾可引起内质网产生应激和线粒体功能障碍, 导致 NLRP3 炎性小体活化, 激活的 NLRP3 炎性小体引起 Caspase-1 介导的 IL-1 β 和 IL-18 的释放, 导致炎症爆发^[5, 23]。由此可见, 线粒体功能障碍与肺泡破坏、慢性炎症、细胞凋亡均有一定关系。最近

几年, 生物信息学的快速发展引起了人们对疾病发展过程中基因表达的关注, 关注基因表达对疾病发生发展的影响。目前高通量基因数据库 (GEO) 和人类基因数据库 (GeneCards) 被大规模用于研究人类疾病的发生发展^[24]。加权基因共表达网络分析 (WGCNA) 算法可以通过研究基因组与临床表型的关联关系, 选出与疾病临床表型密切相关的基因模块, 为下一步实验研究提供依据。

1 材料和方法

1.1 数据来源

从 GEO 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>) 下载数据集 GSE76925。包含 111 例 COPD 吸烟者和 40 例健康吸烟者的肺组织中的基因。

1.2 得到特征基因 (ME) 模块

先计算软阈值, 然后用动态剪切法得到 10 个特征基因 (ME), 然后对特征基因进行模块-临床表型的相关性分析, 选出二者相关性最大的蓝色模块。然后分析 blue 模块中的基因与疾病临床表型相关性, 发现二者相关性好。

1.3 得到关键基因

从 GEO 数据库中得到与 18 种 PCD 相关的 1548 个基因。

将与 COPD 表型相关的 bule 模块与线粒体相关基因与程序性死亡基因交集得到 12 个关键基因。

1.4 富集分析

对 12 个关键基因进行 GO 富集分析和 KEGG 通路富集分析。

1.5 Lasso 回归算法

对 12 个关键基因进行 Lasso 分析, 选出 8 个关键基因。

1.6 验证关键基因

在数据集 GSE76925、GSE38974、GSE42057、GSE20257、

GSE11784 分别验证 8 个关键基因的表达情况, 选出具有统计学意义的 2 个关键基因 GHITM、CISD1, 并用 CIBERSORT 算法计算这两个基因在与 COPD 相关的免疫细胞中的相关性。

2 结果

2.1 软阈值计算

计算软阈值, 使构建的网络更符合无标度网络特征。一般取 $R^2 > 0.8$, 且稳定。本数据集中软阈值取 5 满足条件。

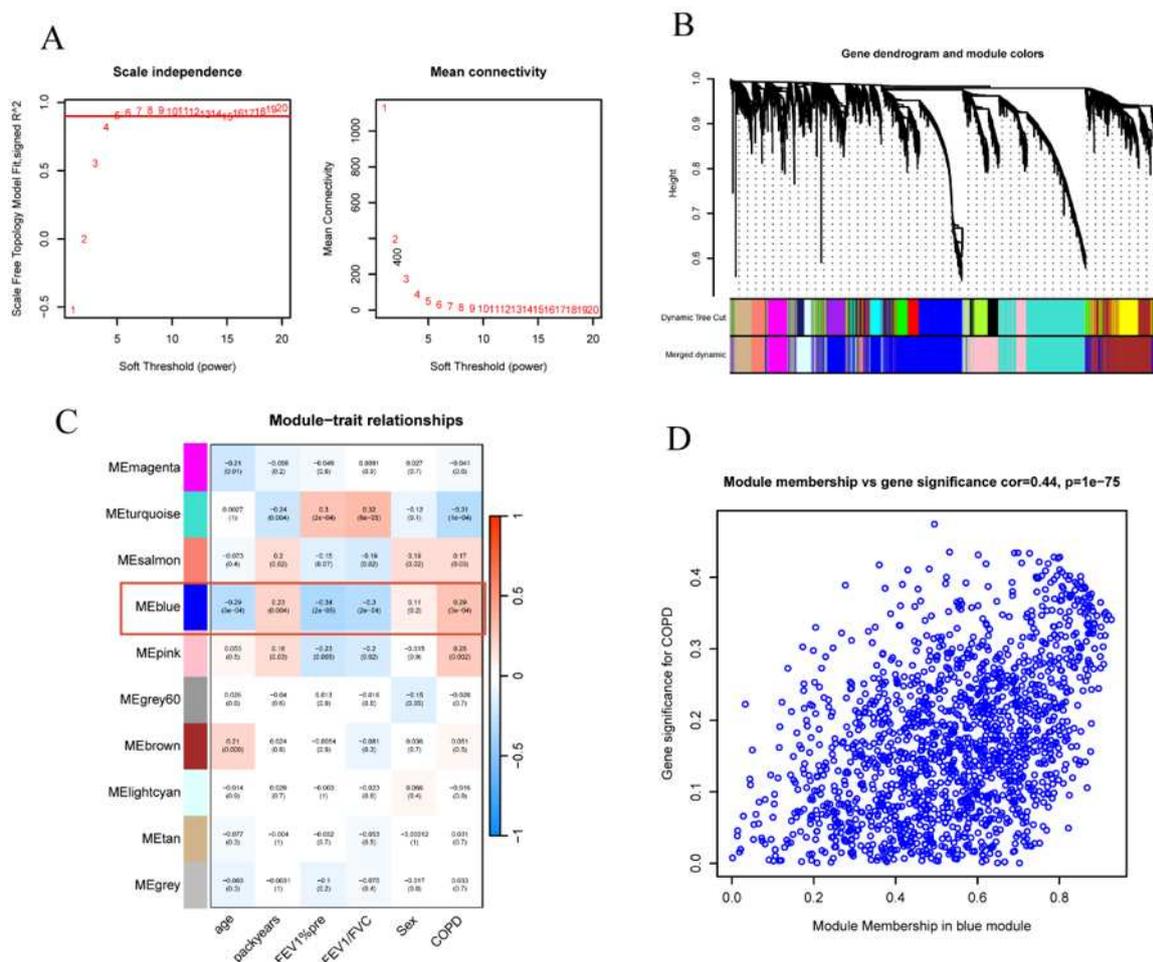


图 1 图 1A 对 1 ~ 20 的软阈值进行网络拓扑分析。1B 用动态剪切法创造疾病相关基因模块。1C 对基因模块与疾病临床表型的相关性分析。1D blue 蓝色模块内基因与临床表型的关联性。

2.2 WGCNA 选择基因共表达模块

使用动态剪切法选择特征基因 (ME) 相似度高的模块, 得到 10 个模块基因, 不同的基因模块使用不同的颜色, 聚合基因较多的模块为蓝色、蓝绿色, 可以从中找到与疾病相

关的关键基因。

2.3 基因模块与临床表型的相关性分析

使用热图分析 10 个基因模块与疾病临床表型相关性, 选出与 COPD 临床表型相关性最大的 blue 模块, r 值最大为

0.29, 提示二者相关性最大。

2.4 blue 模块中的疾病基因与临床表型的相关性分析

分析 blue 蓝色模块内基因与临床表型的关联性, 二者相关性好。

2.5 得到关键基因

从 GEO 数据库中得到与 18 种 PCD 相关的 1548 个基因。将与 COPD 表型相关的 blue 模块与线粒体相关基因与程序性死亡基因交集得到 12 个关键基因。

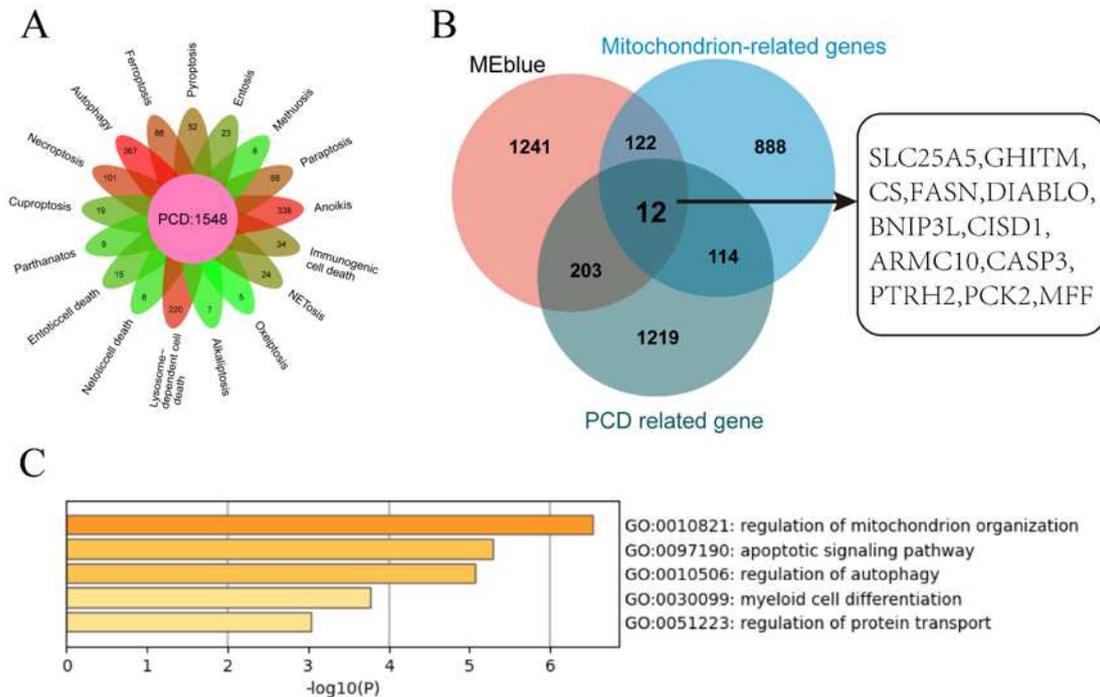


图 2A 18 种 PCD 相关的 1548 个基因。2B 与 COPD 表型相关的 blue 模块基因与程序性细胞死亡与线粒体相关基因之间的韦恩图。

2.6 富集分析结果

对 12 个关键基因进行 GO 基因富集分析和 KEGG 基因富集分析。

GO 基因分析结果如下图所示, 其中生物过程最显著富集的是纤毛组织 (cilium organization), 细胞组成最显著富集的是微管 (microtubule), 分子功能最显著富集的是作用于 DNA 的催化活性 (catalytic activity, acting on DNA)。KEGG 富集分析结果表明最显著的是氮代谢信号通路, 见图。

2.7 Lasso 回归算法

对 12 个关键基因进行 Lasso 分析, 选出 8 个关键基因。

2.8 关键基因的验证

将得到的 8 个关键基因在 GSE76925 数据集中再次验证, 结果提示, GHITM、CS、FASN、BNIP3L、CISD1 上调

, 在 GSE38974 数据集中的验证结果为 SLC25A5、GHITM、CISD1 下调, 最后选择在两个验证数据集均有显著差异的两个关键基因 GHITM、CISD1。在与 COPD 相关的 PBMC 差异基因数据集 GSE42057 (包含 94 例 COPD 患者和 42 例吸烟肺功能正常患者) 进一步验证两个关键基因, 发现 GHITM 表达有统计学差异 ($p < 0.05$)、CISD1 无意义。在与 COPD 相关的支气管上皮细胞差异基因数据集 GSE11784 (包含 157 例样本) 进一步验证两个关键基因, 发现 GHITM、CISD1 表达均有统计学差异。在与 COPD 相关的支气管上皮细胞差异基因数据集 GSE20257 (包含 23 例 COPD、59 例吸烟肺功能正常、53 例不吸烟肺功能正常) 进一步验证两个关键基因, 发现 GHITM、CISD1 表达均有统计学差异。

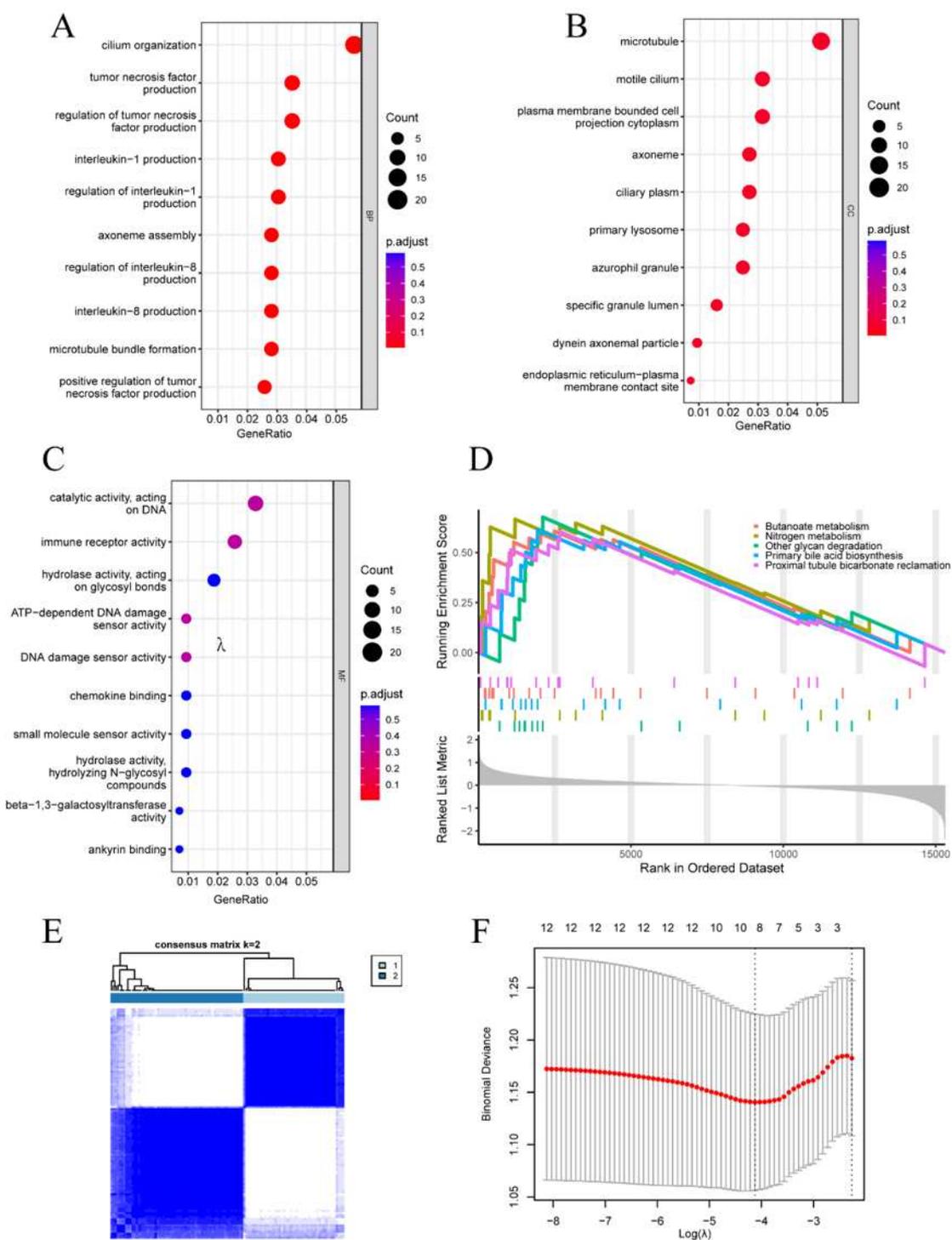


图 3A,B,C GO 富集分析。3D KEGG 富集分析。3F 根据十折交叉验证结果选择最优 λ 值, 在 λ 值最小时筛选出 8 个基因, 横坐标: λ 的对数值, 纵坐标: 模型均方差。

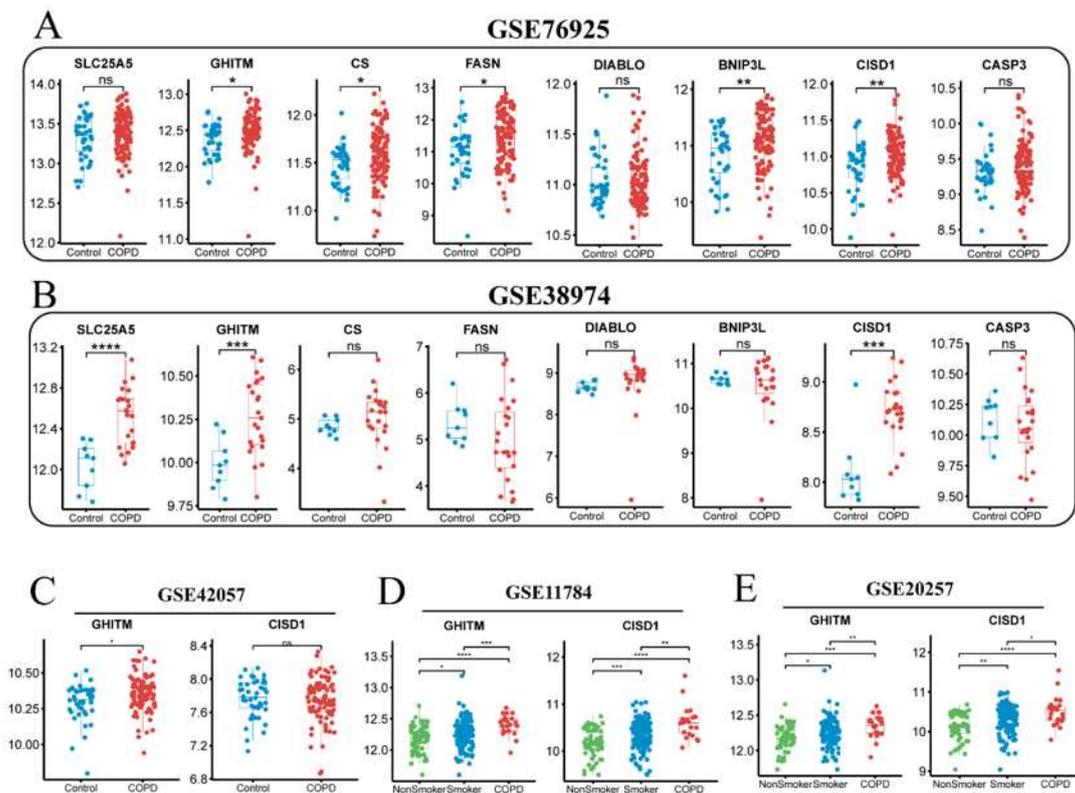


图 4A,B 8 个关键基因在数据集 GSE76925、GSE38974 中的表达情况。4C,D,E 2 个关键基因在数据集 GSE42057、GSE11784、GSE20257 中的表达情况。

2.9 免疫浸润验证

本研究使用 CIBERSORT 算法,研究了 22 个免疫细胞亚群中 COPD 与吸烟肺功能正常患者之间免疫浸润的差异。结果显示 CD8T 细胞 ($P=0.002$), 滤泡辅助性 T 细胞 ($P=0.031$), $\gamma \delta$ T 细胞 ($p=0.015$), 单核细胞 ($p=0.047$), M1 型巨噬细胞 ($p=0.042$), 静息树突细胞 ($p=0.029$), 有统计学差异。将两个关键基因与 22 种免疫细胞进行相关性分析,发现 GHITM 与 $\gamma \delta$ T 细胞、M2 型巨噬细胞正相关,且具有统计学意义。发现 CISD1 与 $\gamma \delta$ T 细胞、初始 B 细胞正相关,且具有统计学意义。

3 讨论

最近几年与生物信息学相关的基因研究方法成为疾病研究的热门,生物信息学也可以用于研究慢阻肺,为慢阻肺的防治提供新的方向。我用生物信息学相关研究方法发现,线粒体相关程序性细胞死亡基因 GHITM、CISD1 与慢阻肺的关系密切。线粒体作为真核生物能量代谢的主要场所,线粒体功能障碍会释放过多的活性氧导致支气管上皮细胞程序性死亡,破坏肺泡壁结构。线粒体功能障碍也会

激活的 NLRP3 炎性小体引起 Caspase-1 介导的炎症因子 IL-1 β 和 IL-18 的释放,引起慢性炎症,可见 COPD 的发生与线粒体功能障碍、支气管上皮细胞程序性死亡均有一定关系。

生长激素诱导的跨膜蛋白基因 (GHITM) 首次发现是在小鼠的肩胛间棕色脂肪组织,由生长激素诱导产生,并参与细胞程序性死亡^[6]。JNAGEL 等 [7]2004 年报道 GHITM 基因的 mRNA 可由 T 细胞中的趋化因子 CXCL12 and CXCL10 所诱导改变。GHITM 有 6 ~ 7 个跨膜结构域,是一个典型的跨膜蛋白,因为生长激素诱导产生而取名生长激素诱导的跨膜蛋白。Reimers 等人^[8]在研究该跨膜蛋白的氨基酸序列特点时发现,其 C 末端有特别结构域,为 BI-1 样超家族的结构域,所以将它分类为 BI-1 样超家族的新成员 TMBIM5。有研究发现,所有的 BI-1 样超家族成员有促进 BCL-2 或抑制 BAX 的作用,从而抑制细胞凋亡^[9]。Henke 等人研究发现, GHITM 可以维持线粒体内的细胞色素 C,通过抑制细胞色素 C 的凋亡,保持线粒体的结构功能正常^[10]。Kim 等人 (2012) 研究发现 BI-1 样超家族成员有抑制抗肿瘤药物依托

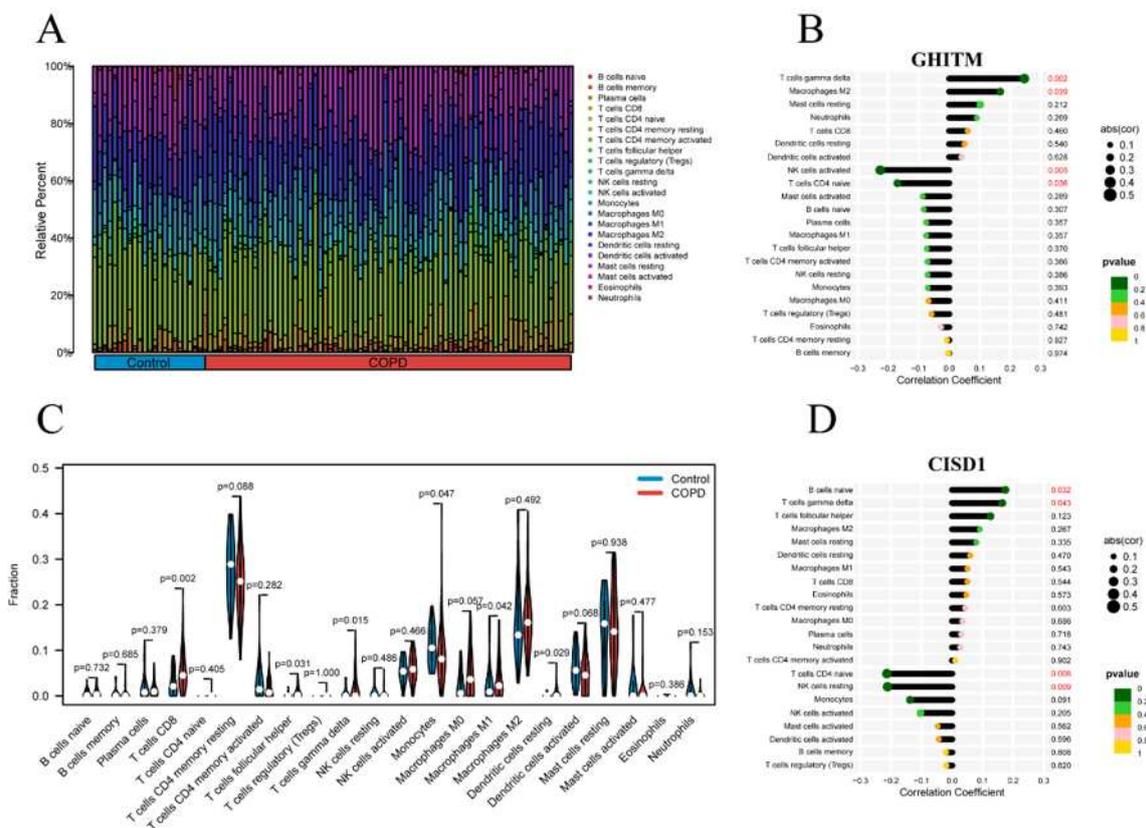


图 5A, C22 个免疫细胞亚群中 COPD 与吸烟肺功能正常患者之间免疫浸润的差异。5B,D 两个关键基因与 22 种免疫细胞进行相关性分析。

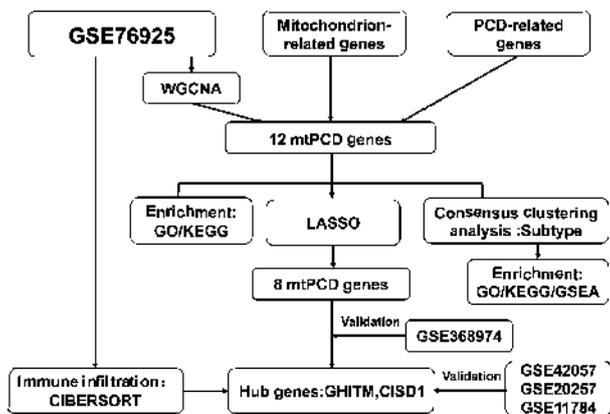


图 6 流程图

泊昔和抑制应激反应引起的细胞凋亡，表明所有的 BI-1 样超家族成员都有抗细胞凋亡作用^[11]。GHITM 蛋白在线粒体基质中高度表达，并与线粒体氧化呼吸功能密切相关。有研究发现，GHITM 基因敲除会导致线粒体内膜嵴紊乱和线粒体断裂，严重影响线粒体功能^[12]。L.Orliaguet^[13]等研究发现促炎因子 IRF5 可抑制线粒体基质成分生长激素诱导跨膜蛋

白 (GHITM) 基因的转录，从而抑制线粒体氧化呼吸。Bruno Seitaj 等^[14]研究发现，与野生型相比，TMBIM5 敲除细胞体积更小，增殖速度更慢，细胞线粒体膜电位降低，呼吸减弱，线粒体 ATP 生成减少。TMBIM5 敲除细胞对 Staurosporine 和 BCL-2 和 BCL-XL 诱导的凋亡更敏感。

CISD1 基因编码 mitoNEET 蛋白。线粒体外膜蛋白

mitoNEET 最开始是研究糖尿病治疗药物吡格列酮被发现,因为它来源于线粒体且结构中含有 Asn-Glu-Glu-Thr 氨基酸序列而被取名为 mitoNEET^[15]。NEET 蛋白家族成员还包括 CISD2 和 CISD3,三者有共同的 CDGSH 结构域,该结构域参与铁的转运^[16]。Stauch KL 等^[17]研究表明,mitoNEET 蛋白在调节线粒体功能时发挥关键作用。Wiley 等人^[18]研究表明,mitoNEET 基因敲除小鼠分离的心肌线粒体氧化能力明显降低,氧化磷酸化和电子传递过程的发生明显障碍,这说明 mitoNEET 是一种重要的含铁蛋白,参与线粒体的氧化供能。Habener 等人^[19]实验结果提示,利用 siRNA 技术干扰 mitoNEET 蛋白表达后小鼠缺血再灌注心肌细胞凋亡量增加 1.9 倍,而 mitoNEET 蛋白高表达后细胞凋亡率下降 53%,提示 mitoNEET 蛋白对氧化应激引起的细胞凋亡具有很强的抑制作用。Vernay 等人^[20]研究提示,细胞中缺乏 mitoNEET 蛋白将会引起细胞内线粒体总量减少,细胞的氧化呼吸功能减弱,提示 mitoNEET 蛋白参与维持线粒体的功能。Lipper 等^[21]研究表明,mitoNEET 能够结合在电压依赖性阴离子通道 (VDAC) 的中心腔内,并以氧化还原依赖性的方式调节其门控。通过连接 VDAC 功能,mitoNEET 和铁凋亡、细胞凋亡和铁代谢关系密切。Werner J 等^[22]研究表明,从缺乏 mitoNEET 的小鼠中分离的线粒体功能失调,表现为活性氧 (ROS) 升高和产生 ATP 的能力降低。步态分析显示,敲除 mitoNEET 小鼠的步幅缩短,平衡、握力和运动协调性能下降,与帕金森临床表型相似。

总之,GHITM、CISD1 在线粒体中均有表达,而线粒体功能障碍与癌症、糖尿病研究报道较多,与 COPD 研究报道较少。但是线粒体功能障碍会释放过多的活性氧破坏肺泡壁结构。线粒体功能障碍也会激活的 NLRP3 炎性小体引起 Caspase-1 介导的炎症因子 IL-1 β 和 IL-18 的释放,引起慢性炎症。GHITM、CISD1 与慢阻肺的报道几乎没有,后续可敲除 GHITM、CISD1 两个基因分别观察它们与慢阻肺、线粒体功能的关系。

参考文献:

[1]Araya J, Tsubouchi K, Sato N, et al. PRKN-regulated mitophagy and cellular senescence during COPD pathogenesis. *Autophagy*.2019;15(3):510-526.

[2]van der Toorn M, Rezayat D, Kauffman HF, et al. Lipid-soluble components in cigarette smoke induce mitochondrial

production of reactive oxygen species in lung epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2009;297(1):L109-L114.

[3]Mizumura K, Cloonan SM, Nakahira K, et al. Mitophagy-dependent necroptosis contributes to the pathogenesis of COPD. *J Clin Invest*.2014;124(9):3987-4003.

[4]Kosmider B, Lin CR, Karim L, et al. Mitochondrial dysfunction in human primary alveolar typeII cells in emphysema. *EBioMedicine*. 2019;46:305-316.

[5]Mahalanobish S, Dutta S, Saha S, Sil PC. Melatonin induced suppression of ER stress and mitochondrial dysfunction inhibited NLRP3 inflammasome activation in COPD mice. *Food Chem Toxicol*. 2020;144:111588.

[6]Li Y, Kelder B, Kopchick JJ. Identification, isolation, and cloning of growth hormone (GH)-inducible interscapular brown adipose complementary deoxyribonucleic acid from GH antagonist mice. *Endocrinology*. 2001;142(7):2937-2945. doi:10.1210/endo.142.7.8233.

[7]NAGEL J E, SMITH R J, SHAW L, et al. Identification of genes differentially expressed in T cells following stimulation with the chemokines CXCL12 and CXCL10 [J]. *BMC Immunology*, 2004, 5 (1): 17.

[8]REIMERS K, CHOI C Y, BUCAN V, et al. The growth-hormone inducible transmembrane protein (Ghitm) belongs to the Bax inhibitory protein-like family [J]. *International Journal of Biological Sciences*, 2007, 3 (7): 471.

[9]IHARA-OHORI Y, NAGANO M, MUTO S, et al. Cell death suppressor Arabidopsis bax inhibitor-1 is associated with calmodulin binding and ion homeostasis [J]. *Plant Physiology*, 2007, 143 (2): 650.

[10]Henke N, Lisak D A, SchneiderL, et al. The ancient cell death suppressor BAX inhibitor-1 [J]. *Cell Calcium*, 2011, 50(3): 251-260.

[11]Kim J.H., Lee E.R., Jeon K., Choi H.Y., Lim H., Kim S.J., Chae H.J., Park S.H., Kim S., Seo Y.R., Kim J.H., and Cho S.G., 2012, Role of BI-1 (TEGT)-mediated ERK1/2 activation in mitochondria-mediated apoptosis and splenomegaly in BI-1 transgenic mice, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1823 (4): 876-

888.

[12]Oka, T. et al. Identification of a novel protein MICS1 that is involved in maintenance of mitochondrial morphology and apoptotic release of cytochrome c. *Mol. Biol. Cell* 19, 2597 – 2608 (2008).

[13]Orliaguet L, Ejlalmanesh T, Humbert A, et al. Early macrophage response to obesity encompasses Interferon Regulatory Factor 5 regulated mitochondrial architecture remodelling. *Nat Commun.* 2022;13(1):508[14]Seitaj B, Maull F, Zhang L, et al. Transmembrane BAX Inhibitor-1 Motif Containing Protein 5 (TMBIM5) Sustains Mitochondrial Structure, Shape, and Function by Impacting the Mitochondrial Protein Synthesis Machinery. *Cells.* 2020;9(10):2147.

[15]Colca JR, McDonald WG, Waldon DJ, et al. Identification of a novel mitochondrial protein (“mitoNEET”) cross-linked specifically by a thiazolidinedione photoprobe. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2004;286(2):E252–E260.

[16]Sengupta S, Nechushtai R, Jennings PA, et al. Phylogenetic analysis of the CDGSH iron-sulfur binding domain reveals its ancient origin[J]. *Sci Rep*, 2018, 8 (1) : 4840.

[17]Stauch KL, Villeneuve LM, Totusek S, et al. Quantitative proteomics of presynaptic mitochondria reveal an overexpression and biological relevance of neuronal mitoNEET in postnatal brain development[J]. *Dev Neurobiol.* 2019, 79 (4) : 370–386.

[18]Wiley SE, Murphy AN, Ross SA, et al. MitoNEET is an iron-containing outer mitochondrial membrane protein that regulates oxidative capacity[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*,

2007, 104 (13) : 5318–5323.

[19]Habener A, Chowdhury A, Echtermeyer F, et al. MitoNEET protects HL-1 cardiomyocytes from oxidative stress mediated apoptosis in an in vitro model of hypoxia and reoxygenation[J]. *PLoS One*, 2016, 11 (5) : e0156054.

[20]Vernay A, Marchetti A, Sabra A, et al. MitoNEET-dependent formation of intermitochondrial junctions[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, 114 (31) : 8277–8282.

[21]Lipper CH, Stofleth JT, Bai F, et al. Redox-dependent gating of VDAC by mitoNEET[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2019, 116 (40) : 19924–19929.

[22]Geldenhuys WJ, Benkovic SA, Lin L, et al. MitoNEET (CISD1) Knockout Mice Show Signs of Striatal Mitochondrial Dysfunction and a Parkinson’s Disease Phenotype. *ACS Chem Neurosci.* 2017;8(12):2759–2765.

[23]易晓菲, 马南, 何志义. 加权基因共表达网络分析鉴定间质性肺疾病关键节点基因 [J]. *广西医科大学学报*, 2020, 37(01):29–36. DOI:10.16190/j.cnki.45-1211/r.2020.01.004.

[24]周舟, 周广, 梁彩霞, 等. 基于生物信息学方法筛选及验证慢性阻塞性肺疾病中的焦亡相关基因 [J]. *广西医科大学学报*, 2023, 40(03):362–368. DOI:10.16190/j.cnki.45-1211/r.2023.03.004.

作者简介:

靖志涛 (1991—), 男, 汉族 湖北武汉人 硕士研究生 广西医科大学第一附属医院 住院医师 研究方向: 慢阻肺。

基金项目: 青年科学基金项目 (No.81800037)。