原创精选 Selected article

基于单细胞 RNA 测序和空间转录组测序分析 矽肺中巨噬细胞差异基因及其功能

周馨蓓^{a,b},张伟^b,巢杰^{a,b}

东南大学 a. 公共卫生学院/环境医学工程教育部重点实验室 b. 医学院生理系, 江苏 南京 210009

摘要:

[背景] 单细胞 RNA 测序技术(scRNA-seq)和空间转录组测序技术的兴起使得肺部疾病得以 深入研究,但这两者在矽肺中的研究甚少。

[目的] 利用 scRNA-seq 联合空间转录组测序技术探索矽肺巨噬细胞中差异表达基因(DEGs) 和潜在诊断基因。

[方法] 雄性 C57BL/6 小鼠(5~6 周龄, 22~30 g)随机分为 4 组, 即生理盐水(NS)组 7 d、NS 组 56 d、SiO₂ 组 7 d 及 SiO₂ 组 56 d, 每组各 1 只。SiO₂ 组小鼠通过气管滴注 SiO₂ 悬液(0.2 g·kg⁻¹, 50 mg·mL⁻¹) 构建矽肺模型, 对照组小鼠给予相同体积 NS, 第 7、56 天分别摘取右肺用于 scRNA-seq 以及左肺用于空间转录组测序。利用主成分分析技术和均匀流形逼近和投影降维, 捕获 细胞群。应用 R 语言的 Find Markers 函数分析两组肺组织中巨噬细胞的 DEGs 变化, 对相应 的 DEGs 进行基因本体富集分析和京都基因与基因组百科全书信号通路分析, 同时应用 STRING 及 Cytoscape 软件的 CytoHubba 插件进行蛋白相互作用网络分析, 筛选出关键(Hub) 基因。运用空间转录组测序探究 Hub 基因在肺组织切片上的原始位置以及在肺巨噬细胞中 的映射。最后验证 Hub 基因在矽肺病患者肺组织和小鼠矽肺模型中表达水平的关联性以及 运用受试者工作特征曲线验证 Hub 基因诊断效能。体外实验应用细胞活力检测技术, 验证 SiO₂ 刺激下小鼠巨噬细胞(RAW264.7)活力的变化。

[结果] scRNA-seq 显示共捕获并定义了 20 个细胞群。scRNA-seq 和空间转录组测序结果显示, 与 NS 组相比,在 SiO₂ 组小鼠肺组织中观察到巨噬细胞数量增多且聚集在病灶区。共筛选出 97 个巨噬细胞 DEGs,包括 75 个上调基因,主要富集于中性粒细胞的趋化和迁移、趋化因子 受体结合、肿瘤坏死因子信号通路、细胞因子-细胞因子受体相互作用通路、白介素-17 信号 通路等过程中;22 个下调基因,主要富集于晚期内吞体、过氧化物酶体增殖物激活受体信号 通路和酒精性肝病信号通路等过程中。共筛选出 2 个核心模块和 3 个 Hub 基因,包括 Cc/2、 Cc/7、Ptgs2, scRNA-seq 显示与 NS 组相比,它们在 SiO₂ 组的表达水平升高且聚集在新增的巨 噬细胞中,空间转录组测序显示它们聚集在炎性伴有结节病灶区;CCL7、PTGS2 在矽肺患者 肺组织中表达量相较于健康者增高,受试者工作曲线下的面积分别为 0.850 和 0.786。与 0 h 相比,SiO₂ 刺激下 3 h、6 h、12 h RAW264.7 细胞活力增强(P<0.05)。

[结论] 通过生物信息学筛选出了矽肺小鼠肺组织的 3 个 Hub 基因(*Ccl2、Ccl7、Ptgs2*)和 2 个 潜在诊断基因(*CCL7、PTGS2*)可能是潜在的矽肺早期阶段的分子生物学标志物,对矽肺的发 生发展和预后存在一定的影响。

关键词: 矽肺 ; 单细胞 RNA 测序 ; 空间转录组测序 ; 差异表达基因 ; 蛋白质互相作用网络 ; 富集分析

Macrophage differential genes and their functions in silicosis based on single cell RNA sequencing and spatial transcriptome sequencing ZHOU Xinbei^{a,b}, ZHANG Wei^b, CHAO Jie^{a,b} (a. Key Laboratory of Environmental Medicine Engineering, Ministry of Education/School of Public Health b. Department of Physiology, School of Medicine, Southeast University, Nanjing, Jiangsu 210009, China)

Abstract:

[Background] The rise of single cell RNA sequencing (scRNA-seq) and spatial transcriptome sequencing technologies has allowed for intensive study of lung diseases, but both have been poorly studied in silicosis.

[Objective] To explore differentially expressed genes DEGs in silicosis macrophages by scRNA-



DOI 10.11836/JEOM22185

基金项目 国家自然科学基金项目(81972987)

作者简介 周馨蓓(1997—),女,硕士生; E-mail: zxb0805@126.com

通信作者 巢杰, E-mail: chaojie@seu.edu.cn

伦理审批 已获取 利益冲突 无申报 收稿日期 2022-05-15 录用日期 2022-12-09

文章编号 2095-9982(2022)12-1350-09 中图分类号 R114 文献标志码 A

▶引用

周馨蓓,张伟,巢杰.基于单细胞 RNA 测序和 空间转录组测序分析矽肺中巨噬细胞差异 基因及其功能 [J].环境与职业医学,2022, 39(12):1350-1358.

▶本文链接

www.jeom.org/article/cn/10.11836/JEOM22185

Funding

This study was funded.

Correspondence to CHAO JIE, E-mail: chaojie@seu.edu.cn

Ethics approval Obtained Competing interests None declared Received 2022-05-15 Accepted 2022-12-09

To cite

ZHOU Xinbei, ZHANG Wei, CHAO Jie. Macrophage differential genes and their functions in silicosis based on single cell RNA sequencing and spatial transcriptome sequencing [J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2022, 39(12): 1350-1358.

Link to this article

www.jeom.org/article/en/10.11836/JEOM22185

seq combined with spatial transcriptome sequencing and analyze the potential diagnostic genes.

[Methods] Male C57BL/6 mice (5-6 weeks old, 22-30 g) were randomly divided into 4 groups: normal saline (NS) group for 7 d, NS group for 56 d, SiO₂ group for 7 d, and SiO₂ group for 56 d, with 1 mouse in each group. A silicosis model was constructed by tracheal drip injection of SiO₂ suspension (0.2 g·kg⁻¹, 50 g·cm⁻²), and the control mice were given the same volume of NS. The right lung was removed for scRNA-seq and the left lung for spatial transcriptome sequencing on day 7 and day 56, respectively. Cell populations were captured using principal component analysis techniques and dimensionality reduction of uniform manifold approximation and projection. The Find Markers function in R language was applied to analyze the DEGs changes of macrophages in two groups of lung tissues, and the corresponding DEGs were subjected to Gene Ontology enrichment analysis and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes signaling pathway analysis, while STRING and CytoHubba plug-ins of Cytoscape software were applied to protein-protein interaction network analysis to screen out key (Hub) genes. Spatial transcriptome sequencing was used to explore the original location of Hub genes on lung tissue sections and their mapping in lung macrophages. Finally, the correlation of Hub gene expression levels in lung tissues of silicosis patients and mouse silicosis models was verified, the diagnostic efficacy of Hub gene using subject operating characteristic curves (ROC). *In vitro* experiments by applying cell viability assay were conducted to verify the changes in viability of mouse macrophages (RAW264.7) under SiO₂ stimulation.

[Results] The scRNA-seq revealed a total of 20 clusters captured and defined. The results of scRNA-seq and spatial transcriptome sequencing showed an increased number of macrophages in the lung tissue of the SiO₂ group compared to the NS group and clustered in the focal areas. Among the 97 macrophage DEGs screened out, 75 were up-regulated genes, and mainly enriched in chemotaxis and migration of neutrophils, chemokine receptor binding, tumor necrosis factor signaling pathway, cytokine-cytokine receptor interaction pathway, and interleukin-17 signaling pathway; and 22 were down-regulated genes, and mainly enriched in late endosomes, peroxisome proliferator-activated receptors signaling pathway, and alcoholic liver disease signaling pathway. A total of 2 core modules and 3 Hub genes were screened out, including *Ccl2*, *Ccl7*, and *Ptgs2*. The scRNA-seq showed that they were expressed at elevated levels in the SiO₂ group compared to the NS group and clustered in additional macrophages, and the spatial transcriptome sequencing showed that they clustered in inflammatory areas with nodular lesions. The *CCL7* and *PTGS2* expressions were increased in the lung tissue of SiO₂ patients compared with the healthy subjects, and the areas under the working curve of the subjects were 0.850 and 0.786, respectively. The viability of RAW264.7 cells was enhanced under SiO₂ stimulation at 3 h, 6 h, and 12 h compared to those without the stimulation (*P* < 0.05).

[Conclusion] Bioinformatics screening have identified 3 Hub genes (*Ccl2*, *Ccl7*, and *Ptgs2*) and 2 potential diagnostic genes (*CCL7* and *PTGS2*) in the lung tissue of silicosis mice, which may be potential molecular markers of early-stage silicosis with implications for the development and prognosis of silicosis.

Keywords: silicosis; single cell RNA sequencing; spatial transcriptome sequencing; differentially expressed gene; protein-protein interaction network; enrichment analysis

矽肺是吸入大量游离的二氧化硅(silicon dioxide, SiO₂)粉尘引起的以肺组织弥漫性进行性纤维化为特 征的疾病,既是威胁人们身体健康的医学难题,也是 危害公共卫生的社会问题^[1]。根据国家卫生健康委员 会发布的 2020 年全国职业病报告,职业性尘肺病及 其他呼吸系统疾病 11877 例(职业性尘肺 11809 例)^[2]。 矽肺纤维化会导致肺部功能严重受损并表现为不同 程度的呼吸系统疾病,如咳嗽、咳痰、胸闷,随着病程 的恶化,甚至会引起肺结核、气胸等严重并发症^[3]。近 年来关于矽肺的研究较多, Chen 等^[4]发现阻断自噬降 解可能会加重人矽肺病中的肺泡巨噬细胞凋亡,这与 Zhao 等^[5]发现一致,即靶向肺泡巨噬细胞可能是治疗 肺纤维化疾病的前瞻性途径。肺泡巨噬细胞作为一种 驻留在肺组织中的固有细胞,在维持肺部内环境的稳 定和宿主防御方面扮演着重要角色⁶⁰。研究表明,在砂 肺早期,肺泡巨噬细胞极性转化和活化后能够识别并 吞噬 SiO,颗粒,启动炎症反应,通过释放促炎因子、趋 化因子等参与矽肺纤维化进程^[3]。尽管如此,由于矽肺 病理的复杂性,关于矽肺的研究大多限于探究成纤维 细胞在疾病发生发展中的作用^[7-9],但对接触 SiO₂ 粉尘

的肺部巨噬细胞进行生物标记物的识别以及利用生物信息学探究一些潜在的差异表达基因(differentially expressed genes, DEGs)、Hub基因和相关信号通路的文献少有报道,而这将有助于及早发现矽肺并了解矽肺发生发展的分子机制,并为矽肺患者的早期筛检提供候选靶点。因此,需要进一步扩大对矽肺的细胞和分子水平的认识,提高对该病的诊断和防治水平。

随着生物信息学技术的迅猛发展,单细胞 RNA 测 序技术(single cell RNA sequencing, scRNA-seq)和空间 转录组测序技术的兴起使得肺部疾病得以深入研究,包 括特发性纤维化中内皮细胞异质性的鉴定^[10]以及对损 伤的纤维化反应所需的过渡性巨噬细胞的病理亚群的 特征^[11-12],两者的联合使用可以发现细胞在时间维度和 空间维度上的完整基因信息^[13-14]。为揭示肿瘤分子生物 学的启动事件,进而识别可能作为诊断生物标志物的 Hub 基因,scRNA-seq 和空间转录组测序技术正积极地被 用于癌症的研究之中^[15],但这两者在矽肺中的研究甚少。

本研究旨在基于不同种类的亚群细胞的标记基因,对矽肺小鼠模型巨噬细胞的 DEGs 进行基因本体分析(Gene Ontology, GO)和京都基因与基因组百科全

书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) 信号通路分析以及构建蛋白-蛋白互作(protein-protein interaction, PPI)网络以寻找 Hub 基因,为后续探 索 SiO₂ 粉尘诱导矽肺发病的分子机制及寻找潜在诊 断标志物提供依据。

1 对象与方法

1.1 仪器与试剂

SiO₂颗粒(约 80%的颗粒直径在 1~5 μm 之间; Sigma-Aldrich,美国),二氧化碳培养箱(ESCO,新加坡), 高温低速冷冻离心机(Eppendorf,德国),DMEM 培养 基(Corning,美国),细胞计数试剂(Cell Counting Kit-8, CCK-8)试剂盒(APExBIO,美国)及 Spectra Max 微板阅 读器(BioTek,美国)。

1.2 CCK-8 检测细胞活力

将小鼠单核巨噬细胞白血病细胞 RAW264.7 细胞 以每孔 1×10⁵ 个接种在 96 孔板中,在 5%CO₂、37 ℃ 的条件下继续培养,待细胞完全贴壁后,分别在 0、1、 3、6、12 和 24 h,结合前期实验室研究结果¹¹⁶,使用 50 µg·cm⁻² SiO₂ 悬液刺激 RAW264.7 细胞,接着将 CCK-8 试剂加入细胞培养液中,37 ℃ 避光孵育 2~4 h。孵 育后使用微板阅读器记录 450 nm 处的光密度,以未 含细胞的完全培养基为空白对照,以 0 h SiO₂ 刺激点 为平行对照,细胞活力=[(实验孔光密度-空白孔光密度)/ (对照孔光密度-空白孔光密度)]×100%。

1.3 小鼠矽肺模型的建立

从南京医科大学实验室购买 C57BL/6 小鼠(22~30g), 5~6 周龄,雄性(避免雌性小鼠生理周期对实验结果的 影响),在恒温(23°C)、恒湿(50%)条件下进行12h:12h 的光/暗循环,自由进食和饮水。采用随机数表法,将 小鼠随机分为实验组与对照组,每组各2只,共4只。 对照组分为生理盐水(normal saline, NS)7 d 组和 56 d 组,每组各1只。实验组分为SiO,7d组和56d组,每 组各1只。每组小鼠均采取腹腔注射戊巴比妥钠麻醉, 颈部剃毛后,75%酒精消毒皮肤,手术暴露气管。SiO。 组将制备好的 SiO₂ 混悬液(0.2 g·kg⁻¹, 50 mg·mL⁻¹)^[1, 16] 一次性气管内滴注。NS 组给予相同体积的无菌 NS。 NS 组与 SiO, 组小鼠均分别在第7天和第56 天经磷 酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)灌流右心 室后收集肺组织。所有用于测序的小鼠经计算机断层 扫描、苏木精-伊红染色法、天狼星红染色证实,均已 符合疾病模型[17]。所有动物手术均严格按照《美国国立 卫生研究院实验动物护理和使用指南》执行。本实验方

案由东南大学实验动物伦理委员会批准(20190121002)。

1.4 scRNA-seq

将第7天和第56天收集的肺组织切割成1mm³ 大小后使用肺分离试剂盒(Miltenyi Biotech,130-095-927,德国)得到单个细胞,使单个细胞悬浮在含0.04% 胎牛血清的PBS中,最终捕获的细胞数目约为1×10⁴。 将成功捕获的细胞放置在单个基因组规模的代谢网 络中进行反转录,得到条形码编码。测序部分由北京 博奥生物技术有限公司完成。先后使用 Cell Ranger 4.0.0 软件和 Cellranger aggr 插件对数据归一化进行主 成分分析和无监督聚类。

1.5 空间转录组测序

将第 7 天和第 56 天收集肺组织后立即用最佳切 片温度包埋胶包埋,放于-80 °C 保存,使用冰冻切片 机制作 10 μm 厚度肺组织切片,送至北京博奥生物技 术有限公司完成测序。使用 10× Space Ranger 软件得 到特征条形码矩阵,基于 10 个主成分图进行聚类算 法在二维空间中实现点的可视化。

1.6 DEGs 筛选、GO 及 KEGG 信号通路富集分析

主成分分析降维后选取前主成分并使用 R 软件 (4.0.3)的 Seurat 包进行均匀流形逼近和投影(uniform manifold approximation and projection, Umap)聚类分 析,接着使用 Seurat 包的 Find Markers 函数分析模型 组小鼠肺组织与对照组小鼠肺组织之间的 DEGs,计算 差异倍数(fold change, FC)、q值,并根据 P < 0.05和 log|2FC|>1的标准筛选 DEGs。使用 Metascape 在线网 站(https://metascape.org/gp/index.html#/main/step1) 对巨噬细胞 DEGs 进行 GO 功能富集和 KEGG 信号通 路分析,分析 DEGs 可能参与的生物学过程、分子功能、 细胞成分及信号通路等,以各部分基因富集数目排名 前 5 且 P < 0.05为入选标准。

1.7 PPI 网络的构建及 Hub 基因的筛选

利用 STRING 数据库(http://string-db.org/)以及 Cytoscape 软件联合分析构建巨噬细胞差异基因蛋白 互作网络。根据 CytoHubba 插件中 5 种分类方法:最 大 邻 域 分 量(maximum neighborhood component, MNC)、最大邻域分量密度(density of maximum neighborhood component, DMNC)、径向度(Radiality)、闭 合性(Closeness)、偏心率(EcCentricity),选择每种排 名方法的前 20 个基因。

利用 MCODE 插件以及 Venn 软件(http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/)依据连接度筛 选出 Hub 基因以及 PPI 网络中最显著的模块。接着在 R(4.0.3)软件中利用 Find Markers 函数计算 Hub 基因的归一化表达值、g 值以及 log [2FC]。

1.8 Hub 基因在矽肺患者肺组织中的验证

基于 Pang 等^[18]公开的数据(矽肺组织来自肺移植 的晚期矽肺病患者,对照组的肺组织来自健康捐赠 者),在矽肺患者中对筛选出的 Hub 基因进行验证以 及分析本研究 SiO₂ 小鼠模型中 Hub 基因与其存在的 关联性。使用 R 软件包(3.5.2)生成受试者工作特征曲 线(receiver operating characteristic curve, ROC),计算 曲线下面积(the area under the curve, AUC),判断 Hub 基因的诊断价值。

1.9 统计学分析

数据以平均值±标准误表示。使用 SPSS 23.0 进行 非配对 *t* 检验(两组)或方差分析(two-way ANOVA; 三 组及以上)比较未配对的数值数据。检验水准 *α*=0.05。

2 结果

2.1 SiO₂ 诱导小鼠巨噬细胞的变化

本研究一共定义了 20 个聚类的细胞群,如图 1A 所示,相较于 NS 组,SiO₂ 组 7 d 和 56 d 中巨噬细胞数 量均增多(图 1B、C)。细胞活力实验中,相较于 0 h, SiO₂刺激后 3 h、12 h、24 h 巨噬细胞活力增加(P<0.05) (图 1D)。

2.2 差异基因筛选及 PPI 网络的构建

将筛选到的 97 个 DEGs 导入到 PPI 网络复合体 中,该复合体包含了 79 个节点,824 个边界,其中包 括 75 个上调基因和 22 个下调基因(图 2A)。使用 Cytoscape 软件的 MCODE 插件对 PPI 网络进行分组, 形成多个模块。根据评分排名筛选出前 2 位的模块, 分别为 16 个节点、168 个边界和 12 节点、80 个边界 (图 2B、C)。



[注] A: NS 组和 SiO₂ 组的 scRNA-seq 结果经归一化后细胞分群在 Umap 图上的展示。B: NS 组和 SiO₂ 组巨噬细胞在 Umap 图上展示。C: NS 组和 SiO₂ 组巨噬细胞变化。D: SiO₂ 刺激下巨噬细胞的细胞活力变化(*n*=3),与 0 h 相比,*: *P*<0.05。

[Note] A: The scRNA-seq results of the NS and SiO₂ groups normalized to the cell subpopulation are shown on the Umap graph. B: Macrophages in the NS and SiO₂ groups are shown on the Umap graph. C: Changes of macrophages in the NS and SiO₂ groups. D: Cell viability changes of macrophages under SiO₂ stimulation (*n*=3), compared with 0 h, *: *P*<0.05.

图 1 SiO₂ 诱导的矽肺小鼠肺组织中巨噬细胞数量及活力的变化

Figure 1 Changes in the number and viability of macrophages in the lung tissue of SiO₂-induced silicosis mice

2.3 差异基因富集分析结果

通过 Metascape 软件对全部 97 个 DEGs 进行分析,GO 分析的结果见表 1 和表 2。上调的 DEGs 主要富集在中性粒细胞的趋化和迁移、粒细胞的趋化和迁

移、髓样白细胞的迁移等生物学过程(表 1),而下调 的 DEGs 主要参与髓鞘的调节、脂肪细胞分化的调节、 脂质生物合成过程的调节、神经系统发展的调节、脂 质代谢过程的正向调节等生物学过程(表 2)。在分子 功能方面,上调的 DEGs 主要包含趋化因子活性、趋化 因子受体结合、细胞因子活化、CCR1 趋化因子受体结 合等(表 1)。对于细胞成分,上调的 DEGs 明显富集在 溶酶体、质膜的外侧、晚期内吞体等过程中,而下调的 DEGs 主要包含水解酶活性(作用于酯键)、催化活性(作用于 RNA)(表 2)。



[注] A: DEGs PPI 网络联合体, 蓝色圆圈表示下调的 DEGs, 红色圆圈表示上调的 DEGs。B、C: 通过 Cytoscape 软件中的 MCODE 插件进行分析排名前 2 的模块(程度阈值=2, 节点分数截止=0.2, k-core=2, 最大深度=100)。

[Note] A: DEGs PPI network consortia, blue circles indicate down-regulated DEGs and red circles indicate up-regulated DEGs. B-C: Top 2 modules by the MCODE plug-in in Cytoscape software (degree cutoff=2, node score cutoff=0.2, k-core=2, and max. depth=100).

图 2 差异基因筛选及 PPI 网络的构建

Figure 2 Differential gene screening and construction of PPI network

表1 上调 DEGs 的 GO 和 KEGG 分析结果

Table 1 Results of GO and KEGG analyses of up-regulated DEGs

60/WE66	+#++*(D	计数				
GU/KEGG	油还(Description)	(Count)	Р			
生物学过程(Biological process)						
GO:0030593	中性粒细胞趋化(Neutrophil chemotaxis)	12	<0.001			
GO:0071621	粒细胞趋化(Granulocyte chemotaxis)	12	<0.001			
GO:1990266	中性粒细胞迁移(Neutrophil migration)	12	<0.001			
GO:0097529	髓样细胞迁移(Myeloid leukocyte migration)	13	<0.001			
GO:0097530	粒细胞迁移(Granulocyte migration)	12	<0.001			
细胞成分(Cellular co	mponent)					
GO:0000323	溶酶体(Lytic vacuole)	15	<0.001			
GO:0005764	细胞液泡(Lysosome)	15	<0.001			
GO:0005773	液泡(Vacuole)	15	<0.001			
GO:0009897	质膜的外侧(External side of plasma membrane)	15	<0.001			
GO:0005770	晚期内吞体(Late endosome)	7	<0.001			
分子功能(Molecular	function)					
GO:0008009	趋化因子活化(Chemokine activation)	8	<0.001			
GO:0042379	趋化因子受体结合(Chemokine receptor binding)	9	<0.001			
GO:0031726	CCR1趋化因子受体结合(CCR1 chemokine receptor binding)	5	<0.001			
GO:0005125	细胞因子活化(Cytokine activation)	11	<0.001			
GO:0048020	CCR趋化因子结合(CCR chemokine receptor binding)	7	<0.001			
KEGG信号通路(KEGG signaling pathway)						
mmu04061	病毒蛋白与细胞因子和细胞因子受体相互 作用(Viral protein interaction with cytokine and cytokine receptor)	8	<0.001			
mmu04060	细胞因子与细胞因子受体相互作用 (Cytokine-cytokine receptor interaction)	11	<0.001			
mmu04062	趋化因子信号传导途径(Chemokine signaling pathway)	9	<0.001			
mmu04668	肿瘤坏死因子信号通路(TNF signaling pathway)	8	<0.001			
mmu04657	白介素-17信号通路(IL-17 signaling pathway)	7	<0.001			

表 2 下调 DEGs 的 GO 和 KEGG 分析结果

Table 2 Results of GO and KEGG analyses of

down-regula	ated DEGs
-------------	-----------

GO/KEGG	描述(Description)	计数(Count)	Р		
生物学过程(Biological process)					
GO:0031641	髓鞘的调节(Regulation of myelination)	3	<0.001		
GO:0045598	脂肪细胞分化的调节(Regulation of fat cell differentiation)	3	<0.001		
GO:0046890	脂质生物合成过程的调节(Regulation of lipid biosynthetic process)	3	0.001		
GO:0051960	神经系统发育的调节(Regulation of nervous system development)	4	0.003		
GO:0045834	脂质代谢过程的正向调节(Positive regulation of lipid metabolic process)	4	<0.001		
细胞成分(Cellula	r component)				
GO:0016788	水解酶活性(作用于酯键)(Hydrolase activity, acting on ester bonds)	5	0.001		
GO:0140098	催化活性(作用于RNA)(Catalytic activity, acting on RNA)	3	0.008		
KEGG信号通路(KEGG signaling pathway)					
mmu03320	过氧化物酶体增殖物激活受体信号传 导途径(PPAR signaling pathway)	3	<0.001		
mmu04936	酒精性肝病(Alcoholic liver disease)	3	<0.001		

KEGG 分析结果中,上调的 DEGs 富集于肿瘤坏死 因子信号通路、细胞因子-细胞因子受体相互作用通 路、白介素-17 信号通路、趋化因子信号通路、病毒蛋 白与细胞因子和细胞因子受体的相互作用通路中 (表 1),而下调的 DEGs 包括过氧化物酶体增殖物激活 受体信号通路和酒精性肝病信号通路(表 2)。

2.4 Hub 基因筛选

Cytoscape 中筛选出的 20 个基因通过 Venn 重叠 出前 3 个 Hub 基因: *Ccl2、Ccl7、Ptgs2*(图 3)。其归一 化表达值、*q* 值以及 log|2FC|结果见表 3,其中 *Ccl2* 的 log|2FC|为 2.62,位于三个 Hub 基因之首。





2.5 scRNA-seq 联合空间转录组测序探究 Hub 基因 表达水平

scRNA-seq 结果(图 4A)显示,相较于 NS 组, SiO₂ 组中巨噬细胞内 *Ccl2、Ccl7、Ptgs2* 表达水平增高且均 聚集在新增的巨噬细胞内,同时 7 d 的表达水平高于 56 d。空间转录组测序的结果(图 4B)显示,相较于 NS 组, SiO₂ 组中巨噬细胞数量以及 *Ccl2、Ccl7、Ptgs2* 表达水平升高,7 d 组主要分布在炎性浸润区,56 d 组 分布在炎性渗出伴有实质病变区。

2.6 矽肺患者组织中 Hub 基因水平

进一步分析矽肺患者肺组织和健康者肺组织中 3 个 Hub 基因的水平,发现 CCL7、PTGS2 是差异基因 且为上调基因,而 CCL2 并非差异基因。通过关联分析, 发现 CCL7 在矽肺患者和矽肺小鼠模型中的差异倍数 log|FC|均高于 PTGS2。具体差异倍数值如图 5A 所示。 接着基于表达矩阵,利用 ROC 曲线分析 CCL7 和 PTGS2 基因的诊断效能。如图 5B-C 所示,这 2 个基因的 AUC 均 > 0.7,说明这 2 个基因对矽肺诊断的敏感度和特异 度都很高。

表 3 Hub 基因在巨噬细胞内的归一化表达值、 *q* 值以及 log|2FC|

Table 3 Normalized expression values, *q*-values, and log|2FC| of Hub genes in macrophages

基因(Gene) –	标准归一化后的表达值(Normalized expression)					
	NS 7 d	NS 56 d	SiO ₂ 7 d	SiO₂ 56 d	-log 2FC	q
Ccl2	-0.211	-0.153	1.424	0.284	2.622	1.3×10 ⁻¹¹¹
Ccl7	-0.224	-0.175	0.864	0.278	2.156	5.38×10 ⁻⁷²
Ptgs2	-0.416	-0.403	0.234	-0.283	1.162	4.47×10 ⁻⁵⁹





[注] A: scRNA-seq 分析巨噬细胞内 Ccl2、Ccl7、Ptgs2 的变化。B: Ccl2、Ccl7、Ptgs2 mRNA 和巨噬细胞的空间表达以及单细胞-空间转录组映射。黄色 框线表示炎症伴有矽结节病灶区。

[Note] A: scRNA-seq analysis of changes in *Ccl2*, *Ccl7*, and *Ptgs2* in macrophages. B: Spatial expression of *Ccl2*, *Ccl7*, *Ptgs2* mRNA and macrophages as well as single cell-space transcriptome mapping. The yellow boxed line indicates inflammation with focal areas of silicosis nodules.

图 4 小鼠肺组织中 Hub 基因的变化

Figure 4 Changes in Hub genes in mouse lung tissue





[Note] A: Association of Ccl7 and Ptgs2 in lung tissues of silicosis patients and silicosis mice. B-C: Validation of ROC for diagnostic efficacy of CCL7 and PTGS2 in lung tissues of silicosis patients.

图 5 矽肺患者肺组织中 Hub 基因的表达水平

Figure 5 Expression levels of Hub genes in lung tissues of silicosis patients

3 讨论

本研究通过 scRNA-seq 定义了 20 个细胞簇,发现 在 SiO,模型组小鼠中,巨噬细胞数量增加,体外细胞 活力实验也显示在 SiO, 刺激后, 巨噬细胞活力呈时间 依赖性上升。在 SiO2 处理 56 d 的小鼠肺组织中, 巨噬 细胞数量仍持续增高,这可能和巨噬细胞的极化使他 们能够获得与矽肺的两个不同阶段相对应的独特的 促炎或促纤维化功能有关^[19]。SiO, 激活巨噬细胞后激 发了炎症反应, M1 巨噬细胞在这一阶段的矽肺中起 着至关重要的作用^[20]。随着炎症的发展,肺细胞不断 死亡,当损伤达到一定程度时,组织修复开始。组织修 复依赖于免疫抑制和促进生长的组织微环境,这个阶 段依靠 M2 巨噬细胞通过分泌抗炎细胞因子白介素-10 和 TGF-β1 来抗炎,促进免疫抑制和组织重塑^[21]。因 此,有理由相信 SiO2 组 7 d 小鼠肺组织中巨噬细胞数 目增加可能是 SiO, 对肺泡巨噬细胞的激活和由此引 发的 M1 极化所致, 而 56 d 巨噬细胞的持续增多可能 是巨噬细胞 M2 向极化的原因。

本研究通过构建 PPI 网格图以及 Cytoscape 软件 处理后识别了 75 个上调基因和 22 个下调基因,上调 基因主要富集在趋化因子活化以及受体结合等过程 中,这与本研究最终筛选出 3 个 Hub 基因(*Ccl2、Ccl7、 Ptgs2*)密切相关,而趋化因子的活化可驱动肺部炎症 及纤维化反应^[22]。这 3 个基因在 SiO₂ 组的表达水平均 升高,分布在新增的巨噬细胞中且聚集在炎症浸润伴 有矽结节病灶区。根据 Pang 等^[18]公开的数据,发现在 矽肺患者肺组织 *CCL7* 和 *PTGS2* 为 DEGs 且为上调,且 两者的 AUC 均高于 0.7,证明可作为矽肺诊断的生物 标志物,敏感度和特异度都很高。但在临床应用中获 取肺组织较难,所以需要进一步探讨所选的基因是否 在肺泡灌洗液和外周血中也具有良好的诊断效能。

趋化因子配体-2(C-C chemokine ligand 2, CCL2)通 过与 C-C 趋化因子受体 2(C-C chemokine receptor 2, CCR2)结合来介导其作用。在亚慢性和 14 d 急性矽肺 患者肺泡灌洗液中检测到 CCL2 的蛋白含量升高^[23],同 样地在特发性纤维化(idiopathic pulmonary fibrosis, IPF)受试者的支气管肺泡灌洗液和血清样本中也发 现 CCL2 升高^[24]。然而本研究中矽肺患者组织的 *CCL2* 水平未见升高,这可能与支气管 BALF 以及血清的稀 释效应有关。尽管如此,以上数据仍提示 CCL2 的表达 在矽肺纤维化形成过程中的重要性,通过检测肺泡灌 洗液或者血清的 CCL2 可能是矽肺或者 IPF 患者潜在 的筛检手段。

前列腺素-过氧化物合成酶 2(prostaglandin-endoperoxide synthase 2, Ptgs2),又称环氧合酶 2(cyclooxygenase 2, COX-2),是参与细胞急性炎症反应的 主要分子之一。Wang 等^[25]揭示 COX-2 可能通过高表 达参与肺泡炎性反应和肺纤维化早期反应。本研究中 SiO₂小鼠肺组织中检测到的 COX-2 水平低于 *CCL*ス *CCL2*,但矽肺患者组织中却检测到高水平的 COX-2, 且 AUC 大于 0.8,诊断效能较高,这可能归因于小鼠和 人之间存在物种差异。同时有文献报道 COX-2 特异性 抑制剂可以减少小鼠肝脏和肾脏的纤维化^[26-28]。因此, 考虑使用特异的 COX-2 阻滞剂和一线抗纤维化药物 会更安全地抑制纤维化患者疾病进展。

趋化因子配体-7(C-C chemokine ligand 7, CCL7)介 导天然和获得性免疫^[29],对巨噬细胞募集至关重要^[30]。 对新冠肺炎患者血浆细胞因子进行检测,发现 CCL7 与疾病严重程度相关^[31-32]。同时,Kalafatis 等^[33]在 IPF 患者脱细胞组织以及血清中检测到高水平的 CCL7,本 实验在矽肺小鼠以及患者肺组织中均检测到 *CCL7*,且 矽肺患者组织中 *CCL7* 高于健康者,AUC>0.7。鉴于 CCL7 在新冠肺炎、IPF 以及矽肺中的预测作用,本研究 推测未来可通过设计矽肺患者队列扩大样本量进一 步研究,以验证 CCL7 升高与矽肺病程相关性。

但本研究存在一定的缺陷。首先,仅利用动物进行 scRNA-seq 和空间转录组测序,设置的四个组别均为一只小鼠,病理结果显示矽肺模型组均已达到疾病模型,但组学技术需扩大样本量。其次啮齿类动物和人类之间的遗传、解剖和行为差异使得将小鼠的结果转化为人类的结果具有不确定性。因此,有必要增加对矽肺患者的样本测序和分析。最后本研究设计是一个初步的基因生物信息分析研究,鉴于机体以及矽肺病理的复杂性,其潜在分子机制以及在矽肺治疗中的预后影响需结合分子实验和临床研究进行进一步的验证。

综上所述,本研究通过构建小鼠矽肺模型进行 scRNA-seq 和空间转录组测序,一共获得了 97 个巨噬 细胞的 DEGs 以及主要富集的生物学过程和信号通路, 同时获得了 3 个巨噬细胞 Hub 基因 Ccl2、Ccl7、Ptgs2 和 2 个潜在的诊断标志物 CCL7、PTGS2。

参考文献

- [1] ZHOU Z, JIANG R, YANG X, et al. circRNA mediates silica-induced macrophage activation via HECTD1/ZC3H12A-dependent ubiquitination [J]. Theranostics, 2018, 8(2): 575-592.
- [2]国家卫生健康委员会规划发展与信息化司.国家卫生健康委发布2020 年全国职业病报告[J].职业卫生与应急救援,2021,39(4):381.
 Department of Planning, Development and Informatization, National Health Commission. National Health Commission releases national occupational disease report for 2020[J]. Occup Health & Emerg Rescue, 2021, 39(4):381.
- [3] TAN S, CHEN S. Macrophage autophagy and silicosis: current perspective and latest insights [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(1): 453.
- [4] CHEN S, YUAN J, YAO S, et al. Lipopolysaccharides may aggravate apoptosis through accumulation of autophagosomes in alveolar macrophages of human silicosis [J]. Autophagy, 2015, 11(12): 2346-2357.
- [5] ZHAO H, WANG Y, QIU T, et al. Autophagy, an important therapeutic target for pulmonary fibrosis diseases [J]. Clin Chim Acta, 2020, 502: 139-147.
- [6] BYRNE AJ, MAHER TM, LLOYD CM. Pulmonary macrophages: a new therapeutic pathway in Fibrosing lung disease?[J]. Trends Mol Med, 2016, 22(4): 303-316.
- [7] CHU H, WANG W, LUO W, et al. CircHECTD1 mediates pulmonary fibroblast activation via HECTD1[J]. Ther Adv Chronic Dis, 2019, 10: 20406223-19891558.
- [8] LI S, LI C, ZHANG Y, et al. Targeting mechanics-induced fibroblast activation through CD44-RhoA-YAP pathway ameliorates crystalline silica-induced silicosis [J]. Theranostics, 2019, 9(17): 4993-5008.
- [9] QI Y, ZHANG H, FAN H, et al. PPARγ/LXRα axis mediated phenotypic plasticity of lung fibroblasts in silica-induced experimental silicosis [J]. Environ Pollut, 2022, 292: 118272.
- [10] LIU X, QIN X, QIN H, et al. Characterization of the heterogeneity of endothelial cells in bleomycin-induced lung fibrosis using single-cell RNA sequencing[J]. Angiogenesis, 2021, 24(4): 809-821.

[11] ARAN D, LOONEY A P, LIU L, et al. Reference-based analysis of lung single-

cell sequencing reveals a transitional profibrotic macrophage [J]. Nat Immunol, 2019, 20(2): 163-172.

- [12] KIM N, KIM H K, LEE K, et al. Single-cell RNA sequencing demonstrates the molecular and cellular reprogramming of metastatic lung adenocarcinoma [J]. Nat Commun, 2020, 11(1): 2285.
- [13] BACCIN C, AL-SABAH J, VELTEN L, et al. Combined single-cell and spatial transcriptomics reveal the molecular, cellular and spatial bone marrow niche organization [J]. Nat Cell Biol, 2020, 22(1): 38-48.
- [14] MONCADA R, BARKLEY D, WAGNER F, et al. Integrating microarray-based spatial transcriptomics and single-cell RNA-seq reveals tissue architecture in pancreatic ductal adenocarcinomas[J]. Nat Biotechnol, 2020, 38(3): 333-342.
- [15] SLEIJFER S, BOGAERTS J, SIU L L. Designing transformative clinical trials in the cancer genome era [J]. J Clin Oncol, 2013, 31(15): 1834-1841.
- [16] LIU H, CHENG Y, YANG J, et al. BBC3 in macrophages promoted pulmonary fibrosis development through inducing autophagy during silicosis [J]. Cell Death Dis, 2017, 8(3): e2657.
- [17] SHI X, WANG J, ZHANG X, et al. GREM1/PPP2R3A expression in heterogeneous fibroblasts initiates pulmonary fibrosis [J]. Cell Biosci, 2022, 12(1): 123.
- [18] PANG J, QI X, LUO Y, et al. Multi-omics study of silicosis reveals the potential therapeutic targets PGD₂ and TXA₂[J]. Theranostics, 2021, 11(5): 2381-2394.
- \cite{black} [19] MACK M. Inflammation and fibrosis [J] . Matrix Biol, 2018, 68-69: 106-121.
- [20] GALLIOT B, CRESCENZI M, JACINTO A, et al. Trends in tissue repair and regeneration [J]. Development, 2017, 144(3): 357-364.
- [21] ARORA S, DEV K, AGARWAL B, et al. Macrophages: their role, activation and polarization in pulmonary diseases[J]. Immunobiology, 2018, 223(4–5): 383-396.
- [22] PRABHU S D, FRANGOGIANNIS N G. The biological basis for cardiac repair after myocardial infarction: from inflammation to fibrosis[J]. Circ Res, 2016, 119(1): 91-112.
- [23] LANGLEY RJ, MISHRA NC, PEÑA-PHILIPPIDES JC, et al. Fibrogenic and redox-related but not proinflammatory genes are upregulated in Lewis rat model of chronic silicosis[J]. J Toxicol Environ Health A, 2011, 74(19):

1261-1279.

- [24] HE C, CARTER A B. C(C)learing the role of chemokines in pulmonary fibrosis [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2020, 62(5): 546-547. [24] MILGER K, YU Y, BRUDY E, et al. Pulmonary CCR2⁺CD4⁺ T cells are immune regulatory and attenuate lung fibrosis development[J]. Thorax, 2017, 72(11): 1007-1020.
- [25] WANG Y, WEI Y, HE N, et al. Evaluation of cyclooxygenase-2 fluctuation via a near-infrared fluorescent probe in idiopathic pulmonary fibrosis cell and mice models [J]. J Mater Chem B, 2021, 9(31): 6226-6233.
- [26] FEITOZA C Q, GONÇALVES G M, SEMEDO P, et al. Inhibition of COX 1 and 2 prior to renal ischemia/reperfusion injury decreases the development of fibrosis [J]. Mol Med, 2008, 14(11/12): 724-730.
- [27] KIM S M, PARK K C, KIM H G, et al. Effect of selective cyclooxygenase-2 inhibitor meloxicam on liver fibrosis in rats with ligated common bile ducts [J]. Hepatol Res, 2008, 38(8): 800-809.
- [28] REDING T, BIMMLER D, PERREN A, et al. A selective COX-2 inhibitor suppresses chronic pancreatitis in an animal model (WBN/Kob rats): significant reduction of macrophage infiltration and fibrosis[J]. Gut, 2006, 55(8): 1165-1173.
- [29] FORD J, HUGHSON A, LIM K, et al. CCL7 is a negative regulator of cutaneous inflammation following *Leishmania major* infection [J]. Front Immunol, 2019, 9: 3063.
- [30] QI D, WEI M, JIAO S, et al. Hypoxia inducible factor 1α in vascular smooth muscle cells promotes angiotensin II-induced vascular remodeling via activation of CCL7-mediated macrophage recruitment[J]. Cell Death Dis, 2019, 10(8): 544.
- [31] YANG Y, SHEN C, LI J, et al. Plasma IP-10 and MCP-3 levels are highly associated with disease severity and predict the progression of COVID-19[J]. J Allergy Clin Immunol, 2020, 146(1): 119-127.e4.
- [32] MCELVANEY OJ, MCEVOY NL, MCELVANEY OF, et al. Characterization of the inflammatory response to severe COVID-19 illness [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2020, 202(6): 812-821.
- [33] KALAFATIS D, LÖFDAHL A, NÄSMAN P, et al. Distal lung microenvironment triggers release of mediators recognized as potential systemic biomarkers for idiopathic pulmonary fibrosis [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(24): 13421.

(英文编辑:汪源; 责任编辑:汪源)