

来氟米特调控 HIF-1 α 信号通路 对类风湿关节炎滑膜细胞自噬的影响

兰维娅¹, 马武开², 姚血明², 蒋 总¹, 熊 浪¹, 杨淑芬², 唐 芳²

(¹ 贵州中医药大学第二临床医学院, 贵阳 550025;

² 贵州中医药大学第二附属医院风湿免疫科, 贵阳 550001)

摘要 目的 探讨来氟米特(LEF)调控低氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)信号通路,对类风湿关节炎(RA)滑膜细胞相关自噬基因表达的影响。方法 取3代RA滑膜细胞,分为空白对照组、LEF组、雷公藤多苷组,空白对照组加入等体积DMEM培养液,药物组分别加入LEF(浓度0.2 mg/ml)、雷公藤多苷(浓度0.03 mg/ml),干预48 h后,采用流式细胞术检测滑膜细胞增殖及凋亡;酶联免疫吸附法(ELISA)检测白细胞介素(IL)-1 β 、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、血管生成素样蛋白(ANGPTL-4)、血管内皮生长因子(VEGF)的表达,qRT-PCR检测HIF-1 α mRNA表达;Western blot检测HIF-1 α 、Beclin-1、BCL2相互作用蛋白3样(BNIP3)蛋白表达。结果 与雷公藤多苷组比较,LEF组滑膜细胞上清液IL-1 α 、TNF- α 、ANGPTL-4、VEGF的表达降低;与空白对照组比较,LEF组、雷公藤多苷组的滑膜细胞HIF-1 α mRNA表达均降低,LEF组作用最明显;与空白对照组比较,LEF组、雷公藤多苷组的滑膜细胞HIF-1 α 、Beclin-1、BNIP3蛋白表达均降低,LEF组作用最明显。结论 LEF能抑制RA滑膜细胞炎症因子表达,抑制HIF-1 α 信号通路,并抑制自噬相关基因Beclin-1、BNIP3的表达,改善滑膜炎的病理状态。

关键词 类风湿关节炎;来氟米特;HIF-1 α 信号通路;自噬;滑膜炎

中图分类号 R 45

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2024)10-1823-06

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.10.018

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)属于全身免疫性疾病,其病理改变为滑膜炎、血管翳^[1]。在中国,RA患者病程分别为5~10年致残率43.5%,10~15年致残率48.1%, ≥ 15 年致残率61.3%^[2],给患者个人和家庭甚至是社会都带来了巨大的经济负担^[3]。RA发病机制目前仍不明确。根据文献报道^[4-5],低氧诱导因子-1 α (hypoxia-inducible factor-1 α , HIF-1 α)在RA患者关节滑膜细胞中呈高表达,并通过细胞自噬继而调节滑膜炎、细胞侵袭及增殖等过程。低氧是自噬蛋白Beclin-1高表达的主要因素,HIF-1 α 可以直接靶向调控Beclin-1的表达^[6]。在低氧状态下,HIF-1 α 活化,进而调控BCL2相互作用蛋白3样(BCL2 interacting protein 3 like, BNIP3),引起Beclin-1解离,游离的Be-

clin-1被UNC-51样激酶1(UNC-51-like kinase 1, ULK)磷酸化,通过激活的自噬成核结构(称为隔离膜)表面的液泡蛋白分选34(vacuolar protein sorting 34, VPS34)生成磷脂酰肌醇3-磷酸(phosphatidylinositol 3-phosphate, PI3P)^[7]。据此可推断:RA滑膜细胞低氧可能是通过HIF-1 α 信号通路诱导自噬缓解滑膜炎的可能机制。

大量文献^[8-9]研究表明LEF对RA的治疗有良好的疗效。课题组前期研究表明RA患者滑膜细胞中自噬基因Beclin-1、微管相关蛋白1A/1B-轻链3(microtubule-associated protein 1 light chain 3, LC3)、抗胸腺细胞球蛋白(anti-thymocyte globulin, Atg)的表达明显升高^[10],因此推测,HIF-1 α 信号及其介导的自噬相关基因是RA关节滑膜炎发生、发展的影响因素。因此,该课题组在前期研究基础上,提出LEF可能通过调控HIF-1 α 介导细胞自噬活性从而抑制RA关节滑膜炎,可能为RA的治疗用药取得突破。

1 材料与方法

1.1 RA滑膜组织来源 RA滑膜取自贵州中医药大学第二附属医院风湿免疫科行膝关节镜治疗的RA患者。纳入标准:符合1987年美国风湿病

2024-07-17 接收

基金项目:贵州省科技计划项目(编号:黔科合平台人才[2020]2202号、黔科合基础-ZK[2023]一般435);贵州中医药大学国家与省级科技创新人才团队培育项目(编号:贵中医TD合字[2022]004号);贵州中医药大学研究生教育创新计划项目(编号:YCXKYB2023006)

作者简介:兰维娅,女,主治医师;

唐 芳,女,教授,主任医师,博士生导师,通信作者, E-mail:64550932@qq.com

学会(American college of rheumatology, ACR)分类标准或2010年ACR/欧洲抗风湿病联盟(the European league against rheumatism, EULAR)分类标准,年龄18~65岁,同意签署知情同意书。排除标准:伴有严重感染性疾病(如结核)、肿瘤(如淋巴瘤、骨肉瘤等)或RA以外的风湿病(如系统性红斑狼疮及严重的骨关节炎等),术前2个月未使用抗风湿药治疗者。术中取得新鲜滑膜组织,立即放入含DMEM完全培养基,带到无菌室超净工作台操作。

1.2 药物与试剂 LEF片(规格:30片/瓶,厦门市力品药业厦门股份有限公司,批号:220101)。雷公藤多苷片(规格:100片/瓶,贵州省汉方制药有限公司,批号:1459001)。白细胞介素(interleukin, IL)-1 ELISA试剂盒、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor, TNF- α) ELISA试剂盒均购自武汉华美生物工程有限公司,血管生成素样蛋白-4(angiotensin-like protein-4, ANGPTL-4) ELISA试剂盒、生长因子 ELISA试剂盒均购自上海生工生物工程股份有限公司, TIANScript^{RT} KIT 购自北京天根生物科技有限公司,荧光定量PCR试剂盒购自苏州莫纳生物公司, RIPA裂解液购自北京索来宝公司, ECL发光试剂盒购自北京中杉金桥公司, ANNEXIN V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒(货号:AP101)购自杭州联科生物公司。

1.3 细胞培养与分组 在无菌条件下,分离RA滑膜组织,清洗,剪块,胰酶消化,离心,弃上清液,将细胞悬于10%的胎牛血清,置于37℃, 5% CO₂ 条件下培养24 h后,更换培养液,传代,到第3~5代,经Vimentin免疫细胞化学染色鉴定阳性(胞质大量棕黄色颗粒),流式细胞术检测CD55⁺阳性率达到98%,视为合格的细胞用于实验。将培养的滑膜细胞随机分为3组,具体为:正常对照组、LEF组、雷公藤多苷组。

1.4 指标检测方法

1.4.1 流式细胞术检测药物对滑膜细胞的影响 取3~5代RA滑膜细胞离心后,接种至96孔板,空白对照组加入等体积培养液, LEF组、雷公藤多苷分别加入0.2 mg/ml LEF、0.03 mg/ml 雷公藤多苷干预48 h后,使用流式细胞仪检测细胞周期及凋亡情况。

1.4.2 ELISA法检测滑膜细胞上清液IL-1 α 、TNF- α 、ANGPTL-4、VEGF的表达 按照ELISA试剂盒说明书进行操作,加入标准品和待测样品,设置阴性对照,温育,洗板,加酶,反应,显色,读吸光度(optical density, OD)值,在标准曲线查出相应的IL-1 α 、TNF-

α 、ANGPTL-4、VEGF的浓度。

1.4.3 qRT-PCR法检测RA滑膜细胞HIF-1 α mRNA表达 提取RA滑膜细胞总RNA,酶标仪检测RNA纯度、浓度及完整性。进行逆转录和扩增。用凝胶成像系统测定目的基因及内参标准灰度值。HIF-1 α 上游引物5'-GAACGTCGAAAAGAAAAGTC-TCG-3',下游引物5'-CCTTATCAAGATGCCAACTCA-CA-3',引物长度124 bp。 β -actin上游引物5'-CAT-GTACGTTGCTATCCAGGC-3',下游引物5'-CTCCT-TAATGTCACGCACGAT-3',引物长度250 bp。

1.4.4 Western blot法检测滑膜细胞HIF-1 α 、Beclin-1、BNIP3蛋白表达 将各组RA滑膜细胞低温匀浆后加蛋白裂解液,置冰上,离心,取上清液。用Bradford法对上清液进行蛋白定量,跑电泳,封闭一抗、二抗,洗膜,用图像分析测定各带OD值作定量分析。

1.5 统计学处理 采用SPSS 23.0软件分析,每组实验至少重复3次,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,不同组间比较是否存在统计学差异采用 t 检验和方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 流式细胞术检测药物对滑膜细胞凋亡的影响

空白对照组滑膜细胞的凋亡较少,其凋亡率为 $(3.81 \pm 1.58)\%$;与空白对照组比较, LEF组、雷公藤多苷干预滑膜细胞48 h后,其凋亡率均升高,凋亡率分别为 $(8.90 \pm 0.61)\%$ 、 $(5.01 \pm 1.94)\%$,差异有统计学意义($P < 0.01$);与雷公藤多苷组比较, LEF组干预滑膜细胞48 h后细胞凋亡率明显升高,差异有统计学意义($P < 0.01$)。见图1。

2.2 ELISA检测滑膜细胞上清液IL-1 β 、TNF- α 、ANGPTL-4、VEGF的表达水平 与空白对照组比较, LEF组及雷公藤多苷组IL-1 β 、TNF- α 、ANGPTL-4、VEGF表达量均显著升高($P < 0.01$);与雷公藤多苷组比较, LEF组IL-1 β 、TNF- α 、ANGPTL-4、VEGF表达量均降低($P < 0.01$)。见表1。

2.3 LEF对RA滑膜细胞HIF-1 α mRNA表达的影响 与空白对照组比较, LEF组、雷公藤多苷组的滑膜细胞HIF-1 α mRNA表达均降低($P < 0.01$)。与雷公藤多苷组比较, LEF组的滑膜细胞HIF-1 α mRNA表达明显降低($P < 0.01$)。见图2。

2.4 Western blot检测HIF-1 α 、Beclin-1、BNIP3蛋白表达 与空白对照组比较, LEF组、雷公藤多苷组的滑膜细胞HIF-1 α 、Beclin-1、BNIP3蛋白表达均

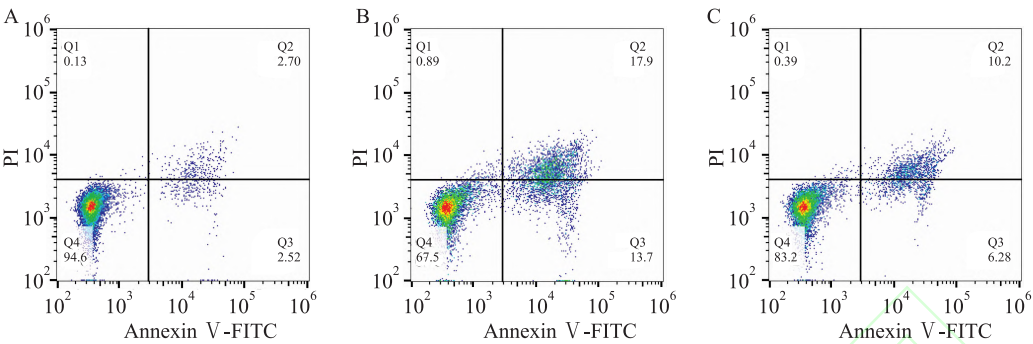


图1 各组作用滑膜细胞 48 h 后凋亡的影响

Fig. 1 Effect of each group on apoptosis of synovial cells after 48 hours

A - C; blank control group, LEF group, tripterygium glycosides group.

表 1 各组滑膜细胞上清液中 IL-1β、TNF-α、ANGPTL-4、VEGF 比较($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Tab. 1 Comparison of IL-1β, TNF-α, ANGPTL-4 and VEGF in synovial cell supernatant of each group($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Group	IL-1β	TNF-α	ANGPTL-4	VEGF
blank control	89.23 ± 23.74	10.92 ± 2.41	267.63 ± 54.36	36.70 ± 11.57
LEF	124.71 ± 74.09 ** #	37.65 ± 4.16 ** #	391.05 ± 40.03 ** #	52.13 ± 25.92 ** #
tripterygium glycosides	359.46 ± 38.85 **	50.38 ± 8.91 **	603.86 ± 21.73 **	89.54 ± 26.83 **

** $P < 0.01$ vs blank control group; # $P < 0.01$ vs tripterygium wilfordii polyglycoside group.

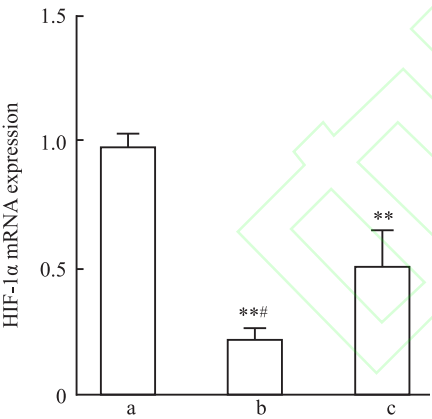


图2 HIF-1α mRNA 表达

Fig. 2 HIF-1α mRNA expression

a: blank control group; b: LEF group; c: tripterygium glycosides group; ** $P < 0.01$ vs blank control group; # $P < 0.05$ vs tripterygium wilfordii polyglycoside group.

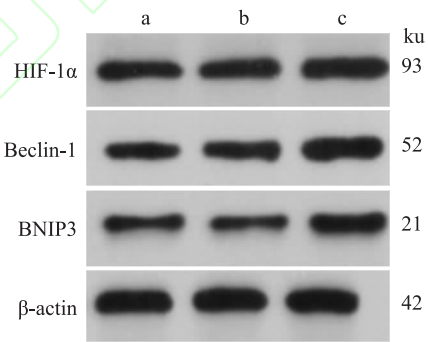


图3 各组滑膜组织中 HIF-1α、Beclin-1、BNIP3 蛋白条带图

Fig. 3 Protein bands of HIF-1α, Beclin-1, and

BNIP3 in synovial tissue of each group

a: blank control group; b: LEF group; c: tripterygium glycosides group.

降低($P < 0.05$)。与雷公藤多苷组比较,LEF 组的滑膜细胞 HIF-1α、Beclin-1、BNIP3 表达明显降低($P < 0.05$)。见图 3、4。

3 讨论

RA 患者关节内存在低氧微环境,这是 RA 的重要特点之一,滑膜组织因高代谢需求和快速增生导致关节内出现低氧状态。Dai et al^[11] 研究表明,体内细胞在低氧环境中会启动一种叫做细胞低氧反应

的生理机制,而其中的核心调节因子是 HIF-1α。在 RA 患者的滑膜组织中,HIF-1α 的表达水平往往较高,这与病变组织中的血管数量和炎症细胞浸润呈正相关。因此,在低氧环境下,HIF-1α 在类风湿关节炎(RA)滑膜细胞中扮演重要角色,既能促进炎症细胞的浸润和炎症因子的产生,又能加剧局部炎症免疫反应。HIF-1α 是低氧条件下调节细胞存活的主要因素,而 BNIP3 则是 HIF-1α 下游的重要调节基因^[12]。低氧环境可以导致细胞自噬的激活,而这一过程主要是通过 HIF-1α 和 BNIP3 实现的。在低氧状态下,活化的 HIF-1α 上调 BNIP3 基因,导致

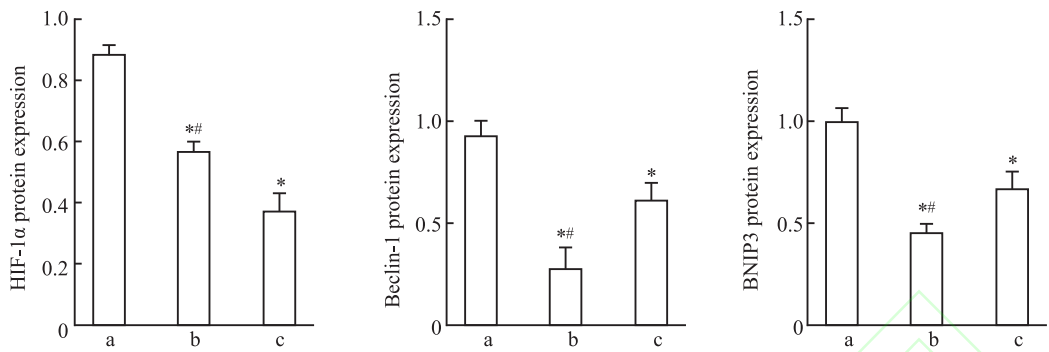


图4 各组滑膜组织中 HIF-1α、Beclin-1、BNIP3 蛋白表达

Fig.4 Protein bands of HIF-1α, Beclin-1, and BNIP3 in synovial tissue of each group

a;blank control group;b;LEF group;c;tripterygium glycosides group; * $P < 0.05$ vs blank control group; # $P < 0.05$ vs tripterygium wilfordii polyglycoside group.

Beclin-1 解离,随后游离的 Beclin-1 可被磷酸化的 ULK 激活,从而启动自噬过程^[7]。同时 HIF-1α 与 VEGF、TNF-α、ANGPTL4、IL-1β 等关系密切。VEGF 作为一种高度特异性的促血管内皮细胞生长因子,是 HIF-1α 关键的下游效应分子^[13],具有促炎、抗凋亡等作用。研究^[14]表明,在 RA 患者的血清、滑膜组织中存在能够检测到 VEGF 的存在,Qian et al^[15]通过抑制 VEGF 信号通路,CIA 小鼠滑膜组织内增生的滑膜和血管翳能够显著被抑制。ANGPTL4 是与血管生成素有相似结构的分泌性蛋白,在 RA 活动期水平明显上升,该指标参与滑膜炎和血管翳的病理过程,可作为判断疾病活动与骨侵蚀的新指标^[16]。

LEF 是第一个专门针对 RA 的改善病程药,能够有效地控制疾病的进展,在临床应用广泛。LEF 口服吸收后通过转化为活性代谢物 A771726 发挥药理作用,通过抑制二氢乳清酸脱氢酶的活性,阻断嘧啶从头合成。正常的淋巴细胞可以通过细胞外嘧啶合成嘧啶核苷酸,维持正常的生理功能。而活跃的淋巴细胞因其分裂增殖的需要,对嘧啶的需求量是正常细胞的 8~16 倍。因此,它们主要依赖从头合成途径来满足这一需求,而 LEF 的作用主要针对这类活跃的淋巴细胞。该研究结果显示,LEF 组抑制 HIF-1α 表达,减少下游炎症因子 IL-1β、TNF-α、ANGPTL4、VEGF 的表达 ($P < 0.01$),使 HIF-1α、Beclin-1、BNIP3 蛋白表达均显著降低 ($P < 0.05$),说明 LEF 抑制 RA 滑膜细胞增生的机制可能与其作用于 HIF-1α 信号通路上相关基因有关。

综上所述,该研究表明,LEF 能够通过调节 HIF-1α 信号通路,抑制多种炎症因子 IL-1β、TNF-α、ANGPTL4、VEGF 的表达,同时下调通路上 HIF-

1α、Beclin-1、BNIP3 的表达水平,最终达到抑制滑膜细胞增殖、缓解滑膜炎炎症目的。

参考文献

- [1] Ford J A, Solomon D H. Challenges in implementing treat-to-target strategies in rheumatology [J]. Rheum Dis Clin North Am, 2019, 45(1): 101–12. doi:10.1016/j.rdc.2018.09.007.
- [2] 田新平,李梦涛,曾小峰.我国类风湿关节炎诊治现状与挑战:来自中国类风湿关节炎2019年年度报告[J].中华内科杂志,2021,60(7):593–8. doi:10.3760/cma.j.cn112138-20210207-00113.
- [2] Tian X P, Li M T, Zeng X F. The challenges and opportunities for the management of rheumatoid arthritis in China: an annual report of 2019 [J]. Chin J Intern Med, 2021, 60(7): 593–8. doi:10.3760/cma.j.cn112138-20210207-00113.
- [3] Fan T, Zhang C, Zong M, et al. Hypoxia-induced autophagy is inhibited by PADI4 knockdown, which promotes apoptosis of fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis [J]. Mol Med Rep, 2018, 17(4): 5116–24. doi:10.3892/mmr.2018.8501.
- [4] Xu J, Feng Z, Chen S, et al. Taxol alleviates collagen-induced arthritis in mice by inhibiting the formation of microvessels [J]. Clin Rheumatol, 2019, 38(1): 19–27. doi:10.1007/s10067-017-3646-1.
- [5] Li Y, Liu Y, Wang C, et al. Succinate induces synovial angiogenesis in rheumatoid arthritis through metabolic remodeling and HIF-1α/VEGF axis [J]. Free Radic Biol Med, 2018, 126: 1–14. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2018.07.009.
- [6] Abdul Rahim S A, Dirkse A, Oudin A, et al. Regulation of hypoxia-induced autophagy in glioblastoma involves ATG9A [J]. Br J Cancer, 2017, 117(6): 813–25. doi:10.1038/bjc.2017.263.
- [7] Sahni S, Merlot A M, Krishan S, et al. Gene of the month: BECN1 [J]. J Clin Pathol, 2014, 67(8): 656–60. doi:10.1136/jclinpath-2014-202356.
- [8] 林永鸿.来氟米特联合甲氨蝶呤治疗类风湿性关节炎的疗效及对关节功能分级的影响探讨[J].中国现代药物应用,2023,17(2):11–5. doi:10.14164/j.cnki.cn11-5581/r.2023.02.003.

- [8] Lin Y H. Efficacy of leflunomide combined with methotrexate in the treatment of rheumatoid arthritis and its influence on the classification of joint function[J]. Chin J Mod Drug Appl, 2023, 17(2): 11–5. doi:10.14164/j.cnki.cn11–5581/r.2023.02.003.
- [9] 张欣亚, 王碧莹, 贾福康, 等. 来氟米特干预类风湿关节炎大鼠代谢组学研究[J]. 药学与临床研究, 2023, 31(3): 193–200. doi:10.13664/j.cnki.pcr.2023.03.017.
- [9] Zhang X Y, Wang B Y, Jia F K, et al. Protective mechanism of leflunomide in rheumatoid arthritis rats based on serum metabolomic[J]. Pharm Clin Res, 2023, 31(3): 193–200. doi:10.13664/j.cnki.pcr.2023.03.017.
- [10] 马武开, 曾晨, 徐晖, 等. 苗药金乌健骨方对类风湿关节炎滑膜细胞自噬的调控作用研究[J]. 中药材, 2019, 42(4): 891–6. doi:10.13863/j.issn1001–4454.2019.04.039.
- [10] Ma W K, Zeng C, Xu H, et al. The effect of Miao medicine Jinwu jiangou decoction on the autophagy regulation of synovial cells in rheumatoid arthritis[J]. J Chin Med Mater, 2019, 42(4): 891–6. doi:10.13863/j.issn1001–4454.2019.04.039.
- [11] Dai Y, Ding J, Yin W, et al. Increased autophagy enhances the resistance to tumor necrosis factor- α treatment in rheumatoid arthritis human fibroblast-like synovial cell[J]. Biomed Res Int, 2018, 2018: 4941027. doi:10.1155/2018/4941027.
- [12] Cherwinski H M, Byars N, Ballaron S J, et al. Leflunomide interferes with pyrimidine nucleotide biosynthesis[J]. Inflamm Res, 1995, 44(8): 317–22. doi:10.1007/BF01796261.
- [13] Hu F, Mu R, Zhu J, et al. Hypoxia and hypoxia-inducible factor-1 α provoke toll-like receptor signalling-induced inflammation in rheumatoid arthritis[J]. Ann Rheum Dis, 2014, 73(5): 928–36. doi:10.1136/annrheumdis-2012–202444.
- [14] 朱悦, 张玲玲, 魏伟. 内皮细胞活化参与类风湿血管炎病理机制研究进展[J]. 安徽医科大学学报, 2020, 55(7): 1147–50. doi:10.19405/j.cnki.issn1000–1492.2020.07.033.
- [14] Zhu Y, Zhang L L, Wei W. Research progress of endothelial cell activation participating in pathological mechanism of rheumatoid vasculitis[J]. Acta Univ Med Anhui, 2020, 55(7): 1147–50. doi:10.19405/j.cnki.issn1000–1492.2020.07.033.
- [15] Qian K, Zheng X X, Wang C, et al. β -sitosterol inhibits rheumatoid synovial angiogenesis through suppressing VEGF signaling pathway[J]. Front Pharmacol, 2022, 12: 816477. doi:10.3389/fphar.2021.816477.
- [16] 袁红丽, 王娟, 汪秀梅, 等. 类风湿关节炎患者血清及关节液血管生成素样蛋白4、白细胞介素-17、核因子 κ B受体活化因子配体的临床意义[J]. 实用临床医药杂志, 2022, 26(17): 57–62.
- [16] Yuan H L, Wang X, Wang X M, et al. Clinical significance of angiogenin protein 4, interleukin-17 and nuclear factor- κ B ligand in serum and articular fluid of patients with rheumatoid arthritis[J]. J Clin Med Pract, 2022, 26(17): 57–62.

Effect of leflunomide regulating HIF-1 α signal pathway on autophagy of synoviocytes in rheumatoid arthritis

Lan Weiya¹, Ma Wukai², Yao Xueming², Jiang Zong¹, Xiong Lang¹, Yang Shufen², Tang Fang²

(¹The Second Clinical College of Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025;

²Dept of Rheumatology and Immunology, The Second Affiliated Hospital of Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550001)

Abstract Objective To investigate the effect of leflunomide (LEF) on the expression of associated autophagy genes in synoviocytes of rheumatoid arthritis (RA) by regulating HIF-1 α signal pathway. **Methods** Three generations of RA synovial cells were divided into blank control group, LEF group and Tripterygium wilfordii polyglycosides group. The blank control group was added with the same volume of DMEM culture medium. The drug group was treated with LEF (concentration 0.2 mg/ml) and Tripterygium wilfordii polyglycosides (concentration 0.03 mg/ml), the proliferation and apoptosis of synovial cells were detected by flow cytometry, the expression of IL-1 β , TNF- α , ANGPTL-4 and VEGF was detected by ELISA, the expression of HIF-1 α mRNA was detected by qRT-PCR, and the expression of HIF-1 α , Beclin-1 and BNIP3 protein was detected by Western blot. **Results** Compared with Tripterygium wilfordii polyglycosides group, the expression of IL-1 α , TNF- α , ANGPTL-4 and VEGF in synovial supernatant of LEF group decreased; compared with the blank control group, the expression of HIF-1 α mRNA in synovial cells of LEF group and Tripterygium wilfordii polyglycosides group decreased, and the effect of LEF group was the most obvious; compared with the blank control group, the protein expressions of HIF-1 α , Beclin-1 and BNIP3 in synovial cells of LEF group and Tripterygium wilfordii polyglycosides group decreased, and the effect of LEF group was the most obvious. **Conclusion** LEF can inhibit the expression of inflammatory factors in RA synovial cells, inhibit HIF-1 α signaling pathway, inhibit the expression of autophagy-related genes Beclin-1

◇ 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¹, 何海兰^{1,2}, 王 袁³, 郝小惠^{1,2}, 王宏丽^{1,2}, 刘和亮^{1,2,4}⁽¹⁾ 华北理工大学公共卫生学院, 唐山 063210; ⁽²⁾ 河北省器官纤维化重点实验室, 唐山 063210;⁽³⁾ 华北理工大学附属医院, 唐山 063000; ⁽⁴⁾ 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, 将其与线粒体基因组 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 (MFN1)、视神经萎缩蛋白-1 (OPA1)、动力蛋白相关蛋白-1 (DRP1) 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 ($P < 0.05$), DRP1 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^[1]。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^[2]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 α 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. YCXYB2023006)

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