

基于 RNA-seq 筛选高耐药且高毒力金黄色葡萄球菌肺部感染过程中的自噬相关基因

查锦宏^{1,2}, 匡琪^{1,2}, 吴承禧², 朱小雨², 苏铎², 张丽丽², 吕蒙², 胡凌飞², 周冬生², 杨文慧^{1,2}

(¹ 安徽医科大学基础医学院, 合肥 230032; ² 军事科学院军事医学研究院, 北京 100071)

摘要 目的 筛选高耐药且高毒力耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 USA300(USA300) 肺部感染过程中的自噬相关基因, 探讨其分子机制, 为免疫治疗靶点提供思路。方法 从 GEO 数据库获取 USA300 肺部感染小鼠模型数据集 GSE220943, 采用 DESeq2 筛选差异表达基因(DEGs), 结合 MSigDB 和 Autophagy 数据库获取自噬相关基因(ARGs), 通过加权基因共表达网络分析(WGCNA)构建共表达模块, 取与 DEGs 和 ARGs 的交集获得自噬相关基因。利用 clusterProfiler R 包进行基因本体(GO)富集分析, Metascape 网站进行京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析, ImmCellAI-mouse 网站分析免疫浸润, String 数据库构建蛋白-蛋白互作用(PPI)网络, Cytoscape 软件拓扑分析筛选关键基因, 并通过网站(<https://www.bioinformatics.com.cn>)绘制受试者工作特征曲线(ROC)曲线。最终通过实时荧光定量逆转录聚合酶链式反应(RT-qPCR)在小鼠肺组织中验证关键基因表达。结果 在感染后 12、24、48、96 h 分别筛选出 6 135、4 075、3 680 和 2 342 个 DEGs, 结合 WGCNA 和 ARGs 共筛选出 19 个自噬相关基因。GO 和 KEGG 分析显示, 这些基因参与 CD4⁺ T 细胞激活调控、先天免疫反应、自噬小体膜等过程。免疫浸润分析发现, 感染初期以中性粒细胞、树突细胞等先天免疫细胞为主, 后期转向 $\gamma\delta$ T 细胞、M2 型巨噬细胞等细胞类型。PPI 网络筛出 12 个核心自噬基因, 进一步确定 3 个上调关键基因(*Eif2ak2*、*Ikbke*、*Nfkbiz*), 其 ROC 曲线下面积均为 1.000。RT-qPCR 验证显示, 3 个基因在感染 24 h 肺组织中表达升高(均 $P < 0.05$)。结论 *Eif2ak2*、*Ikbke* 和 *Nfkbiz* 可能通过促进自噬参与 USA300 肺部感染过程, 有望成为潜在免疫治疗靶点。

关键词 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌; 小鼠; 肺炎; 自噬; 关键基因; 免疫浸润; 生物信息学

中图分类号 R 378.1

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2025)09-1689-08

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2025.09.016

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*, SA)是蔓延全球的重要病原菌。2019 年, SA 在全球导致约 110 万人死亡, 致死率居 33 种重要病原菌之首, 其中下呼吸道感染死亡人数超过三分之一^[1]。耐甲氧西林 SA(methicillin-resistant SA, MRSA), 兼具高毒力和高耐药特性, 特别是其 USA300 菌株(以下简称 USA300), 因具备多种毒力因子且对万古霉素等大部分抗生素耐药, 其导致的严重社区获得性肺炎致死率高^[2], 且尚无商品化疫苗^[3]。这为临床治疗带来了极大挑战, 因此迫切需要探索新的 USA300 肺部感染免疫治疗靶点。

自噬是一个参与维持细胞稳态、调控代谢及先天免疫的过程^[4], 其在宿主与微生物的相互作用中发挥着重要作用^[5]。研究^[6]表明, USA300 菌株在

自噬缺陷的 Atg16L1^{HM} 小鼠的血液和肺部感染模型中表现出更高的致死率, 这提示靶向宿主自噬系统可能是 USA300 肺部感染有效的治疗策略。然而, USA300 肺部感染过程中自噬的分子机制尚不明确。该研究计划通过生物信息学方法, 对 USA300 肺部感染小鼠模型与自噬进行交叉分析, 筛选 USA300 肺部感染过程中的自噬相关基因, 以探讨 USA300 肺部感染过程中自噬的分子机制, 为确定新的免疫治疗靶点提供思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细菌菌株 ATCC BAA-1556 菌株属于 MR-SA USA300 克隆, 耐多种抗生素, 包括甲氧西林和四环素, 现由本实验室保存。

1.1.2 实验动物 C57BL/6J 雌性小鼠 10 只, 6~8 周龄、体质量 18~22 g, 无特定病原体(SPF)级, 购自斯贝福(北京)生物技术有限公司, 实验动物生产许可证号: SCXK(京)2024-0001。实验动物饲养于军事科学院军事医学研究院实验动物中心 SPF 级

2025-06-18 接收

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 82470017); 石家庄市科学技术研究与发展计划项目(编号: 211200553)

作者简介: 查锦宏, 男, 硕士研究生;

杨文慧, 女, 博士, 副研究员, 硕士生导师, 通信作者, E-mail: fionyoung@163.com

环境设施,在温度(22±2)℃、湿度55%±10%的环境中,维持12 h光照/12 h黑暗的昼夜节律,给予高压灭菌的标准实验动物饲料和饮用水,自由摄取。所有动物在实验前进行至少7 d的适应性饲养。实验中所使用动物数量、性别、年龄和体质量均符合动物伦理和实验设计要求。所有实验均已通过军事医学研究院微生物流行病学研究所实验动物福利伦理委员会审查,伦理审批号为:IACUC-IME-2022-031。

1.1.3 主要试剂和仪器 脑心浸润液培养基(美国BD公司,货号:237500);PBS缓冲液(美国Gibco公司,货号:C20012500BT);引物由北京天一辉远公司合成,引物序列见表1;RNA快速提取试剂盒(上海奕杉生物科技有限公司,货号:RN001);实时荧光定量逆转录聚合酶链反应(real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR)试剂盒(南京诺唯赞生物科技股份有限公司,货号:Q221);细菌振荡培养箱(上海精宏实验设备有限公司,型号:HZQ-F160);小鼠动物喉镜及手持式气管插入液体气溶胶肺递送装置(北京慧荣和科技有限公司,型号:MKC22524);QuantStudio 3实时荧光定量PCR仪(美国Thermo Fisher Scientific公司,型号:A28567)。

表1 引物序列汇总

Tab.1 Summary of primer sequences

Primer name	Sequence(5'-3')	Length (bp)
Eij2ak2	F: ATGCACGGAGTAGCCATTACG	21
	R: TGACAATCCACCTTGTTCGTC	22
Ikbke	F: ACCACTAACTACCTGTGGCAT	21
	R: CCTCCCCGGATTCTTGTTTC	21
Nfkbiz	F: GCTCCGACTCCTCCGATTTTC	20
	R: GAGTTCCTTCACGCGAACACC	20

1.2 方法

1.2.1 USA300肺部感染过程中自噬相关基因的筛选 从基因表达综合数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)中选取RNA-seq数据集GSE220943。该数据集来自USA300菌株(ATCC BAA-1556)肺部感染小鼠模型,该模型通过液体气溶胶肺递送最大非致死剂量(1×10^8 CFU) USA300构建,包含正常小鼠样本(0 h)以及USA300肺部感染12、24、48、96 h后的小鼠样本,每个时间点各4个样本。在该模型中,感染12、24 h为急性炎症阶段。其中,24 h为急性炎症反应的高峰期。感染后48、96 h为炎症恢复阶段。利用DESeq2软件(版本

1.6.3)进行差异表达分析,分别比较感染12、24、48、96 h后各时间点的样本与未感染对照组(0 h)的基因表达差异并选取 $|\text{Log}_2 \text{Ratio}| \geq 1$ 且当Benjamini-Hochberg校正后的 P 值(即FDR调整后 P 值)小于0.05的基因作为差异表达基因(differentially expressed genes, DEGs);从Autophagy数据库(<http://www.tanpaku.org/>)和MSigDB(<https://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/>)数据库获得自噬相关基因(autophagy-related genes, ARGs)。利用在线网站(<https://cloud.oebiotech.com/>)中基因共表达网络分析(weighted gene co-expression network analysis, WGCNA)工具构建加权基因共表达网络并挖掘共表达的基因模块。为综合考虑WGCNA筛选的基因模块、DEGs以及ARGs,利用在线网站(<https://www.omicshare.com/tools/>)中韦恩图工具获取各基因集的共同基因。

1.2.2 自噬相关基因的富集分析 利用clusterProfiler R软件包(版本4.10.0)进行基因本体(gene ontology, GO)富集分析, $P < 0.05$ 且当FDR调整后 P 值小于0.05的条目被认定为DEGs中显著富集的条目。利用网站Metascape(<https://metascape.org/>)进行京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)富集分析。使用R软件(版本4.3.2)进行富集分析结果的可视化。

1.2.3 免疫浸润分析 利用网站ImmuCellAI-mouse(<https://guolab.whscu.cn/ImmuCellAI-mouse/>)来计算样本中免疫细胞相关基因集的富集得分,从而了解免疫细胞在样本中的活性。

1.2.4 自噬相关基因蛋白质相互作用(protein-protein interaction, PPI)网络的构建 利用网站String(<https://string-db.org/>)构建USA300肺部感染过程中自噬相关基因的蛋白质PPI网络。通过Spearman秩相关检验分析存在相互作用的自噬相关基因与免疫细胞浸润丰度之间的相关性。

1.2.5 关键基因的筛选与评价 去除PPI网络中的孤立基因后,利用Cytoscape软件(版本3.10.2)中的NetworkAnalyzer计算拓扑参数,依据“Degree”值选择网络中连接度较高的基因作为关键基因。基于每千碱基转录本每百万映射读段片段数(fragments per kilobase of transcript per million mapped reads, FPKM)评价关键基因的相对表达水平。利用在线网站(<https://www.bioinformatics.com.cn/>)绘制关键基因的受试者工作特征曲线(receiver operat-

ing characteristic curve, ROC), 计算曲线下面积(area under the curve, AUC)。

1.2.6 关键基因的验证 上述菌株经过培养后, 菌液用于后续感染实验, 浓度约为 6×10^8 CFU/mL。所有小鼠被分为两组(0 h 对照组和感染 24 h 后组), 每组 3 只, 对照组小鼠通过气溶胶肺递送给药 50 μ L PBS, 感染组的小鼠通过气溶胶肺递送 50 μ L USA300(1×10^8 CFU) 进行感染, 细菌培养与模型具体方法如文献所述^[7]。选取感染后 24 h 作为验证关键基因的时间点, 该时间点小鼠处于急性炎症反应的高峰期。每只小鼠肺组织的总 RNA 使用 RNA 快速提取试剂盒获得。根据 RT-qPCR 试剂盒说明书进行 RT-qPCR。GAPDH 为内参, 每组 3 个副孔, 每个时间点 3 次生物学重复, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 计算 mRNA 的相对表达水平。

1.2.7 统计学处理 相关性分析采用 Spearman 秩相关检验; 关键基因的表达量以 FPKM 值表示, 采用单因素方差分析比较不同感染时间点之间的差异, 对于 ANOVA 检验结果显著的基因, 进一步进行 Tukey 多重比较检验以分析组间两两差异; RT-qPCR 数据的两组间比较采用两独立样本 *t* 检验。 $P <$

0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 USA300 肺部感染过程中自噬相关基因的筛选的结果 为了筛选 USA300 肺部感染过程中自噬相关基因, 首先评估了数据集 GSE220943 的组内数据重复性。主成分分析(principal component analysis, PCA) 显示数据的重复性良好(图 1A)。差异表达分析结果表明, 在 GSE220943 中, 与正常小鼠(0 h) 相比, 感染 12、24、48、96 h 分别有 6 135、4 075、3 680、2 342 个 DEGs(图 1B)。从 Autophagy 和 MSigDB 数据库中共获得 896 个 ARGs。原始数据共计 34 058 个基因, 过滤表达量变化波动较低(标准偏差 ≤ 0.5) 的基因, 最终剩余 3 915 个基因。WGCNA 分析显示, 动态树切割算法对 3 915 个基因识别出 10 个基因模块(图 1C), 其中灰色模块(Grey) 包含不能归属到任何模块的基因集合, 因此被排除在后续分析之外。其余 9 个基因模块与各时间点的相关性见图 1D。将 WGCNA 所得的与 12、24、48、96 h 正相关的 6 个基因模块所含基因与 DEGs、ARGs 取交集后, 最终筛选出 19 个自噬相关基因(图 1E)。

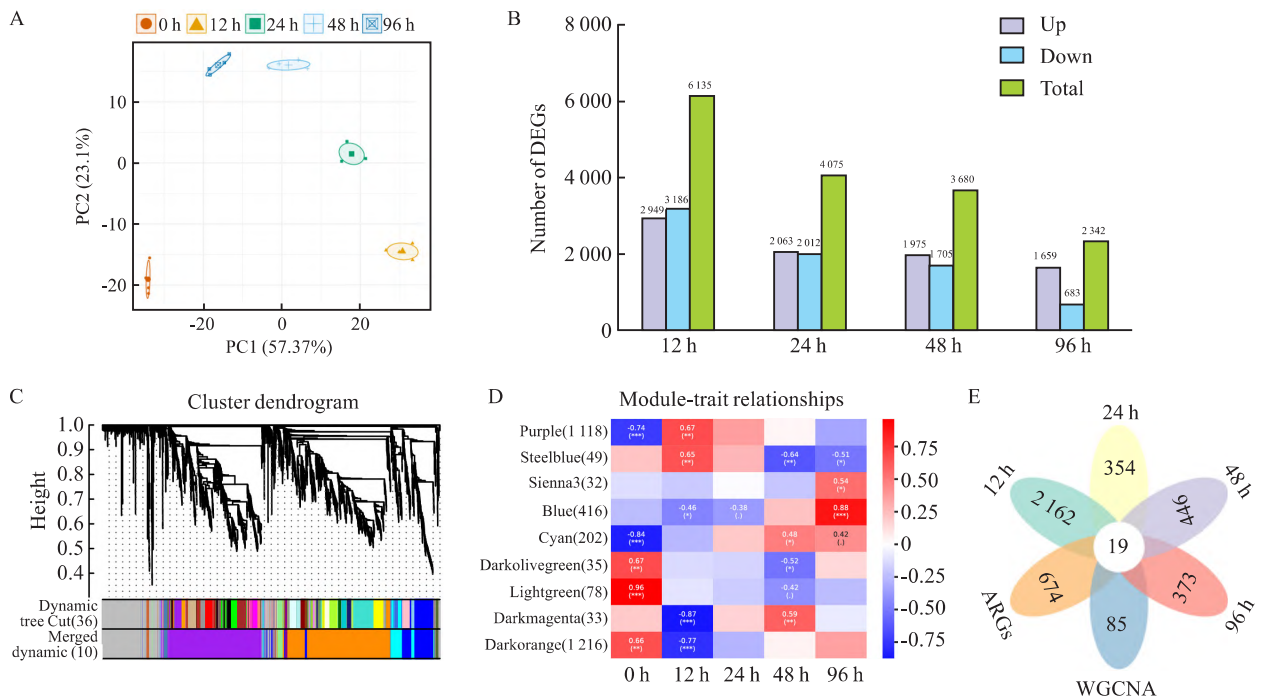


图1 USA300 肺部感染自噬相关基因的筛选

Fig.1 Screening of autophagy-related genes in USA300 lung infection

A: PCA analysis of the GSE220943 dataset; B: Bar plot showed the number of DEGs at different time points after infection compared to 0 h in the GSE220943 dataset; C: Hierarchical clustering tree of genes in the GSE220943 dataset based on the 1-TOM matrix; D: Heatmap showed the correlation between gene modules and sample time points in the GSE220943 dataset; E: Venn diagram showed the overlapping genes among DEGs, ARGs, and WGCNA gene sets.

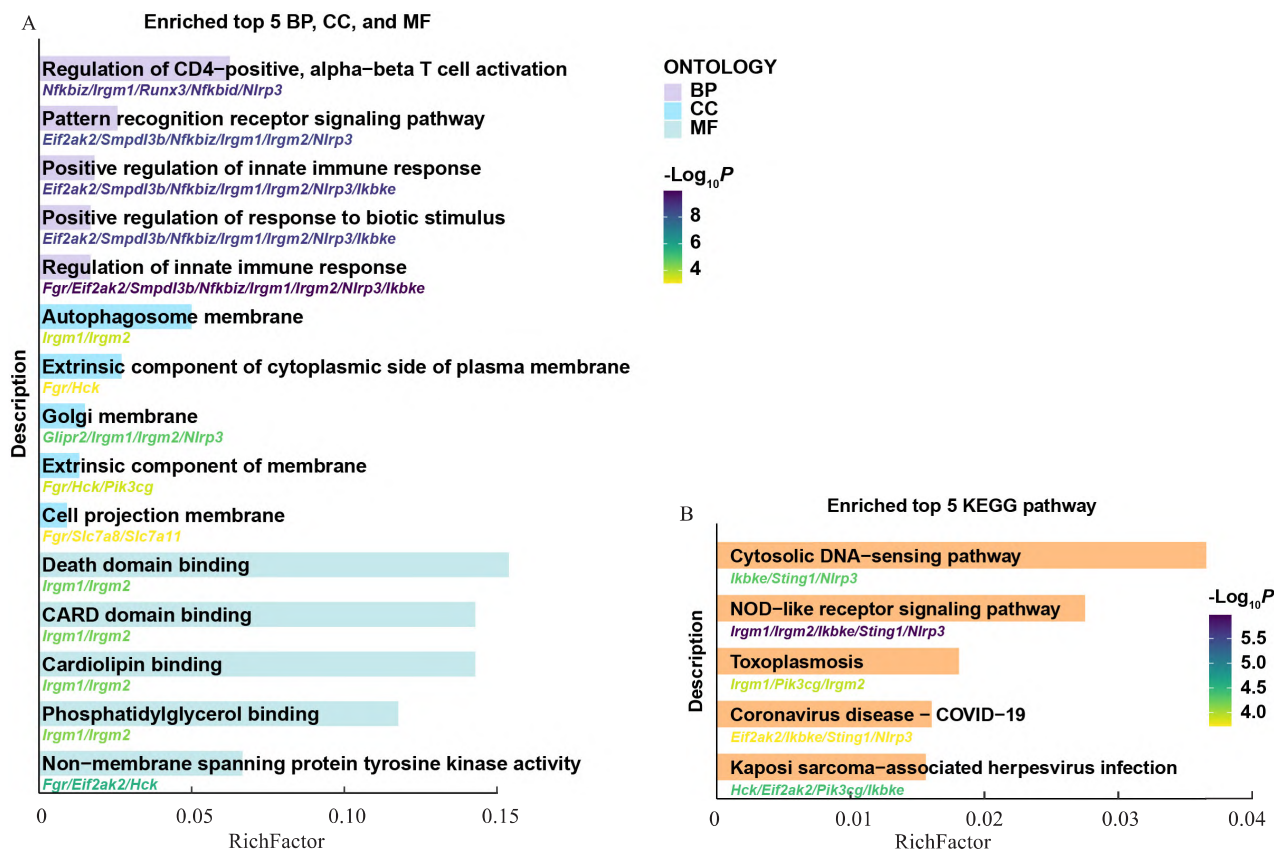


图2 自噬相关基因的GO(A)与KEGG(B)富集分析

Fig.2 GO (A) and KEGG (B) enrichment analysis of autophagy-related genes

2.2 自噬相关基因的富集分析结果 为了探讨筛选出的自噬相关基因在 USA300 肺部感染中的功能,对上述筛选的 19 个基因进行了富集分析。GO 富集分析显示,在生物学过程 (biological process, BP) 方面,基因富集于 CD4⁺ αβ T 细胞激活调控、先天免疫反应正调控等;在细胞组分 (cellular component, CC) 方面,富集于自噬小体膜、质膜胞质侧外在成分等;在分子功能 (molecular function, MF) 方面,富集于死亡结构域结合、CARD 结构域结合等 (图 2A)。KEGG 富集分析则显示,富集的通路包括胞质 DNA 感应通路、NOD 样受体信号通路等 (图 2B)。

2.3 免疫浸润及 PPI 分析结果 为了探究 USA300 感染过程中免疫细胞的浸润情况,使用 ImmuCellAI-mouse 网站估算了免疫细胞在样本中的活性。结果显示,在 0 h 时,适应性免疫相关细胞亚型如记忆 B 细胞 (memory B cell)、CD4⁺ T 细胞 (CD4⁺ T cell) 等为主;感染后 12 h,富集了先天性免疫相关的细胞亚型,如 1 型经典树突状细胞 (conventional dendritic type 1 cell)、单核来源的树突状细胞 (monocyte-derived dendritic cell)、2 型经典树突状细胞

(conventional dendritic type 2 cell)、自然杀伤 T 细胞 (natural killer T cell)、中性粒细胞 (neutrophil) 和生发中心 B 细胞 (germinal center B cell);感染后 24 h,富集的细胞亚型与 12 h 相似,但 M1 型巨噬细胞 (M1 macrophage) 活性有所增加;感染后 48 h,先天免疫相关细胞的活性下降,而 M2 型巨噬细胞 (M2 macrophage) 活性增加;感染后 96 h,γδ T 细胞 (γδ T cell) 的活性明显上升 (图 3A)。随后,通过 String 网站构建了上述 19 个自噬相关基因的 PPI 网络,结果显示, *Eif2ak2*、*Fgr*、*Hck*、*Ikbke*、*Irgm1*、*Irgm2*、*Nfkbid*、*Nfkbiz*、*Nlrp3*、*Pik3cg*、*Tmem173* 和 *Tnfaip2* 这 12 个基因的编码蛋白之间存在潜在相互作用 (图 3B)。进一步的基因表达与免疫细胞浸润丰度的相关性分析表明,11 个基因与中性粒细胞、I 型经典树突状细胞呈正相关, *Pik3cg* 基因则与 M1、M2 型巨噬细胞以及生发中心 B 细胞 (germinal center B cell)、嗜碱性粒细胞 (basophil) 呈正相关 (图 3C)。

2.4 关键基因的筛选与评价 利用 Cytoscape 软件对上述 12 个存在潜在相互作用的基因进行分析,以 Degree 值为标准 (表 2) 绘制 PPI 图。连接度最高的前 3 个基因 (以下称关键基因) 分别为真核翻译起

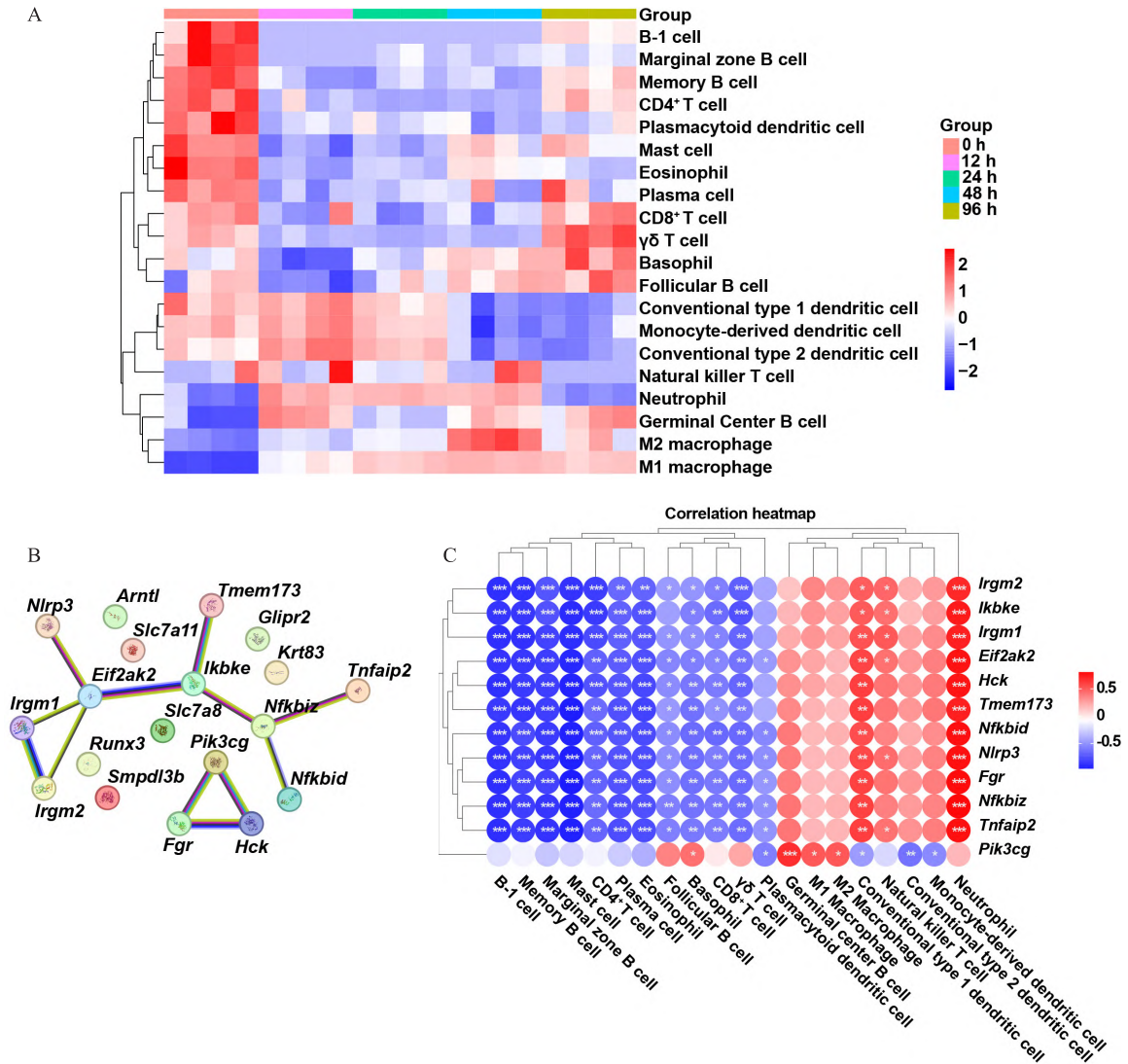


图3 免疫浸润及 PPI 分析

Fig.3 Immune infiltration and PPI analysis

A: Heatmap of 20 immune cell subtypes in immune infiltration analysis; B: PPI analysis results of 19 autophagy-related genes; C: Heatmap of the correlation between 12 interacting protein-coding genes and 20 immune cell subtypes; correlation coefficient * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

始因子 2α 激酶 2 (eukaryotic translation initiation factor 2 alpha kinase 2, *Eif2ak2*)、NF-κB 抑制因子 ζ (nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B cells inhibitor zeta, *Nfkbiz*) 和 NF-κB 抑制因子 ε 激酶 (inhibitor of kappaB kinase epsilon, *Ikbke*) (图 4A)。 *Eif2ak2*、*Ikbke* 和 *Nfkbiz* 3 个基因在感染不同时间点的表达水平变化显著。单因素方差分析结果显示,这 3 者在 5 个时间组间均存在统计学差异 ($F = 110.1, 241.4, 148.9$, 均 $P < 0.001$)。Tukey 多重比较分析进一步表明,与 0 h 相比,3 者在感染后 12、24、48 和 96 h 的表达水平均显著上调 (均 $P_{\text{Tukey}} < 0.001$)。见图 4B。ROC 曲线分析结果显示,3 个关键基因的 AUC 值均为 1.000 (图 4C)。

表 2 基因 Degree 值

Tab.2 Gene Degree values

Rank	Gene symbol	Degree value
1	<i>Eif2ak2</i>	8
2	<i>Ikbke</i>	6
3	<i>Nfkbiz</i>	6
4	<i>Irgm2</i>	4
5	<i>Irgm1</i>	4
6	<i>Fgr</i>	4
7	<i>Hck</i>	4
8	<i>Pik3cg</i>	4
9	<i>Nlrp3</i>	2
10	<i>Tmem173</i>	2
11	<i>Nfkbid</i>	2
12	<i>Tnfaip2</i>	2

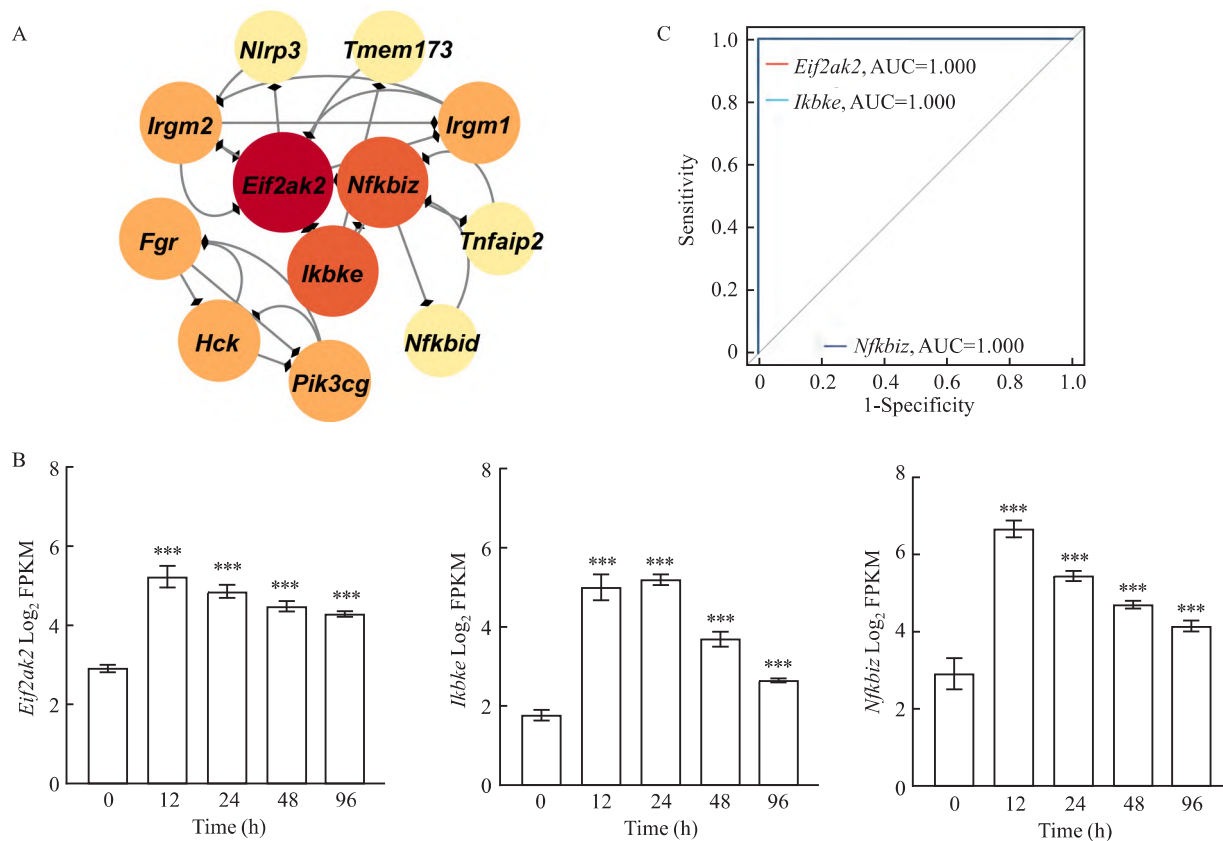
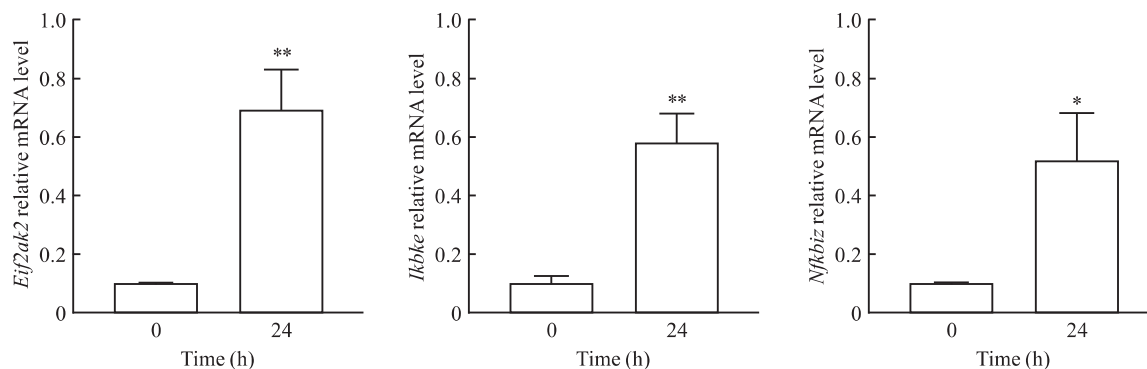


图4 关键基因的筛选及评价

Fig. 4 Screening and evaluation of key genes

A: PPI network of 12 interacting protein-coding genes; B: Bar plots showed the expression levels of three key genes at different time points; C: ROC curves of three key genes; *** $P < 0.001$ vs 0 h.

图5 关键基因的 RT-qPCR 验证结果 ($n = 3$)Fig. 5 RT-qPCR validation of key genes ($n = 3$)

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs 0 h group.

2.5 RT-qPCR 验证关键基因 为了验证上述关键基因在 USA300 肺部感染小鼠肺部的表达,分别收集健康小鼠(0 h)及感染 24 h 后小鼠肺组织样本,通过 RT-qPCR 检测关键基因的相对表达量。结果显示,*Eif2ak2*、*Ikbke* 和 *Nfkbiz* 基因在感染 24 h 后的相对表达量均高于 0 h ($t = 7.307, 8.073, 4.558, P =$

0.001 9、0.001 3、0.010 4) 的表达量(图 5)。

3 讨论

本研究从自噬相关基因的角度,通过生物信息学的方法,筛选和验证了社区获得性感染的重要条件致病菌—高耐药且高毒力 MRSA USA300 引发肺

部感染过程中的自噬相关基因,探讨了 USA300 肺部感染过程中自噬的分子机制,为确定新的免疫治疗靶点提供了思路。

本研究筛选了 19 个自噬相关基因,这些基因是 ARGs、DEGs 和 WGCNA 结果的交集。GO 富集分析显示,自噬相关基因参与的生物过程之一是先天免疫反应的正调控,表明自噬在促进宿主先天免疫反应中起重要作用。研究^[8]表明,巨噬细胞可以在 SA 的诱导下发生细胞自噬,并提升其吞噬能力。免疫浸润结果显示,巨噬细胞、中性粒细胞在感染后大量浸润,这与先前的研究结果^[7]一致。同时,PPI 网络显示的 12 个存在潜在相互作用的自噬相关基因中有 11 个自噬相关基因与中性粒细胞呈正相关。这表明中性粒细胞在 USA300 肺部感染急性炎症反应阶段中是重要的效应细胞,而自噬途径与其紧密相关。研究^[9]表明,中性粒细胞可以在识别 SA 后迅速形成细胞外陷阱以发挥抗菌作用,而自噬参与了细胞外陷阱的形成^[10],故通过自噬加强中性粒细胞细胞外陷阱可能是 USA300 肺部感染潜在的治疗策略。

随后,本研究从 12 个自噬相关基因中进一步筛选出 3 个关键基因,分别为 *Eif2ak2*、*Ikbke* 和 *Nfkbiz*。这 3 个基因的 ROC 曲线下面积均为 1,表明它们的表达模式可以有效区分感染后小鼠与健康小鼠。进一步的 RT-qPCR 结果显示,*Eif2ak2*、*Ikbke* 和 *Nfkbiz* 基因的相对表达水平在急性炎症反应高峰期均显著上调。研究^[11]表明,小檗碱能够提升细胞自噬水平,而 EIF2AK2 蛋白是小檗碱发挥作用的靶点之一,EIF2AK2 蛋白以依赖该基因的方式调节多种信号转导通路,包括 AKT、JNK 和 NF- κ B 通路^[12]。其中,NF- κ B 在转录激活与炎症反应相关的基因中起着核心作用,可以增强宿主的抗菌能力^[13]。此外,I κ B 激酶(inhibitor of kappa B kinase,IKK)复合物可以通过 NF- κ B 非依赖性途径促进细胞自噬^[14]。同时,IKK 复合物还可以通过磷酸化降解 NF- κ B 抑制因子(nuclear factor kappa B inhibitor,I κ B)激活 NF- κ B^[15],而 NF- κ B 又可以通过诱导自噬相关蛋白如 BECN1 和 SQSTM1 的表达来促进自噬^[16]。这提示在 USA300 肺部感染模型中,*Eif2ak2* 和 *Ikbke* 基因编码的蛋白可能是促进肺部中性粒细胞自噬重要蛋白因子之一,它们通过促进细胞自噬功能以对抗病原菌感染。另一方面,它们还能通过调节 I κ B,如 *Nfkbiz* 的编码蛋白,激活 NF- κ B 来进一步促进自噬与炎症反应。

参考文献

- [1] GBD 2019 Antimicrobial Resistance Collaborators. Global mortality associated with 33 bacterial pathogens in 2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019 [J]. Lancet, 2022, 400(10369): 2221–48. doi: 10.1016/S0140-6736(22)02185-7.
- [2] He H, Wunderink R G. *Staphylococcus aureus* pneumonia in the community [J]. Semin Respir Crit Care Med, 2020, 41(4): 470–9. doi: 10.1055/s-0040-1709992.
- [3] Clegg J, Soldaini E, McLoughlin R M, et al. *Staphylococcus aureus* vaccine research and development: the past, present and future, including novel therapeutic strategies [J]. Front Immunol, 2021, 12: 705360. doi: 10.3389/fimmu.2021.705360.
- [4] Deretic V. Autophagy in inflammation, infection, and immunometabolism [J]. Immunity, 2021, 54(3): 437–53. doi: 10.1016/j.immuni.2021.01.018.
- [5] Keller M D, Torres V J, Cadwell K. Autophagy and microbial pathogenesis [J]. Cell Death Differ, 2020, 27(3): 872–86. doi: 10.1038/s41418-019-0481-8.
- [6] Maurer K, Reyes-Robles T, Alonzo F 3rd, et al. Autophagy mediates tolerance to *Staphylococcus aureus* alpha-toxin [J]. Cell Host Microbe, 2015, 17(4): 429–40. doi: 10.1016/j.chom.2015.03.001.
- [7] Zhao Y, Zhai L, Qin T, et al. Time-course transcriptome analysis of the lungs of mice challenged with aerosols of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA300 clone reveals inflammatory balance [J]. Biomolecules, 2023, 13(2): 347. doi: 10.3390/biom13020347.
- [8] 吕允相, 吴惠梅, 方磊, 等. 自噬对巨噬细胞吞噬金黄色葡萄球菌的影响 [J]. 安徽医科大学学报, 2014, 49(6): 706–10. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2014.06.002.
- [8] Lv Y X, Wu H M, Fang L, et al. The effect of autophagy on the *Staphylococcus aureus* phagocytosis by macrophages [J]. Acta Univ Med Anhui, 2014, 49(6): 706–10. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2014.06.002.
- [9] Pilsczek F H, Salina D, Poon K K H, et al. A novel mechanism of rapid nuclear neutrophil extracellular trap formation in response to *Staphylococcus aureus* [J]. J Immunol, 2010, 185(12): 7413–25. doi: 10.4049/jimmunol.1000675.
- [10] Papayannopoulos V. Neutrophil extracellular traps in immunity and disease [J]. Nat Rev Immunol, 2018, 18(2): 134–47. doi: 10.1038/nri.2017.105.
- [11] 杨琳, 王蓉蓉, 郭小雨, 等. 小檗碱激活 SIRT1/AMPK 信号通路改善高糖诱导的系膜细胞异常增殖和自噬功能 [J]. 安徽医科大学学报, 2023, 58(6): 896–901. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.06.003.
- [11] Yang L, Wang R R, Guo X Y, et al. Berberine activates SIRT1/AMPK signaling pathway to improve mesangial cell proliferation and autophagy function induced by high glucose [J]. Acta Univ Med Anhui, 2023, 58(6): 896–901. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.06.003.
- [12] Wei W, Zeng Q, Wang Y, et al. Discovery and identification of EIF2AK2 as a direct key target of berberine for anti-inflammatory effects [J]. Acta Pharm Sin B, 2023, 13(5): 2138–51. doi: 10.1016/j.apsb.2022.12.009.
- [13] Taniguchi K, Karin M. NF- κ B, inflammation, immunity and

- cancer: coming of age [J]. *Nat Rev Immunol*, 2018, 18(5): 309–24. doi: 10.1038/nri.2017.142.
- [14] Criollo A, Senovilla L, Authier H, et al. The IKK complex contributes to the induction of autophagy [J]. *EMBO J*, 2010, 29(3): 619–31. doi: 10.1038/emboj.2009.364.
- [15] Yu H, Lin L, Zhang Z, et al. Targeting NF- κ B pathway for the therapy of diseases: mechanism and clinical study [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2020, 5(1): 209. doi: 10.1038/s41392-020-00312-6.
- [16] Copetti T, Bertoli C, Dalla E, et al. p65/RelA modulates BECN1 transcription and autophagy [J]. *Mol Cell Biol*, 2009, 29(10): 2594–608. doi: 10.1128/MCB.01396-08.

RNA-seq-based screening of autophagy-related genes during lung infection by highly antibiotic-resistant and highly virulent *Staphylococcus aureus*

Zha Jinhong^{1,2}, Kuang Qi^{1,2}, Wu Chengxi², Zhu Xiaoyu², Su Duo²,

Zhang Lili², Lyu Meng², Hu Lingfei², Zhou Dongsheng², Yang Wenhui^{1,2}

(¹*School of Basic Medical Sciences, Anhui Medical University, Hefei 230032;*

²*Academy of Military Medical Sciences, Academy of Military Sciences, Beijing 100071)*

Abstract Objective To identify autophagy-related genes involved in pulmonary infection caused by the highly drug-resistant and virulent methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain USA300 (USA300), and to explore the underlying molecular mechanisms, thereby providing potential targets for immunotherapy. **Methods** The GSE220943 dataset of a USA300-induced pulmonary infection mouse model was obtained from the GEO database. Differentially expressed genes (DEGs) were identified using the DESeq2 package. Autophagy-related genes (ARGs) were retrieved from the MSigDB and Autophagy databases. Weighted gene co-expression network analysis (WGCNA) was performed to construct gene co-expression modules. Genes overlapping among DEGs, ARGs, and WGCNA modules were identified as autophagy-related DEGs. Gene Ontology (GO) enrichment analysis was conducted using the clusterProfiler R package, while Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment analysis was performed *via* the Metascape platform. Immune cell infiltration was analyzed using the ImmuneCellAI-mouse website. A protein-protein interaction (PPI) network was constructed using the STRING database, and hub genes were identified through topological analysis in Cytoscape. Receiver operating characteristic curve (ROC) curves were plotted *via* the website <https://www.bioinformatics.com.cn>. Finally, key gene expression was validated in mouse lung tissues by real-time quantitative reverse transcription PCR (RT-qPCR). **Results** A total of 6 135, 4 075, 3 680, and 2 342 differentially expressed genes (DEGs) were identified at 12, 24, 48, and 96 hours post-infection, respectively. By integrating DEGs, autophagy-related genes (ARGs), and WGCNA modules, 19 autophagy-related DEGs were identified. GO and KEGG enrichment analyses indicated that these genes were mainly involved in CD4⁺ T cell activation and regulation, innate immune responses, and autophagosome membrane formation. Immune infiltration analysis revealed that innate immune cells such as neutrophils and dendritic cells predominated during the early phase of infection, while $\gamma\delta$ T cells and M2 macrophages became more prominent in the later stages. PPI network analysis identified 12 hub autophagy-related genes, among which three upregulated key genes (*Eif2ak2*, *Ikbke*, and *Nfkbiz*) were further confirmed. The area under the ROC curve for all three genes was 1.000. RT-qPCR validation demonstrated significantly elevated expression of these three genes in lung tissues at 24 hours post-infection (all $P < 0.05$). **Conclusion** *Eif2ak2*, *Ikbke*, and *Nfkbiz* may be involved in the pulmonary infection caused by USA300 by promoting autophagy and hold promise as potential targets for immunotherapy.

Key words methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; mouse; pneumonia; autophagy; key genes; immune infiltration; bioinformatics

Fund programs National Natural Science Foundation of China (No. 82470017); Science and Technology Research and Development Plan Project of Shijiazhuang (No. 211200553)

Corresponding author Yang Wenhui, E-mail: fionyoung@163.com