

# 基于生物信息学探索支气管哮喘中的 潜在差异免疫基因和免疫浸润特征

石硕川<sup>1\*</sup>, 曾荣<sup>2\*</sup>, 张锦涛<sup>1</sup>, 张东<sup>2</sup>, 潘云<sup>2</sup>, 刘晓菲<sup>1</sup>, 许长娟<sup>1</sup>, 王莹<sup>1</sup>, 董亮<sup>1,2</sup>

(1. 山东第一医科大学第一附属医院呼吸与危重症医学科 山东省呼吸疾病研究所, 山东 济南 250014;

2. 山东大学 山东省千佛山医院呼吸与危重症医学科, 山东 济南 250014)

**摘要:** **目的** 识别支气管哮喘发生发展过程中差异表达的免疫关键基因和免疫细胞, 并探讨两者之间的相关性。**方法** 从公共基因表达数据库 (gene expression omnibus, GEO) 和 Import 数据库中分别下载哮喘相关数据集和免疫相关基因, 利用 R 软件分析获得 GSE76262 中差异表达的免疫相关基因 (differentially expressed immune-related genes, DE-IRGs)。在 STRING 数据库中明确 DE-IRGs 间的相互作用。使用 Cytoscape 软件中的 CytoHubba 插件筛选关键的 DE-IRGs, 并在 GSE137268 中进行验证。利用受试者工作特征 (receiver operating characteristic, ROC) 曲线评估关键 DE-IRGs 作为生物标志物的潜力。此外, 单样本基因集富集分析 (single-sample gene set enrichment analysis, ssGSEA) 算法被用来分析 28 种免疫细胞在哮喘和健康者中的表达差别, 使用斯皮尔曼相关系数评估关键免疫基因与免疫细胞之间的相关性。**结果** 在 GSE76262 中鉴定出 17 个 DE-IRGs, 经 PPI 网络的筛选和在 GSE137268 中的验证, CCL22、CCR7、IL1R2、IL18R1、TNFAIP3 和 VEGFA 被识别为哮喘患者诱导痰中的关键 DE-IRGs 且具有较高的诊断价值。此外, ssGSEA 的结果提示哮喘患者存在明显的免疫失衡, 与健康者相比, 11 种免疫细胞在哮喘患者诱导痰中的浸润明显增加。同时, CCL22、CCR7、IL1R2、IL18R1、VEGFA、TNFAIP3 与浸润的免疫细胞呈显著正相关。**结论** CCL22、CCR7、IL1R2、IL18R1、VEGFA、TNFAIP3 可作为哮喘的潜在生物标志物, 且可能参与调控其发病过程中免疫细胞的浸润。

**关键词:** 支气管哮喘; 免疫基因; 生物标志物; 免疫浸润

中图分类号: R562.2

文献标志码: A

## Bioinformatics-based exploration of potential differential immune genes and immune infiltration signatures in bronchial asthma

SHI Shuochuan<sup>1\*</sup>, ZENG Rong<sup>2\*</sup>, ZHANG Jintao<sup>1</sup>, ZHANG Dong<sup>2</sup>, PAN Yun<sup>2</sup>, LIU Xiaofei<sup>1</sup>,  
XU Changjuan<sup>1</sup>, WANG Ying<sup>1</sup>, DONG Liang<sup>1,2</sup>

(1. Department of Respiratory, The First Affiliated Hospital of Shandong First Medical University,  
Shandong Institute of Respiratory Diseases, Jinan 250014, Shandong, China;

2. Department of Respiratory, Shandong Provincial Qianfoshan Hospital, Shandong University,  
Jinan 250014, Shandong, China)

**Abstract: Objective** To identify immunologically critical genes and immune cells that are differentially expressed during the development of asthma and to explore the correlation between them. **Methods** The asthma-related datasets and immune-related genes were downloaded from the Gene Expression Omnibus database (GEO) and Import database, respectively, and analyzed using R software to obtain differentially expressed immune-related genes (DE-IRGs) in

收稿日期: 2024-01-18

基金项目: 山东省重点研发计划 (2021SFRC0504); 国家自然科学基金 (82270032); 山东省自然科学基金联合基金 (ZR2021LSW015); 济南市呼吸疾病临床医学研究中心项目 (202132002)

通信作者: 董亮。E-mail: dl5506@126.com

\* 共同第一作者。

GSE76262. The interactions between DE-IRGs were clarified in the STRING database. Key DE-IRGs were screened using the CytoHubba plugin in Cytoscape software and validated in GSE137268. Receiver operating characteristic (ROC) curves were used to assess the potential of critical DE-IRGs as biomarkers. The single-sample gene set enrichment analysis (ssGSEA) algorithm was used to examine the differential expression of 28 immune cells in asthmatic and healthy individuals. Spearman correlation coefficients were used to evaluate the correlation between key immune genes and immune cells. **Results** Seventeen DE-IRGs were identified in GSE76262, and CCL22, CCR7, IL1R2, IL18R1, TNFAIP3, and VEGFA were identified as critical DE-IRGs in induced sputum from asthmatics with high diagnostic value, as screened by the PPI network and validated in GSE137268. In addition, the results of ssGSEA suggested a significant immune imbalance in asthmatics, with 11 types of immune cells significantly infiltrated in the induced sputum of asthmatics compared to healthy individuals. Meanwhile, CCL22, CCR7, IL1R2, IL18R1, VEGFA, and TNFAIP3 were positively correlated with infiltrated immune cells. **Conclusion** CCL22, CCR7, IL1R2, IL18R1, VEGFA, and TNFAIP3 serve as potential biomarkers of asthma and may modulate infiltration of immune cells in its pathogenesis.

**Key words:** Bronchial asthma; Immune-related genes; Biomarkers; Immune infiltration

支气管哮喘是一种常见的慢性呼吸系统疾病,主要症状包括反复出现的喘息、咳嗽、胸闷和呼吸困难等<sup>[1]</sup>。据报道,我国20岁及以上人群的哮喘患病率为4.2%,其中26.2%的患者已出现不可逆性气流受限,对个人生活质量和国家医疗保健造成了显著的负担<sup>[2]</sup>。哮喘的病理生理机制十分复杂,肺部免疫反应的异常在其发生发展中起到关键作用。例如,母亲孕期及婴幼儿期的危险因素暴露会影响发育中的免疫系统,从而增加哮喘的易感性<sup>[3-4]</sup>。受损的气道上皮会释放多种细胞因子和趋化因子,以启动和调节固有免疫和适应性免疫的进程,导致树突状细胞、嗜酸性粒细胞、中性粒细胞、淋巴细胞、先天性淋巴细胞和肥大细胞等在气道周围大量浸润并被激活<sup>[5-6]</sup>。而这些免疫细胞与邻近结构细胞之间也存在着复杂的相互作用,并与气道高反应性、气道重塑等特征紧密相关<sup>[7-8]</sup>。

近年来,随着生物信息学的发展,基因组学、转录组学、蛋白质组学等多种方法已被用于探索疾病相关生物标志物、分子机制和治疗靶点<sup>[9]</sup>。本研究拟分析公共基因表达数据库(gene expression omnibus, GEO)中与哮喘相关的数据集,旨在鉴定其中的关键免疫基因和免疫细胞浸润状态,为发现更多潜在的免疫治疗靶点提供参考。

## 1 资料与方法

### 1.1 资料

在GEO数据库中下载哮喘相关数据集的RNA表达文件(GSE76262和GSE137268)。GSE76262数据集包含139个诱导痰样本,其中118个来自哮喘患者,21个来自健康者;GSE137268数据集包含69个诱导痰样本,其中54个来自哮喘患者,15个来

自健康者。同时,在Import数据库(<https://www.immport.org/shared/>)中获取1793个免疫相关基因(immune-related genes, IRGs)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 差异表达免疫相关基因数据分析

使用R软件(4.1.3版本)中的“Limma”包对样本数据进行归一化,基于 $|\log_2 FC| > 1$ 和 $\text{adjust } P < 0.05$ 的标准筛选哮喘与健康者诱导痰中的差异表达基因(differentially expressed genes, DEGs)。DEGs和IRGs重叠的基因被定义为差异表达的免疫相关基因(differentially expressed immune-related genes, DE-IRGs)。

#### 1.2.2 DE-IRGs的功能富集分析

使用R软件中“ClusterProfiler”包对DE-IRGs进行基因本体(gene ontology, GO)、京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)富集分析。 $P < 0.05$ 为富集分析有统计学意义。

#### 1.2.3 蛋白质-蛋白质相互作用(protein-protein interaction, PPI)网络构建和关键基因的识别

使用STRING数据库分析DE-IRGs之间的相互作用,并用Cytoscape软件将结果可视化,随后分别以MCODE插件进行模块分析,以CytoHubba插件中的四种算法(MCC、MNC、EPC和DMNC)识别关键基因。

#### 1.2.4 关键基因的验证和诊断价值的评估

对GSE137268的RNA数据以“ggpubr”包绘制箱型图验证关键基因的表达差异,进一步使用“pROC”包绘制受试者工作特征(receiver operating characteristic, ROC)曲线来评估关键基因的诊断能力。此外,还使用“rms”包建立了关键免疫基因的列线图模型。

### 1.2.5 免疫浸润分析

基于单样本基因集富集分析 (single sample gene set enrichment analysis, ssGSEA) 算法, 评估哮喘和健康者诱导痰中 28 种免疫细胞的比例和差异。

### 1.2.6 关键 DE-IRGs 与差异免疫细胞的相关性分析

基于筛选到的关键 DE-IRGs 和差异免疫细胞, 进一步使用斯皮尔曼相关系数评估了两者间的相关性。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 1.3 统计学处理

本研究使用 R 软件 (版本 4.1.3) 进行数据分析。独立样本  $t$  检验和 Mann-Whitney  $U$  检验分别被用来比较正态分布和非正态分布的两组计量资料

的差异。通过 ROC 曲线来评估关键基因的诊断能力。采用斯皮尔曼进行相关性分析。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义 (双尾)。

## 2 结果

### 2.1 DE-IRGs 的筛选

根据设置的筛选标准 ( $|\log_2 FC| > 1$  和  $\text{adjust } P < 0.05$ ), 在数据集 GSE76262 中筛选出 74 个 DEGs。将 74 个 DEGs 与 Import 数据库中的 1 793 个免疫相关基因取交集, 得到 17 个 DE-IRGs, 其中高表达的 13 个、低表达的 4 个。见图 1。

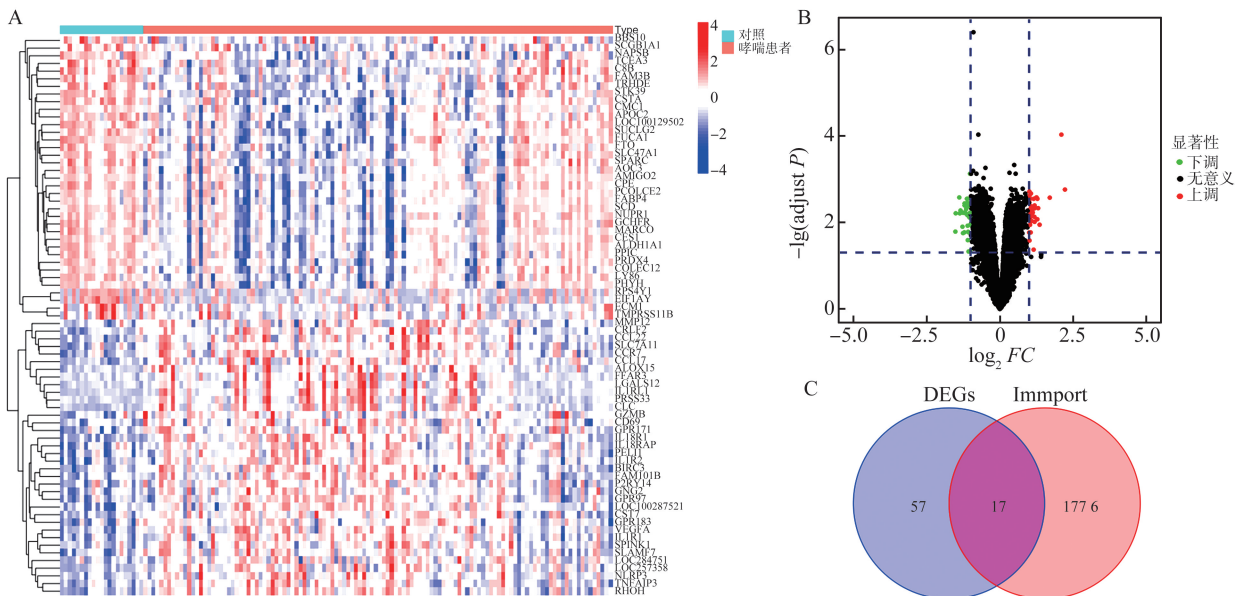


图 1 GSE76262 中的 DE-IRGs

A: GSE76262 中 DEGs 的热图; B: GSE76262 中 DEGs 的火山图; C: GSE76262 中 DEGs 与 Import 数据库中免疫相关基因的交集。

Figure 1 DE-IRGs in GSE76262

A: Heatmap of DEGs in GSE76262; B: Volcano plot of DEGs in GSE76262; C: Intersection of DEGs in GSE76262 with immune-related genes in the Import database.

### 2.2 DE-IRGs 的 GO 和 KEGG 富集分析

GO 富集分析主要包括生物过程 (biological processes, BP)、分子功能 (molecular functions, MF) 和细胞成分 (cellular components, CC) 三个方面。DE-IRGs 的富集结果提示 DE-IRGs 的 BP 主要集中在细胞因子介导的信号通路、细胞因子的产生

和免疫应答的调控上; MF 的富集条目涉及细胞因子受体活性、免疫受体活性和 NAD(P)+核苷酶活性等; CC 主要富集在质膜外侧、胶原三聚体和内吞囊泡膜等。KEGG 富集分析表明, DE-IRGs 主要参与细胞因子-细胞因子受体相互作用、病毒蛋白与细胞因子及细胞因子受体相互作用等。见表 1、表 2。

表 1 支气管哮喘中差异表达的免疫相关基因的 GO 富集分析

Table 1 GO enrichment analysis of differentially expressed immune-related genes in bronchial asthma

GO 分类名	GO 编码	GO 条目名称	基因数	P
BP	0019221	细胞因子介导的信号通路	11	$2.52 \times 10^{-14}$
BP	0097529	髓样白细胞迁移	5	$1.18 \times 10^{-6}$
BP	0032103	对外界刺激反应的正向调节	6	$1.36 \times 10^{-6}$
BP	0002825	Th1 型免疫反应的调节	3	$1.79 \times 10^{-6}$

续表

GO 分类名	GO 编码	GO 条目名称	基因数	P
BP	0001819	细胞因子产生的正向调节	6	$2.28 \times 10^{-6}$
MF	0004896	细胞因子受体活性	7	$1.71 \times 10^{-12}$
MF	0140375	免疫受体活性	7	$2.86 \times 10^{-11}$
MF	0050135	NAD(P)+核苷酶活性	4	$9.07 \times 10^{-10}$
MF	0061809	NAD+核苷酸酶,环状 ADP 核糖的产生	4	$9.07 \times 10^{-10}$
MF	0019955	细胞因子的结合	6	$1.95 \times 10^{-9}$
CC	0009897	质膜的外侧	4	$4.00 \times 10^{-4}$
CC	0005581	胶原蛋白三聚物	2	$2.50 \times 10^{-3}$
CC	0030666	内吞囊泡膜	2	$1.20 \times 10^{-2}$

表 2 支气管哮喘中差异表达的免疫相关基因的 KEGG 富集分析

Table 2 KEGG enrichment analysis of differentially expressed immune-related genes in bronchial asthma

通路编号	通路名称	基因数	P
hsa04060	细胞因子-细胞因子受体相互作用	9	$3.93 \times 10^{-10}$
hsa04061	病毒蛋白与细胞因子及细胞因子受体的相互作用	5	$6.87 \times 10^{-7}$
hsa05418	流体剪切应力与动脉粥样硬化	3	$1.90 \times 10^{-3}$

### 2.3 DE-IRGs 的 PPI 网络构建、模块分析和关键基因的筛选

在 STRING 中分析上述 DE-IRGs 之间的相互作用关系。随后将上述结果用 Cytoscape 可视化(图 2A),基于 MCODE 插件识别到一个具有 12 个节点和 59 条边,得分为 10.727 的关键模块(图 2B)。同时,利用 CytoHubba 中的 MCC、MNC、EPC 和 DMNC 四种算法分别获取相对应的前 10 个基因,进一步将其交集获得的基因视为关键基因(图 2C),包括 C-C 基序趋化因子配体 22(C-C motif chemokine ligand 22, CCL22)、C-C 基序趋化因子

受体 7(C-C motif chemokine receptor 7, CCR7)、白介素 1 受体 2(interleukin-1 receptor type 2, IL1R2)、白介素 18 受体 1(interleukin-18 receptor type 1, IL18R1)、血管内皮生长因子 A(vascular endothelial growth factor A, VEGFA)、肿瘤坏死因子  $\alpha$  诱导蛋白 3(tumour necrosis factor alpha-induced protein 3, TNFAIP3)、颗粒酶 B(granzyme B, GZMB)、白介素 1 受体 1(interleukin-1 receptor type 1, IL1R1)、白介素 1 受体样分子 1(interleukin 1 receptor-like molecule 1, IL1RL1),其表达差异如图 3 所示。

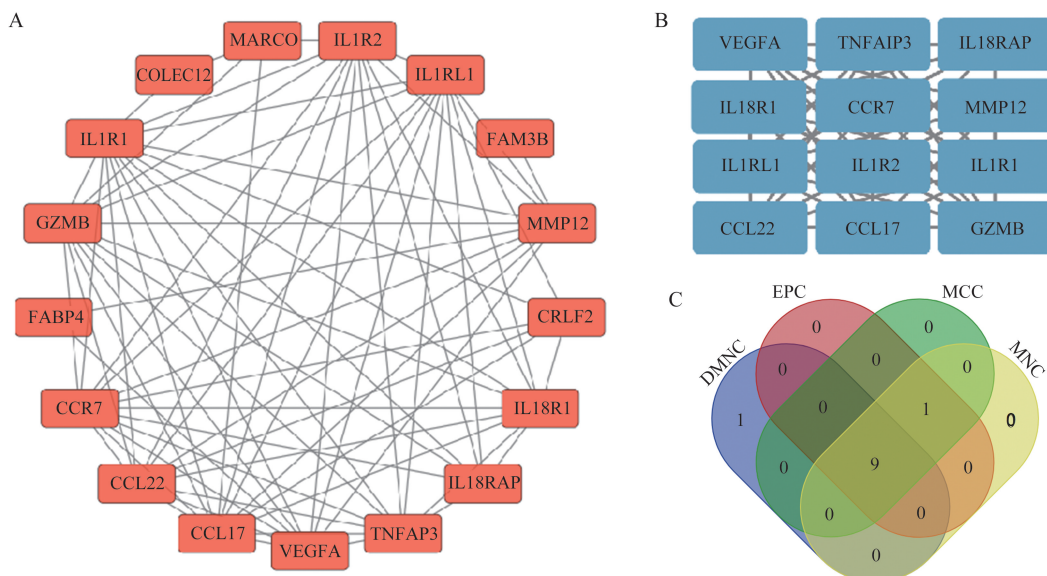


图 2 DE-IRGs 的 PPI 网络和关键基因的筛选

A: DE-IRGs 的 PPI 网络; B: DE-IRGs 中的关键模块; C: 基于 MCC、MNC、EPC 和 DMNC 四种算法筛选的关键基因。

Figure 2 PPI network of DE-IRGs and screening of key genes

A: PPI network of DE-IRGs; B: Key modules of DE-IRGs; C: Key genes screened based on the four algorithms of MCC, MNC, EPC and DMNC.

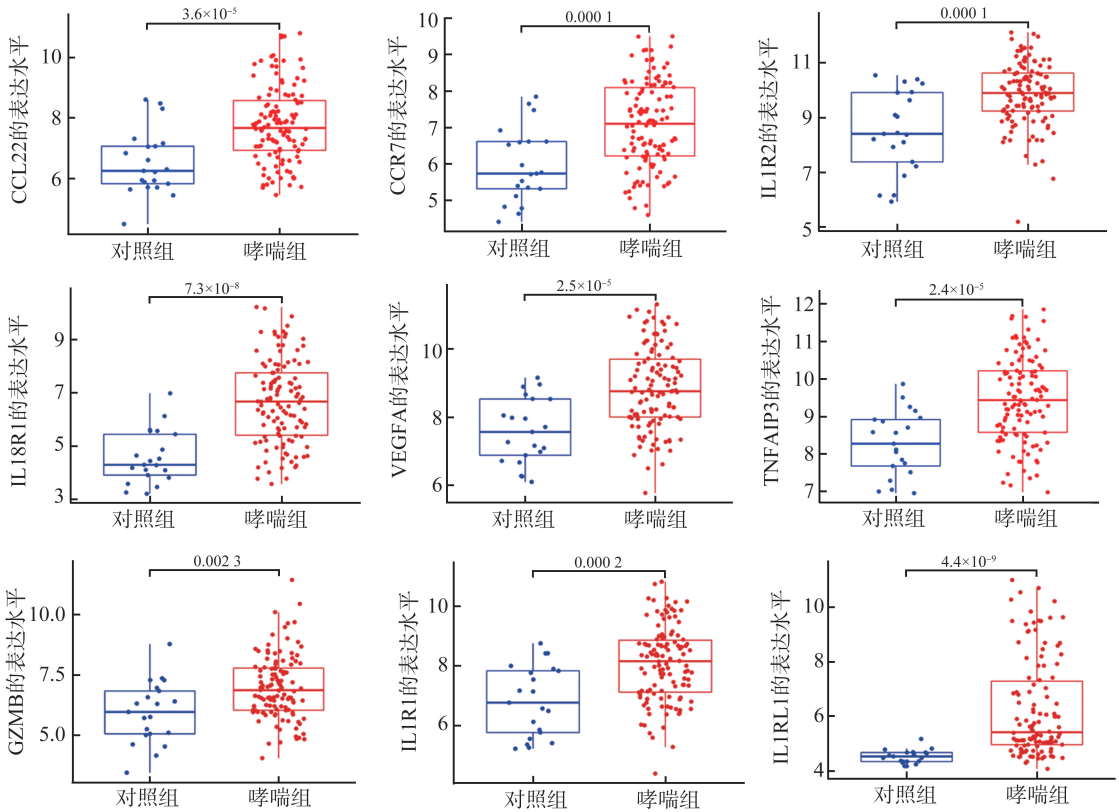


图3 数据集 GSE76262 中哮喘患者和对照者的 CCL22、CCR7、IL1R2、IL18R1、VEGFA、TNFAIP3、GZMB、IL1R1、IL1RL1 表达水平比较

Figure 3 Comparison of CCL22, CCR7, IL1R2, IL18R1, VEGFA, TNFAIP3, GZMB, IL1R1, and IL1RL1 expression levels between asthmatics and controls in GSE76262

#### 2.4 关键基因的表达验证和诊断价值评估

在验证集 GSE137268 中进一步比较上述关键基因的表达差异,结果显示 CCL22、CCR7、IL1R2、IL18R1、VEGFA、TNFAIP3 的表达差异与在 GSE76262 中一致,即在哮喘患者的诱导痰中显著升

高( $P < 0.05$ )。两个数据集中 CCL22、CCR7、IL1R2、IL18R1、VEGFA、TNFAIP3 的 ROC 曲线下面积均  $> 0.650$ 。此外,基于 6 个关键基因建立的列线图模型显示其综合诊断价值为 0.874 (GSE76262) 和 0.78 (GSE137268),具有较高的诊断价值。见图 4~图 6。

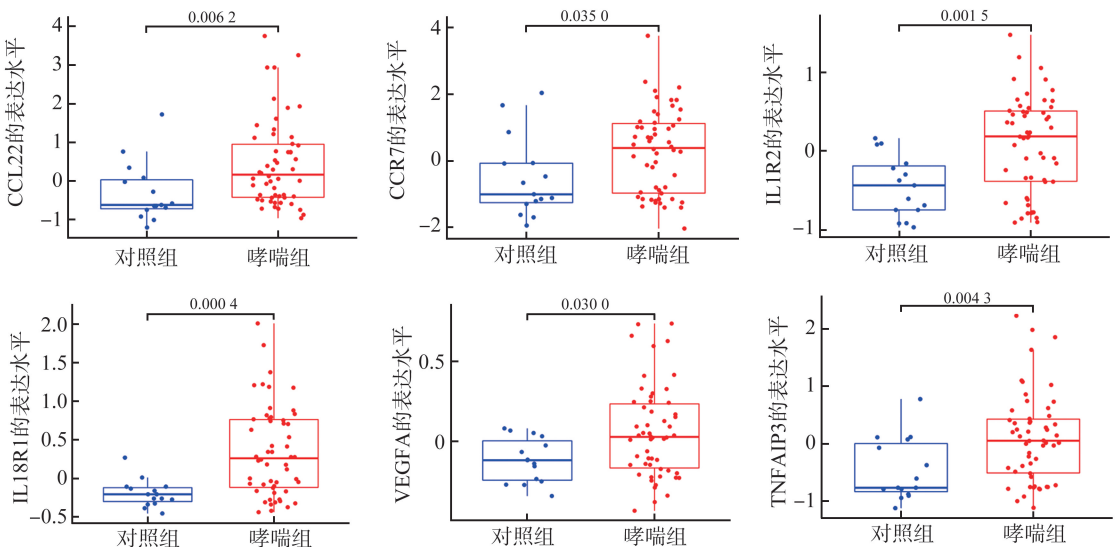


图4 数据集 GSE137268 中哮喘患者和对照者的 CCL22、CCR7、IL1R2、IL18R1、VEGFA、TNFAIP3 表达水平比较

Figure 4 Comparison of CCL22, CCR7, IL1R2, IL18R1, VEGFA, and TNFAIP3 expression levels between asthma patients and controls in GSE137268

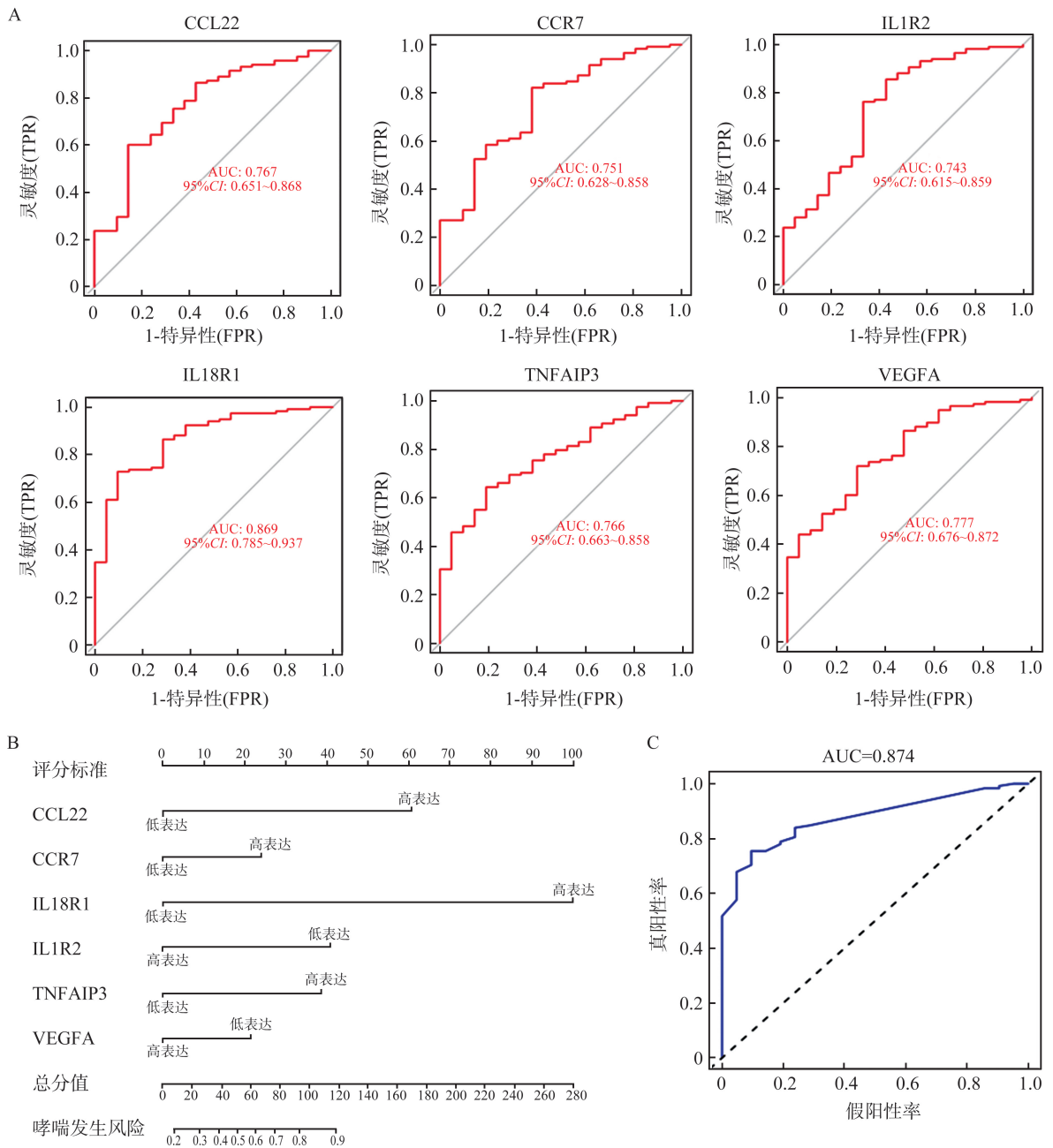
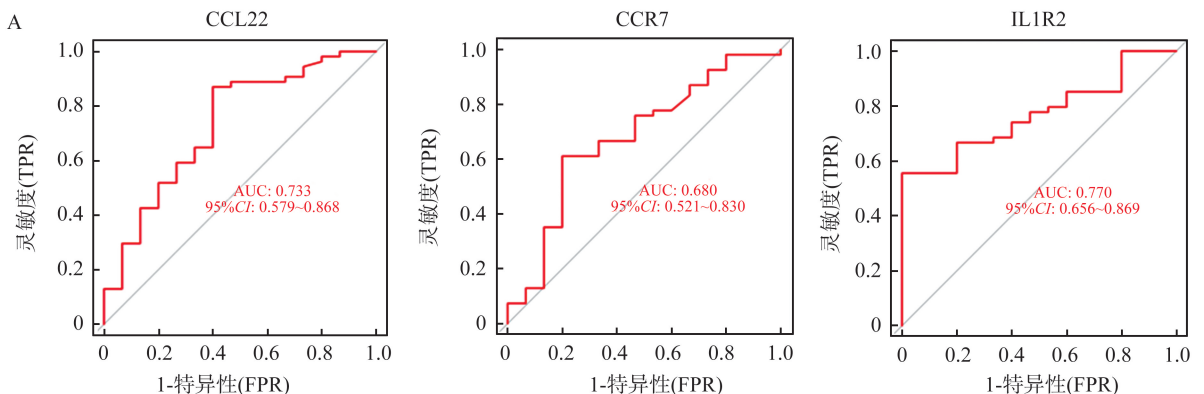


图5 数据集 GSE76262 中 CCL22、CCR7、IL1R2、IL18R1、TNFAIP3、VEGFA 表达诊断哮喘的 ROC 曲线图 (A)、基于表达建立的列线图模型 (B) 和联合诊断哮喘的价值 (C)

Figure 5 ROC curve (A), nomogram (B) and the combined diagnostic value (C) of asthma based on the expressions of CCL22, CCR7, IL1R2, IL18R1, TNFAIP3, and VEGFA in GSE76262



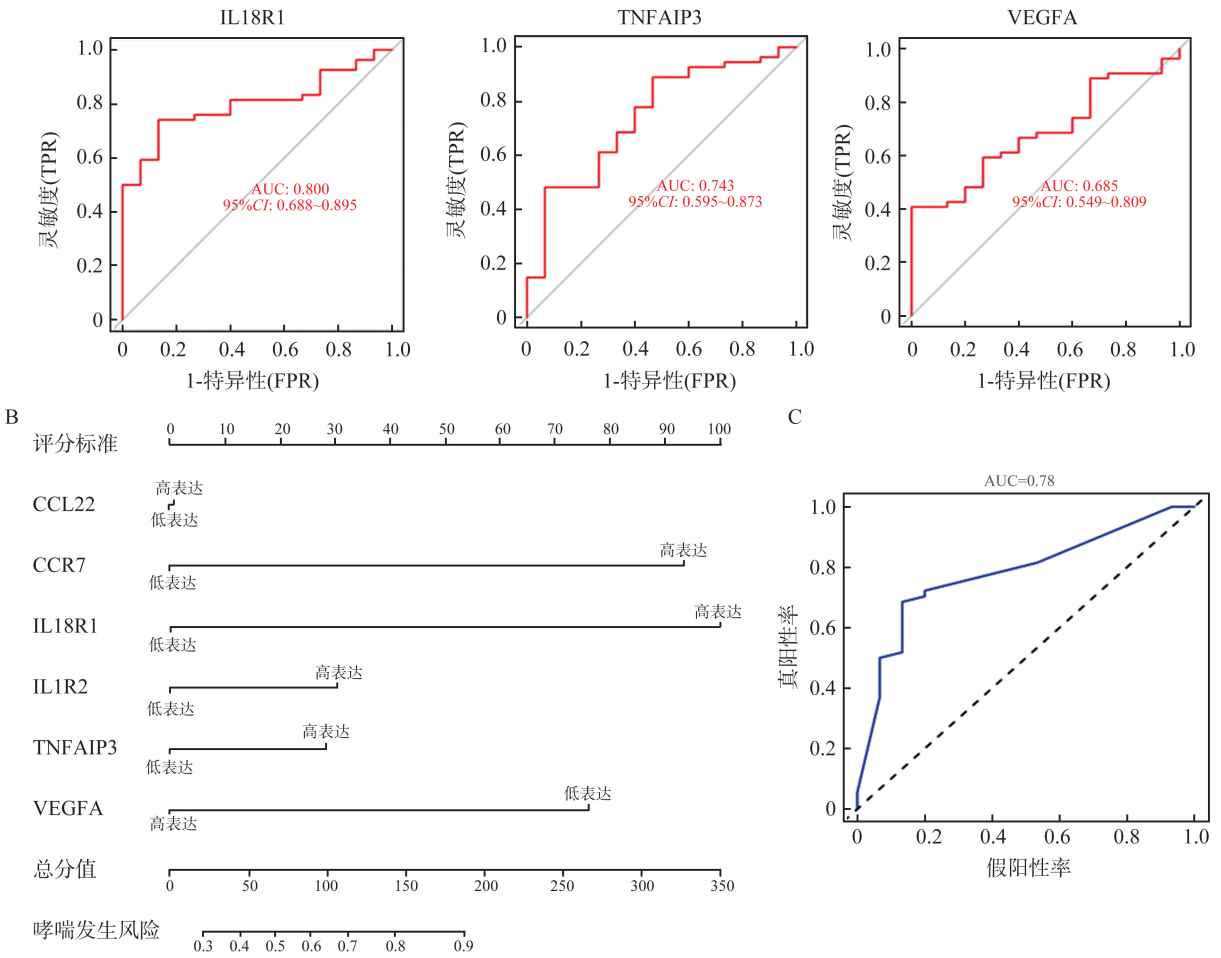


图6 图6数据集 GSE137268 中 CCL22、CCR7、IL1R2、IL18R1、TNFAIP3、VEGFA 表达诊断哮喘的 ROC 曲线图(A)、基于表达建立的列线图模型(B)和联合诊断哮喘的价值(C)

Figure 6 ROC curve (A), nomogram (B) and the combined diagnostic value (C) of asthma based on the expressions of CCL22, CCR7, IL1R2, IL18R1, TNFAIP3, and VEGFA in GSE137268

### 2.5 哮喘患者的免疫浸润改变

ssGSEA 算法提示哮喘患者诱导痰中存在 11 种免疫细胞浸润增加,包括嗜酸性粒细胞( $P < 0.001$ )、肥大细胞( $P < 0.001$ )、单核细胞( $P = 0.011$ )、巨噬细胞( $P = 0.003$ )、活化 B 细胞( $P = 0.004$ )、活化 CD4 T 细胞( $P < 0.001$ )、MDSC( $P < 0.001$ )、调节性 T 细胞( $P = 0.019$ )、Th17 细胞( $P = 0.013$ )、中枢记忆性 CD4 T 细胞( $P = 0.037$ )、效应记忆性 CD8 T 细胞( $P = 0.004$ ),同时自然杀伤细胞( $P = 0.005$ )、 $\gamma\delta$ T 细胞( $P < 0.001$ )、未成熟树突状细胞( $P = 0.047$ )明显减少。见表 3。

### 2.6 关键免疫基因与免疫细胞的相关性分析

关键免疫基因 CCL22、CCR7、IL1R2、IL18R1、VEGFA、TNFAIP3 均与嗜酸性粒细胞、单核细胞、巨噬细胞、肥大细胞、活化 B 细胞、MDSC、调节性 T 细胞、Th17 细胞、活化 CD4 T 细胞、效应记忆性 CD8 T 细胞的显著浸润呈正相关。同时, IL1R2、IL18R1、VEGFA、TNFAIP3 与自然杀伤细胞、 $\gamma\delta$ T 细胞、未成熟树突状细胞呈负相关,提示 CCL22、CCR7、IL1R2、IL18R1、VEGFA、TNFAIP3 可能在哮喘的免疫变化中发挥了重要作用。见图 7。

表 3 哮喘患者与健康者间 28 种免疫细胞的浸润得分

Table 3 Infiltration scores of 28 immune cells between asthmatics and healthy individuals

免疫细胞类型	健康者	哮喘患者	P
Activated B cell	0.212 (0.185~0.247)	0.268 (0.202~0.314)	0.004
Activated CD4 T cell	0.419±0.015	0.467±0.005	<0.001
Activated CD8 T cell	0.470 (0.454~0.487)	0.471 (0.436~0.526)	0.831
Activated dendritic cell	0.779±0.006	0.785±0.002	0.286
CD56bright natural killer cell	0.517±0.004	0.508±0.002	0.128
CD56dim natural killer cell	0.515±0.005	0.527±0.003	0.105

续表

免疫细胞类型	健康者	哮喘患者	<i>P</i>
Eosinophil	0.468±0.014	0.540±0.007	<0.001
Gamma delta T cell	0.634 (0.618~0.652)	0.602 (0.569~0.629)	<0.001
Immature B cell	0.477±0.008	0.491±0.004	0.172
Immature dendritic cell	0.699 (0.677~0.715)	0.683 (0.642~0.709)	0.047
MDSC	0.854±0.005	0.877±0.003	<0.001
Macrophage	0.570±0.008	0.594±0.003	0.003
Mast cell	0.549±0.010	0.589±0.004	<0.001
Monocyte	0.771±0.007	0.795±0.004	0.011
Natural killer T cell	0.463 (0.443~0.481)	0.469 (0.448~0.486)	0.351
Natural killer cell	0.593 (0.581~0.604)	0.579 (0.564~0.595)	0.005
Neutrophil	0.672 (0.483~0.775)	0.722 (0.586~0.824)	0.068
Plasmacytoid dendritic cell	0.776 (0.735~0.793)	0.779 (0.758~0.795)	0.211
Regulatory T cell	0.561 (0.516~0.618)	0.598 (0.570~0.636)	0.019
T follicular helper cell	0.531±0.003	0.525±0.002	0.239
Type 1 T helper cell	0.467±0.003	0.467±0.002	0.899
Type 17 T helper cell	0.321±0.007	0.342±0.003	0.013
Type 2 T helper cell	0.277±0.007	0.267±0.003	0.218
Effector memory CD4 T cell	0.282 (0.231~0.308)	0.282 (0.226~0.360)	0.270
Memory B cell	0.176±0.011	0.178±0.005	0.914
Central memory CD4 T cell	0.140±0.016	0.183±0.008	0.037
Central memory CD8 T cell	0.503±0.004	0.501±0.003	0.721
Effector memory CD8 T cell	0.584±0.008	0.622±0.005	0.004

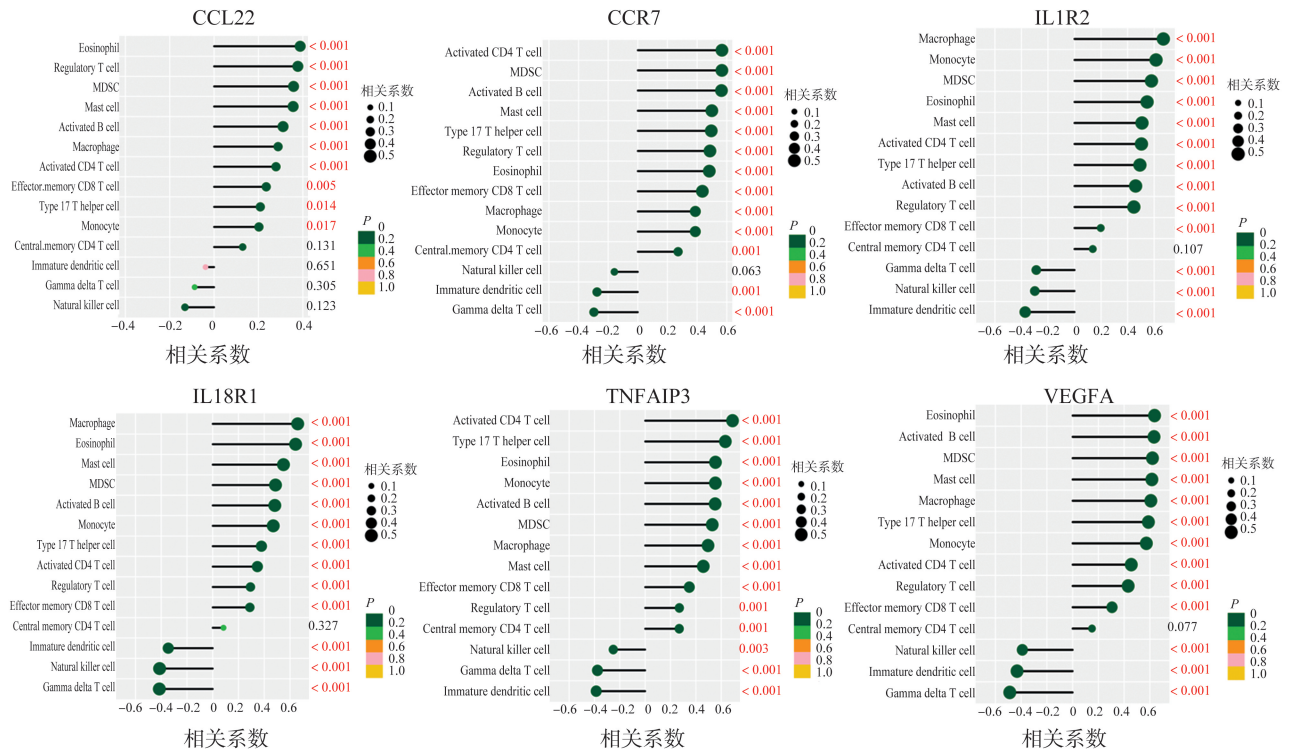


图7 CCL22、CCR7、IL1R2、IL18R1、TNFAIP3、VEGFA与差异免疫细胞的相关性

Figure 7 Correlation of CCL22, CCR7, IL1R2, IL18R1, TNFAIP3, and VEGFA with differential immune cells

### 3 讨论

哮喘是一种异质性疾病,包括复杂的表型和内

型。哮喘表型指生物体由基因型和环境相互作用后而被观察到的特征,内型则强调识别到的用于解释表型的生物途径,后者可以更好地指导临床治疗<sup>[10]</sup>。依据不同的免疫分子机制,哮喘内型可被分

为 2 型炎症型哮喘和非 2 型炎症型哮喘<sup>[10-11]</sup>。目前,已有奥马珠单抗、美泊利单抗和度普利尤单抗等多种生物制剂被开发用于 2 型炎症型哮喘的治疗,但仍有部分患者治疗反应欠佳,最终发展至重症哮喘<sup>[12-14]</sup>。因此,在精准医学的背景下,识别更多潜在的内型及相关分子生物标志物可能为预测哮喘的病情进展和治疗反应提供新的策略。

本研究通过分析数据集 GSE76262,发现哮喘组和对照组之间存在 74 个 DEGs,其中包括 17 个 DE-IRGs。GO 和 KEGG 富集分析提示 DE-IRGs 主要与免疫调节、细胞因子产生和相互作用等有关,突出了免疫-炎症机制在哮喘发病过程中的重要性。值得注意的是,Feng 等<sup>[15]</sup>也旨在利用 GSE76262 数据集探索哮喘中的免疫基因改变,但其主要对引起哮喘中重要通路改变的 DE-IRGs 进行了深入分析。具体而言,基因富集分析提示 NF- $\kappa$ B 信号通路在哮喘患者中被显著激活,而参与该通路的免疫相关基因 TNFAIP3、IL1R1、PLAU、NFKBIA、NFKB1 和 ICAM1 间存在着正向相互作用且对哮喘具有较高的诊断价值。与此不同,结合 PPI 网络的筛选和数据集 GSE137268 的验证,本研究将 IL1R2、IL18R1、CCR7、CCL22、TNFAIP3 和 VEGFA 鉴定为哮喘的潜在关键 DE-IRGs。此外,一些基础研究也观察到免疫相关基因与哮喘的相关性。例如,在遗传上,IL1R2 的单核苷酸多态性增加了哮喘的易感性<sup>[16]</sup>。VEGFA 是血管生成的关键调节因子,被证实参与了气道重塑的发展<sup>[17]</sup>。Pilette 等<sup>[18]</sup>发现,CCL22 在过敏性哮喘患者的支气管肺泡灌洗液中表达升高,并与其中的淋巴细胞数量、IL-5 和 IL-13 显著相关。CCR7 的编码产物是具有 7 个跨膜结构域的 G 蛋白偶联受体,重度哮喘患者的成纤维细胞中 CCR7 的过表达似乎抑制了其对皮质类固醇的敏感性<sup>[19]</sup>。此外,Camiolo 等<sup>[20]</sup>发现,IL18R1 也在肺功能受损和频繁发作的哮喘患者中表达升高,并可能通过激活 NF- $\kappa$ B 促进哮喘气道炎症。作为一种有效的抗炎蛋白,TNFAIP3 编码的 A20 则通过抑制 NF- $\kappa$ B 信号缓解哮喘气道炎症<sup>[21]</sup>。另外,基于 ROC 曲线的结果,我们也注意到本研究识别的关键免疫基因在哮喘中具有较高的诊断价值,可作为潜在的生物标志物。

免疫细胞的浸润是哮喘发病的主要特征之一。基于 ssGSEA 算法,本研究发现嗜酸性粒细胞、肥大细胞、单核细胞、巨噬细胞、活化 B 细胞、活化 CD4 T 细胞、MDSC、调节性 T 细胞、Th17 细胞、中枢记忆性 CD4 T 细胞及效应记忆性 CD8 T 细胞在哮喘

中表达增加,提示其可能不同程度参与了哮喘的发生发展。此外,作为免疫浸润分析的另一种重要方式,Feng 等<sup>[15]</sup>利用 CIBERSORT 算法也发现活化的肥大细胞、嗜酸性粒细胞、CD8 T 细胞在哮喘患者的诱导痰中显著升高。肥大细胞是不同哮喘表型的中枢效应物,其释放的多种介质一方面募集和增强其他免疫细胞的功能,另一方面作用于气道结构细胞介导组织的破坏<sup>[22]</sup>。嗜酸性粒细胞是核心炎症效应细胞,IL-5 等因子可以促进嗜酸性粒细胞的产生、聚集和活化<sup>[23]</sup>,进而释放大量细胞因子和毒性蛋白等加剧哮喘的气道损伤、气道高反应性,促进黏液产生和气道重塑等病理改变<sup>[23]</sup>。此外,哮喘患者的嗜酸性粒细胞还存在凋亡延迟,组织驻留时间延长,导致炎症加重<sup>[24]</sup>。在不同的刺激因素下,巨噬细胞可极化为 M1 和 M2 两种表型,两者均可通过产生趋化因子和激活炎症小体等方式诱导哮喘炎症<sup>[25]</sup>。同时,M2 巨噬细胞衍生的转化生长因子- $\beta$  还可促进哮喘患者气道平滑肌细胞增殖和纤维化<sup>[26]</sup>。调节性 T 细胞是过敏性疾病的关键调节因子,可以限制抗原特异性免疫反应。一些研究表明,成年哮喘患者的气道免疫耐受性受损并伴外周血调节性 T 细胞百分比降低<sup>[27]</sup>。相反地,也有研究发现与轻度哮喘患者和健康者相比,中重度哮喘患者的气道调节性 T 细胞增加<sup>[28]</sup>。上述研究差异可能与研究人群和调节性 T 细胞检测方法有关。另外,尽管调节性 T 细胞表达增加,但高表达 CRTH2 和 ILT3 的调节性 T 细胞亚群的免疫抑制功能显著受损,这一定程度上不利于哮喘的缓解<sup>[29-30]</sup>。Th17 细胞和调节性 T 细胞似乎是相互制衡的细胞亚群,有研究报道肺组织中 Th17 细胞数量及相关因子的水平增加可导致重症和类固醇抵抗性哮喘的发病<sup>[31-32]</sup>。本研究结果显示,Th17 和调节性 T 细胞在哮喘中均浸润增加,可能与我们未能对哮喘进行分类分析有关。

值得注意的是,哮喘中免疫浸润的分子机制研究有助于生物免疫靶向治疗的开展。Lin 等<sup>[33]</sup>对 8 例哮喘患者的支气管肺泡灌洗液标本进行了单细胞测序,发现 IL18R1 主要在肥大细胞中表达<sup>[33]</sup>,本研究也进一步证实了诱导痰中 IL18R1 与肥大细胞的相关性。CCL22 主要源于 M2 型巨噬细胞和树突状细胞,与 CCR4 结合后可选择性诱导 Th2 细胞迁移到炎症部位,进而增强 Th2 免疫反应<sup>[34]</sup>,本研究也发现 CCL22 与嗜酸性粒细胞的浸润明显相关。CCR7 作为重要的趋化因子受体之一,通过与其配体 CCL19 和 CCL21 结合,诱导树突状细胞、T 细胞

等迁移到病变部位,产生炎症反应<sup>[35-36]</sup>。动物实验表明,CCL19/CCL21-CCR7轴的阻断可显著缓解气道炎症和高反应性<sup>[35]</sup>。这些研究提示细胞因子和免疫细胞可能协同作用,促进哮喘的发生发展。本研究的不足之处在于,仅初步探索了关键免疫基因与免疫细胞之间的关系,仍需更多的实验性研究明确两者之间的关联程度和调控机制。

综上所述,本研究通过生物信息学方法识别出哮喘患者诱导痰中的关键免疫基因 CCL22、CCR7、IL1R2、IL18R1、VEGFA、TNFAIP3 可作为潜在生物标志物,进一步的分析提示关键免疫基因和诱导痰中浸润的免疫细胞间也存在着复杂的相关性。因此,我们推测 CCL22、CCR7、IL1R2、IL18R1、VEGFA、TNFAIP3 可能参与调控了哮喘发病过程中免疫细胞的改变。

## 参考文献:

- [1] 中华医学会呼吸病学分会哮喘学组. 支气管哮喘防治指南(2020年版)[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2020, 43(12): 1023-1048.  
Asthma Group of Chinese Throacic Society. Guidelines for bronchial asthma prevent and management (2020 edition) Asthma Group of Chinese Throacic Society [J]. Chinese Journal of Tuberculosis and Respiratory Diseases, 2020, 43(12): 1023-1048.
- [2] Huang KW, Yang T, Xu JY, et al. Prevalence, risk factors, and management of asthma in China: a national cross-sectional study [J]. *Lancet*, 2019, 394(10196): 407-418.
- [3] Kyvsgaard JN, Brustad N, Hesselberg LM, et al. Key risk factors of asthma-like symptoms are mediated through infection burden in early childhood [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2024, 153(3): 684-694.
- [4] Kyvsgaard JN, Chawes BL, Horner DLG, et al. Risk factors and age-related patterns of asthma-like symptoms in early childhood [J]. *J Allergy Clin Immunol Pract*, 2023, 11(6): 1773-1784.e10.
- [5] Potaczek DP, Miethe S, Schindler V, et al. Role of airway epithelial cells in the development of different asthma phenotypes [J]. *Cell Signal*, 2020, 69: 109523. doi:10.1016/j.cellsig.2019.109523.
- [6] Hammad H, Lambrecht BN. The basic immunology of asthma [J]. *Cell*, 2021, 184(9): 2521-2522.
- [7] Murphy RC, Lai Y, Liu M, et al. Distinct epithelial-innate immune cell transcriptional circuits underlie airway hyperresponsiveness in asthma [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2023, 207(12): 1565-1575.
- [8] Guida G, Riccio AM. Immune induction of airway remodeling [J]. *Semin Immunol*, 2019, 46: 101346. doi:10.1016/j.smim.2019.101346.
- [9] Benson M. Clinical implications of omics and systems medicine: focus on predictive and individualized treatment [J]. *J Intern Med*, 2016, 279(3): 229-240.
- [10] Ray A, Camiolo M, Fitzpatrick A, et al. Are we meeting the promise of endotypes and precision medicine in asthma? [J]. *Physiol Rev*, 2020, 100(3): 983-1017.
- [11] Papi A, Brightling C, Pedersen SE, et al. Asthma [J]. *Lancet*, 2018, 391(10122): 783-800.
- [12] Charles D, Shanley J, Temple SN, et al. Real-world efficacy of treatment with benralizumab, dupilumab, mepolizumab and reslizumab for severe asthma: a systematic review and meta-analysis [J]. *Clin Exp Allergy*, 2022, 52(5): 616-627.
- [13] Brusselle GG, Koppelman GH. Biologic therapies for severe asthma [J]. *N Engl J Med*, 2022, 386(2): 157-171.
- [14] Maglio A, Vitale C, Pellegrino S, et al. Real-life effectiveness of mepolizumab on forced expiratory flow between 25% and 75% of forced vital capacity in patients with severe eosinophilic asthma [J]. *Biomedicines*, 2021, 9(11): 1550. doi:10.3390/biomedicines9111550.
- [15] Feng B, Zhou T, Guo ZY, et al. Comprehensive analysis of immune-related genes for classification and immune microenvironment of asthma [J]. *Am J Transl Res*, 2023, 15(2): 1052-1062.
- [16] Daley D, Park JE, He JQ, et al. Associations and interactions of genetic polymorphisms in innate immunity genes with early viral infections and susceptibility to asthma and asthma-related phenotypes [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2012, 130(6): 1284-1293.
- [17] Lee CG, Link H, Baluk P, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces remodeling and enhances TH2-mediated sensitization and inflammation in the lung [J]. *Nat Med*, 2004, 10(10): 1095-1103.
- [18] Pilette C, Francis JN, Till SJ, et al. CCR4 ligands are up-regulated in the airways of atopic asthmatics after segmental allergen challenge [J]. *Eur Respir J*, 2004, 23(6): 876-884.
- [19] Lo CY, Michaeloudes C, Bhavsar PK, et al. Increased phenotypic differentiation and reduced corticosteroid sensitivity of fibrocytes in severe asthma [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2015, 135(5): 1186-1195.e1-6.
- [20] Camiolo MJ, Zhou XX, Wei Q, et al. Machine learning implicates the IL-18 signaling axis in severe asthma [J]. *JCI Insight*, 2021, 6(21): e149945. doi:10.1172/jci.insight.149945.
- [21] Liu Y, Xu K, Yao Y, et al. Current research into A20 mediation of allergic respiratory diseases and its potential

- usefulness as a therapeutic target [J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1166928. doi:10.3389/fimmu.2023.1166928.
- [22] Poto R, Criscuolo G, Marone G, et al. Human lung mast cells; therapeutic implications in asthma [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23 (22): 14466. doi: 10.3390/ijms232214466.
- [23] Siddiqui S, Bachert C, Bjermer L, et al. Eosinophils and tissue remodeling: relevance to airway disease [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2023, 152(4): 841-857.
- [24] Felton JM, Dorward DA, Cartwright JA, et al. Mcl-1 protects eosinophils from apoptosis and exacerbates allergic airway inflammation [J]. *Thorax*, 2020, 75 (7): 600-605.
- [25] van der Veen TA, de Groot LES, Melgert BN. The different faces of the macrophage in asthma [J]. *Curr Opin Pulm Med*, 2020, 26(1): 62-68.
- [26] Abdelaziz MH, Abdelwahab SF, Wan J, et al. Alternatively activated macrophages; a double-edged sword in allergic asthma [J]. *J Transl Med*, 2020, 18(1): 58. doi:10.1186/s12967-020-02251-w.
- [27] Mamessier E, Nieves A, Lorec AM, et al. T-cell activation during exacerbations: a longitudinal study in refractory asthma [J]. *Allergy*, 2008, 63(9): 1202-1210.
- [28] Smyth LJ, Eustace A, Kolsum U, et al. Increased airway T regulatory cells in asthmatic subjects [J]. *Chest*, 2010, 138(4): 905-912.
- [29] Boonpiyathad T, Capova G, Duchna HW, et al. Impact of high-altitude therapy on type-2 immune responses in asthma patients [J]. *Allergy*, 2020, 75(1): 84-94.
- [30] Boonpiyathad T, Sokolowska M, Morita H, et al. Der p 1-specific regulatory T-cell response during house dust mite allergen immunotherapy [J]. *Allergy*, 2019, 74 (5): 976-985.
- [31] Xie Y, Abel PW, Casale TB, et al. TH17 cells and corticosteroid insensitivity in severe asthma [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2022, 149(2): 467-479.
- [32] Vollmer CM, Dias ASO, Lopes LM, et al. Leptin favors Th17/Treg cell subsets imbalance associated with allergic asthma severity [J]. *Clin Transl Allergy*, 2022, 12(6): e12153. doi:10.1002/ctt2.12153.
- [33] Lin K, Wang T, Tang QQ, et al. IL18R1-related molecules as biomarkers for asthma severity and prognostic markers for idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *J Proteome Res*, 2023, 22(10): 3320-3331.
- [34] Imai T, Nagira M, Takagi S, et al. Selective recruitment of CCR4-bearing Th2 cells toward antigen-presenting cells by the CC chemokines thymus and activation-regulated chemokine and macrophage-derived chemokine [J]. *Int Immunol*, 1999, 11(1): 81-88.
- [35] Nakano K, Whitehead GS, Lyons-Cohen MR, et al. Chemokine CCL19 promotes type 2 T-cell differentiation and allergic airway inflammation [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2024, 153(2): 487-502.e9.
- [36] Fainaru O, Shseyov D, Hantisteanu S, et al. Accelerated chemokine receptor 7-mediated dendritic cell migration in Runx3 knockout mice and the spontaneous development of asthma-like disease [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102(30): 10598-10603.

(编辑:相峰)