



重症哮喘的代谢及细胞特征研究*

江晨蓉¹⁾ 陈智鸿²⁾ 刘宏德^{1)**}⁽¹⁾ 东南大学生物科学与医学工程学院, 数字医学工程全国重点实验室, 南京 210096;⁽²⁾ 复旦大学附属中山医院呼吸与危重医学科, 上海 200032)

摘要 **目的** 哮喘是常见的慢性气道炎症性疾病, 重症哮喘是哮喘诊治中关注的重点。哮喘发病中, 免疫细胞参与并发生改变, 几种脂类代谢物可作为其诊断标志物。本研究在代谢和细胞层面, 探讨了重症哮喘的特征。**方法** 使用多因素统计学分析和独立样本 *t* 检验筛选了重症哮喘 (41 例) 和对照 (18 例) 血液样本中的差异代谢物, 通过 KEGG 富集分析鉴定关键通路, 基于 ROC 曲线进行生物标志物的鉴定; 基于细胞类型注释结果, 识别了血液中免疫细胞的种类和比例 (5 例重症和 3 例对照); 使用单样本基因富集分析 (ssGSEA) 研究了差异代谢通路在单细胞中的特征。**结果** 相比于对照 (健康), 28 种代谢物的丰度在重症哮喘患者血液中增加, 13 种代谢物丰度降低 ($P < 0.05$); 差异代谢物富集于 4 条通路: 鞘脂代谢、甘油磷脂代谢、烟酸和烟酰胺代谢、组氨酸代谢。其中, 有 13 种差异代谢物可以作为重症哮喘诊断的标志物, 如 L-谷氨酸 ($AUC=0.809$)、烟酰胺 ($AUC=0.886$)、植物鞘氨醇 ($AUC=0.882$)、鞘氨醇 ($AUC=0.893$) 等。在单细胞分析中, 鉴定出了 5 种主要细胞类型 (CD4⁺ T 细胞、CD8⁺ T 细胞、NK 细胞、B 细胞和单核细胞), NK 细胞的数量在重症哮喘患者中增加; 重症哮喘具有更加频繁的细胞通讯, 其 CD8⁺ T 细胞与其他细胞通讯密集, 而在健康样本中, 密集通讯的细胞主要为单核细胞。ssGSEA 表明, 重症样本中, 4 条富集了差异代谢物的通路, 在 CD4⁺ T 和 CD8⁺ T 细胞中具有更低的得分 ($P < 0.01$), 推测这些通路相关的基因表达在这两种细胞中被抑制, 被抑制的基因包括 *DGKA*、*NT5C3A* 等, 这些基因与免疫过程相关, 在调节 T 细胞信号转导、活化、分化及免疫应答中发挥关键作用。**结论** L-谷氨酸、烟酰胺、植物鞘氨醇、鞘氨醇可以作为重症哮喘诊断的生物标志物; 重症哮喘相关通路的基因在 CD4⁺ T 和 CD8⁺ T 细胞中被抑制表达。

关键词 重症哮喘, 代谢组, 单细胞转录组, 生物标志物, 细胞类型

中图分类号 Q39, R56

DOI: 10.16476/j.pibb.2024.0021

哮喘是一种复杂的异质性慢性呼吸系统疾病, 受到遗传、环境等多种因素的影响, 哮喘发病时患者通常表现为过度的炎症反应、气道黏液分泌过多以及气道高反应性^[1]。据统计, 世界上约有 10% 的人患有哮喘, 且近年来哮喘的患病率存在上升的趋势^[2]。临床上, 虽然大多数哮喘患者根据全球哮喘倡议 (GINA) 指南采取相应的治疗措施后病情能够得到有效控制, 但仍有 10% 左右的重症哮喘患者经过治疗后无明显改善, 这也是目前临床治疗的难点之一^[3]。因此, 深入了解哮喘尤其是重症哮喘发病的潜在机制以及探索潜在的治疗靶点对于哮喘患者至关重要。

近年来, 随着组学技术的不断发展, 包括转录组学和代谢组学等相关的大量研究得以开展^[4-7], 鉴定哮喘相关的生物标志物可以进一步判断哮喘的

严重程度、细化哮喘分型、研究发病机制等。部分研究基于支气管组织、血液、痰液等代谢组学分析进行了不同哮喘类型的代谢组学研究^[5]。例如, Rago 等^[8]发现, 6 个月大时神经酰胺和鞘脂浓度较低与儿童 3 岁前患哮喘的风险增加有关, 同时在 6 岁时关键磷脂浓度较低与气道阻力增加有关。Jiang 等^[9]通过研究中度和轻症哮喘患者的血浆代谢特征, 确定了区分哮喘患者与健康对照组的主要脂质代谢物磷脂酰乙醇胺 (38 : 1), 分析出磷脂酰乙醇胺 (20 : 0/18 : 1) 和甘油三酸酯 (16 : 0/

* 国家自然科学基金 (82270026) 和江苏省重点研发计划 (BE2022828) 资助项目。

** 通讯联系人。

Tel: 18951637501, E-mail: liuhongde@seu.edu.cn

收稿日期: 2024-01-16, 接受日期: 2024-04-02

16 : 0/18 : 1) 可能与哮喘患者的 IgE 水平有关。Brandsma 等^[10]对哮喘病人的痰液进行脂质组学分析,发现非内源性细胞源性脂质水平较高的痰液脂表型与哮喘严重程度显著加重、肺功能较差和粒细胞计数升高有关。

代谢物水平的改变一定程度上反映了疾病发生发展的过程,可以作为疾病诊断及治疗的依据,与此同时,不同的细胞类型在代谢物水平和代谢途径上存在差异,这也一定程度上影响了疾病的发展。研究表明,哮喘的发病机制由多种细胞驱动。O'Brien 和 Finlay^[11]发现,即使是低丰度的细胞类型,如自然杀伤(NK)细胞,在哮喘等炎症性疾病中也具有独特的代谢特征。还有研究发现,脂质代谢可以影响哮喘的免疫反应,而T细胞可以在激活过程中积累脂质代谢所需的代谢物^[12]。因此,深入理解单细胞水平下的代谢特征对于研究哮喘的发病、诊断及治疗至关重要。

目前已有研究发现了一些可能与哮喘相关的代谢物及细胞类型,但是对于重症哮喘的发病机制仍然有待明确。因此,为了拓宽对重症哮喘中代谢物和细胞特征的理解,本文使用代谢组学和单细胞转录组学进行研究。首先,基于代谢组学研究分析在重症哮喘中的差异代谢物及其作用的代谢通路,进一步建立疾病诊断模型鉴定出关键的差异代谢物作为潜在的生物标志物。然后,基于单细胞转录组学数据注释重症哮喘相关的细胞类型,结合代谢组学中的代谢通路结果,分析单个细胞水平下通路在重症哮喘和对照组之间的活性状态,并识别关键细胞类型及其差异表达的基因,剖析重症哮喘的潜在发病机制。

1 材料与方法

1.1 代谢组分析

1.1.1 样本收集

本研究从上海中山医院收集了重症哮喘病人及对照组的外周血样本,包含41例重度哮喘病人及18例健康人。所有参与者均提供了书面知情同意书,本研究经复旦大学附属中山医院研究伦理委员会批准(No. B: B2018-196R),并根据《赫尔辛基宣言》进行。所有入组患者均接受了标准化肺功能测试,并采集了外周血。人口统计学数据和当前治疗信息均由负责医师获取并审核。

根据GINA指南,纳入标准为成年哮喘患者。纳入标准包括: a. 哮喘患者; b. 可在中山医院获得

肺功能检查(PFT)数据。排除标准如下: a. 年龄小于18岁; b. 过去4周内呼吸道感染; c. 过去4周内哮喘加重; d. 慢性阻塞性肺疾病(COPD)、肺炎、肺癌、呼吸衰竭、活动性肺结核、支气管扩张、肺栓塞、尘肺、肺水肿、间质性肺疾病或其他合并肺部疾病; e. 仅有限制性通气障碍; f. 在过去两周内系统使用类固醇或免疫力低下; g. 有恶性疾病、肾功能障碍、肝功能障碍史; h. 妊娠。

通过面对面的访谈以及电子病历的查阅,收集参与研究者的临床数据。这些数据包括了人口统计学信息(例如年龄、性别、体重指数(BMI))、吸烟习惯、以及其他过敏性疾病的情况。定义吸烟者为在过去一年内吸烟量达到或超过100支,或者连续一年以上每周至少吸两支烟的人。表1是重症哮喘患者和健康对照组在人口统计学和临床特征方面的具体数据。

Table 1 Demographic and clinical characteristics of the cohort of patients with severe asthma and normal (n=59)

		Severe asthma (n=41)	Normal (n=18)
Gender	Male	24	12
	Female	17	6
Age/year		54.5	46.9
BMI/(kg·m ⁻²)		25.2	NA
Smoking status	Non-Smoker	31 (75.61%)	18 (100%)
	Ex-smoker	7 (17.07%)	0 (0%)
Recently smoked		3 (7.32%)	0 (0%)
Other allergies	Yes	31 (75.61%)	0 (0%)
	No	10 (24.39)	18 (100%)

1.1.2 数据预处理

基于液相色谱-质谱联用(LC-MS)技术,通过沃特世液相色谱-质谱联用仪,对生物样本进行定量分析,收集的数据涉及离子的精确质量/电荷比(*m/z*)和相应的信号强度(离子流强度)。然后通过将实验数据与已知代谢物数据库进行比对,并结合代谢物标准品的对照分析以及多维统计分析方法,实现代谢物的鉴定与定量分析。基于人类代谢组数据库(HMDB)^[13]和京都基因和基因组数据库(KEGG)^[14]对代谢物进行映射,映射结果以KEGG数据库中的标签为基准,共得到223个代谢物。

1.1.3 差异代谢物筛选

对重症哮喘和对照组进行主成分分析(PCA),

将样本间的分布情况可视化。然后,使用正交偏最小二乘判别分析(OPLS-DA)进一步区分组间差异,并计算VIP(variable importance in the projection)值评估代谢物在分组中的重要程度,将结果进行可视化。进一步,使用独立样本 t 检验计算重症哮喘病人和对照组之间代谢物水平的差异,同时还计算了组间的倍数变化(Fold Change)。将差异代谢物的阈值设置为 $P<0.05$ 和 $VIP\geq 1$ 进行筛选,作为筛选重症哮喘的候选生物标志物。

1.1.4 代谢通路分析及生物标志物的鉴定

使用基于Web的Metaboanalyst5.0^[15](<https://www.metaboanalyst.ca/MetaboAnalyst/ModuleView.xhtml>)进行代谢通路分析,选取内置的KEGG数据集作为参考数据集,认为富集分析结果中 $P<0.05$ 的通路是可能与重症哮喘生物学过程相关的潜在代谢通路。为了选择在重症哮喘中具有潜在生物学意义的代谢物,使用受试者操作特征(receiver operating characteristic, ROC)曲线进行评估,选取曲线下面积(AUC) >0.8 的代谢物作为潜在的生物标志物进行后续分析,并进行可视化。

1.2 单细胞转录组分析

1.2.1 数据收集及去批次

本研究采用的数据集来Chen等^[16]上传在Gene Expression Omnibus(GEO)数据库中的数据集GSE172495,该数据集包括5名重症哮喘患者和3名健康对照组的外周血单细胞数据。下载的GSE172495数据集在R软件中使用Seurat包^[17](版本4.2.3)进行处理。原始数据中包含有4 683个细胞,为了进行质量控制,我们考虑了每个细胞的基因数量、特征以及每个细胞内线粒体基因的比例,将细胞的筛选标准设置为:nFeature_RNA $<2\ 000$ 、nCount_RNA $<3\ 000$ 、percent.mt <5 。基于上述结果,鉴定出2 000个高可变基因,同时对这些基因的表达水平进行缩放。使用FindIntegrationAnchors函数识别锚点,去除样本间的批次效应。在PCA中,选择30个主成分进行后续分析,使用UMAP算法进行降维。为了进行细胞的分簇,使用FindNeighbors和FindCluster函数进行重新聚类,将维度设置为30、分辨率设置为0.6。然后,使用CellMarker2.0数据库(<http://117.50.127.228/CellMarker/index.html>)^[18]结合Seurat分簇结果对集群进行注释,通过细胞类型特有的marker基因进行细胞类型注释,使用点图

可视化每个簇的基因表达。

1.2.2 通路富集分析

为了了解目标基因集的潜在功能,使用R包clusterProfiler(版本4.7.1)进行富集分析。对于单样本基因集富集分析(ssGSEA),通过gsea-msigdb.org^[19]网站(<https://www.gsea-msigdb.org/gsea/index.jsp>)上提供的KEGG数据库,计算基因集在不同细胞类型中的通路得分。通过分析代谢通路基因集,识别在重症哮喘中发生差异表达的基因,并推测这些基因可能在相应的代谢通路中发挥关键作用。

1.2.3 细胞间通讯分析

在识别了重症哮喘和对照组中的细胞类型后,应用CellChat^[20](版本1.6.1)分析细胞间的通信情况。从Seurat对象创建一个新的CellChat对象,将CellChatDB的人类受体配体互作数据集设置为参考数据库。使用10%的截断平均值计算细胞间的通信概率,过滤掉一部分细胞间通信结果,将min.cells设置为5。最后,将相互作用的数量及强度可视化,以显示两组间的细胞间通信网络和从每个细胞簇发送的信号。

2 结 果

2.1 筛选差异代谢物

通过LC-MS/MS技术对41例重症哮喘和18例健康的代谢组血液样本进行代谢组学分析,为了准确地识别和检索相关代谢物的信息,本文采用人类代谢组数据库、PubChem数据库和KEGG数据库对代谢物进行了详细的映射工作。在映射过程中,依据KEGG数据库中的标签作为标准,剔除了那些在KEGG中没有映射结果的代谢物,并删除了重复的条目。经过这些步骤,最终确定了223个代谢物作为研究对象。表2展示了这些代谢物的一部分标签映射情况。基于这些代谢物的特征,我们进行了多因素统计分析。重症哮喘和对照组之间的PCA结果显示,前两个主成分得分分别为10%和7.9%(图1a),两组之间存在显著差异。在OPLS-DA模型(图1b)中,重症哮喘和对照组具有显著的分群效果,根据 $VIP\geq 1$ 和 $P<0.05$ 的标准对代谢物进行筛选后,筛选出了41种显著差异表达的代谢物,具体来说,有28种代谢物在重症哮喘病例中呈现上调,而13种代谢物表现出下调。表3详细列出了一部分代谢物的VIP评分、Fold Change值、 P 值以及它们的表达变化趋势。同时,根据KEGG

Table 2 Metabolite label mapping			
Query	HMDB	PubChem	KEGG
3-Methylxanthine	HMDB0001886	70639	C16357
Adenine	HMDB0000034	190	C00147
Alpha-methylstyrene	HMDB0059899	7407	C14395
Benomyl	HMDB0031767	28780	C10896
Ethylbenzene	HMDB0059905	7500	C07111
L-glutamic acid	HMDB0000148	33032	C00025
L-palmitoylcarnitine	HMDB0000222	11953816	C02990
Niacinamide	HMDB0001406	936	C00153
Octadecanamide	HMDB0034146	31292	C13846
Oleamide	HMDB0002117	5283387	C19670
Phytosphingosine	HMDB0004610	122121	C12144
Sphinganine	HMDB0000269	91486	C00836
Taurine	HMDB0000251	1123	C00245

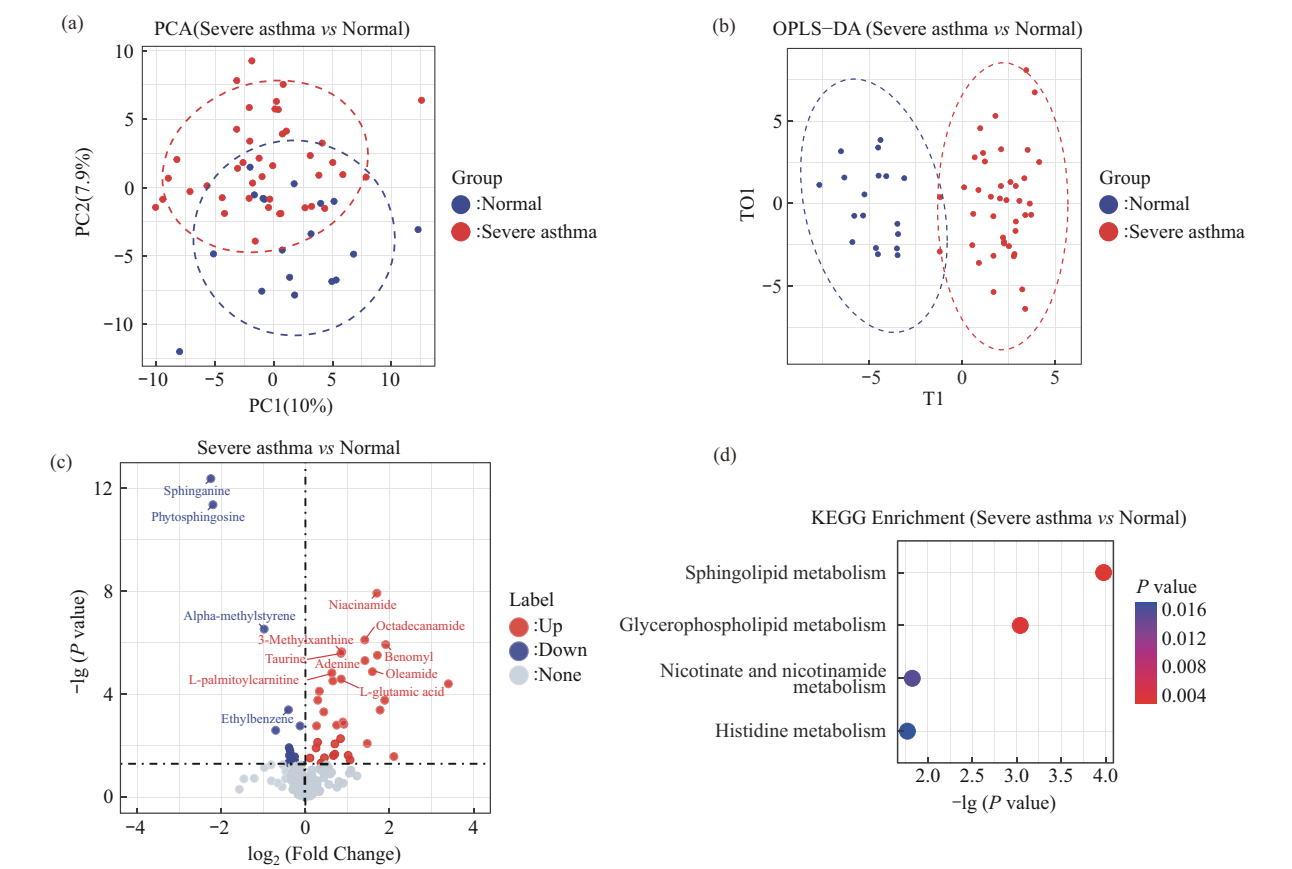


Fig. 1 Screening of differential metabolites in severe asthma

(a) Distribution of PCA samples in severe asthma and normal; (b) OPLS-DA plot in severe asthma and normal; (c) metabolite volcano plot in severe asthma and normal; (d) KEGG analysis of pathway enrichment of differential metabolites.

Table 3 Differential metabolite screening

KEGG	Fold Change	VIP	P value	Label
C16357	1.822 834 289	2.215 059 715	2.24×10^{-6}	Up
C00147	2.669 510 366	2.092 032 374	4.89×10^{-6}	Up
C14395	0.506 772 83	3.182 700 008	2.93×10^{-7}	Down
C10896	3.756 799 532	2.263 378 642	1.17×10^{-6}	Up
C07111	0.756 187 375	2.783 411 5	0.000 401	Down
C00025	1.804 106 703	2.306 508 435	2.55×10^{-5}	Up
C02990	1.547 002 814	2.037 251 484	1.47×10^{-5}	Up
C00153	3.251 084 409	2.507 709 627	1.18×10^{-8}	Up
C13846	2.660 957 635	2.182 903 016	7.69×10^{-7}	Up
C19670	3.016 852 468	2.056 029 326	1.32×10^{-5}	Up
C12144	0.217 882 259	3.177 975 504	4.31×10^{-12}	Down
C00836	0.210 318 302	3.310 940 609	4.17×10^{-13}	Down
C00245	1.793 335 195	2.196 905 911	2.56×10^{-6}	Up

数据库映射到的223个代谢物及筛选的41个差异代谢物绘制火山图(图1c)。然后,对差异代谢物进行了富集分析,以进一步探讨上述结果的功能意义,结果如图1d所示,代谢物主要参与鞘脂代谢(sphingolipid metabolism, $P=0.0001$)、甘油磷脂代谢(glycerophospholipid metabolism, $P=0.0009$)、烟酸和烟酰胺代谢(nicotinate and nicotinamide metabolism, $P=0.015$)、组氨酸代谢(histidine metabolism, $P=0.017$)等过程。

2.2 鉴定关键的差异代谢物作为潜在的生物标志物

针对重症哮喘和对照组之间的差异代谢物做进一步筛选,ROC分析如图2a所示,筛选出 $AUC>0.8$ 的差异代谢物作为生物标志物。ROC分析表明,共有13个差异代谢物,生物标志物的具体信息如图2b所示,其中上调的生物标志物有9个,包括烟酰胺(niacinamide)、油酰胺(oleamide)、十八酰胺(octadecanamide)、3-甲基黄嘌呤(3-methylxanthine)、牛磺酸(taurine)、苯菌灵(benomyl)、腺嘌呤(adenine)、L-棕榈酰肉碱(L-palmitoylcarnitine)、L-谷氨酸(L-glutamic acid),下调的生物标志物有4个,包括 α -甲基苯乙烯(alpha-methylstyrene)、鞘氨醇(sphinganine)、植物鞘氨醇(phytosphingosine)、乙基苯(ethylbenzene)。根据结果,我们认为这13种差异代谢物均具有较高的重症哮喘诊断能力。结合通路

富集结果和生物标志物的鉴定结果发现,鞘氨醇和植物鞘氨醇参与鞘脂代谢,烟酰胺参与烟酸和烟酰胺代谢,L-谷氨酸参与组氨酸代谢,可以认为这些生物标志物在重症哮喘及其相关代谢通路中发挥潜在作用。

2.3 细胞类型注释

对重症哮喘和对照组的8组样本进行UMAP降维,结果如图3a所示,原始的样本分布存在明显的批次效应,基于Seurat包进行CCA算法对细胞类型进行降维和校正,有效地去除了样本间的批次效应。通过Seurat包对校正后的细胞进行分簇并得到5个细胞簇,基于Cellmarker2.0数据库进行细胞类型注释,通过气泡图可视化每种细胞类型的marker基因的表达(图3b),即 $IL7R$ 、 LTB 、 $CCR7$ ($CD4^+$ T细胞)、 $CD3E$ 、 $CD3D$ ($CD8^+$ T细胞)、 $GNLY$ 、 $NKG7$ (NK细胞)、 $MS4A1$ 、 $CD79A$ 、 $CD79B$ (B细胞)、 LYZ 、 $FCGR3A$ 、 $CST3$ (单核细胞),5种细胞类型的分布如图3c所示。图3d分析了细胞类型在重症哮喘和对照组中的占比情况,其中 $CD4^+$ T细胞占比超过50%, $CD8^+$ T细胞和NK细胞占比也较高。进一步分析发现,重症哮喘中NK细胞占比相比于对照组中增多。此外,我们推断细胞间通讯网络(图3e),结果显示,在重症哮喘中 $CD8^+$ T细胞和其他4种细胞间的通讯发生的次数更加多,而其余的细胞类型间的相互作用相对较少,在对照组中单核细胞和其他4种细胞间的

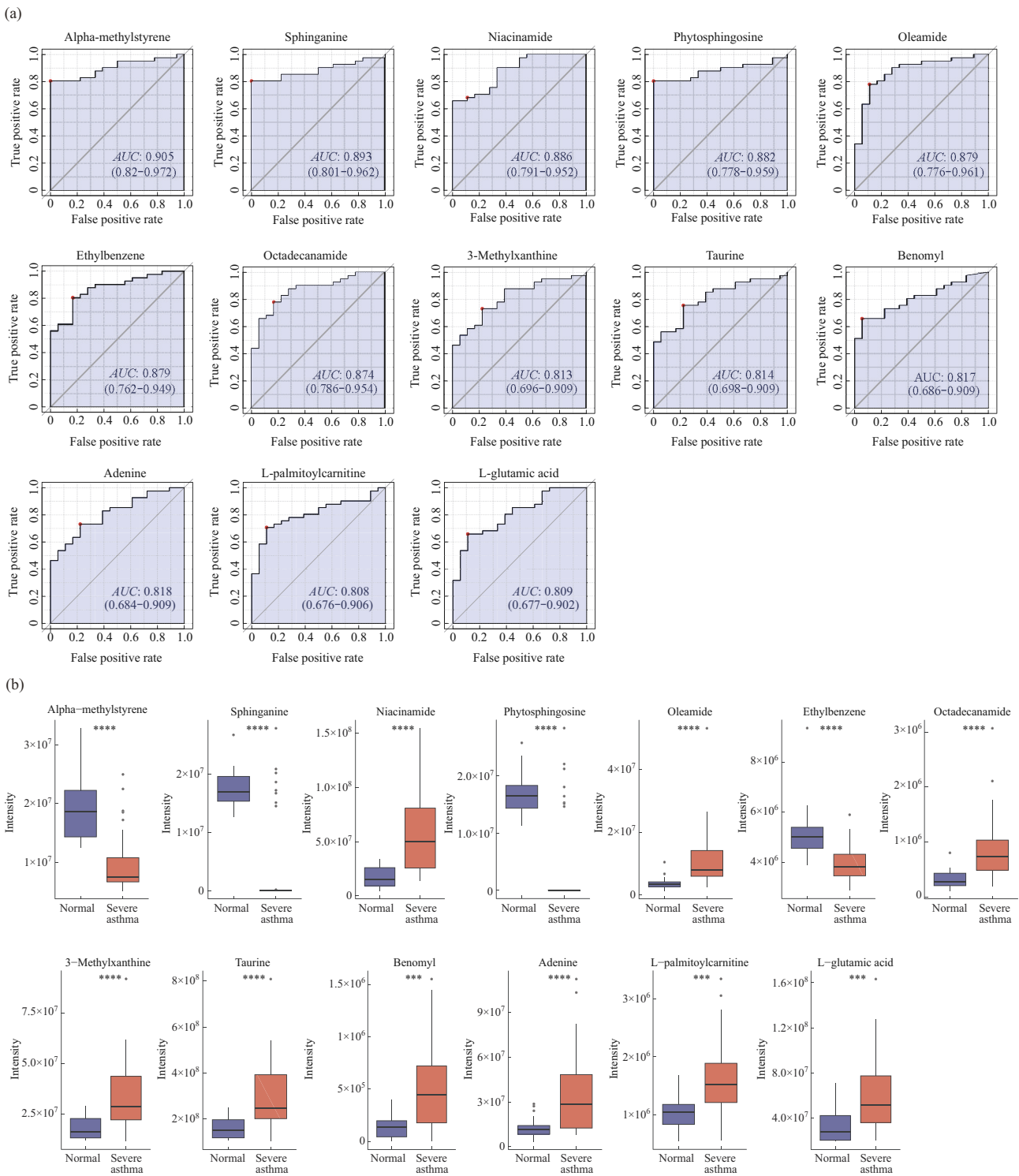


Fig. 2 Identification of biomarkers in severe asthma

(a) ROC curves of biomarkers in severe asthma and normal ($AUC>0.8$); (b) box plots of expression of biomarkers in severe asthma and normal. *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$.

通讯更突出，且其余的细胞类型间亦是存在较少的相互作用。进一步分析发现，重症哮喘的细胞相互作用的数量和强度相比于对照组而言较为明显。因此，重症哮喘中的免疫细胞通讯更为频繁，可以推测出重症哮喘中存在更多的炎症反应。

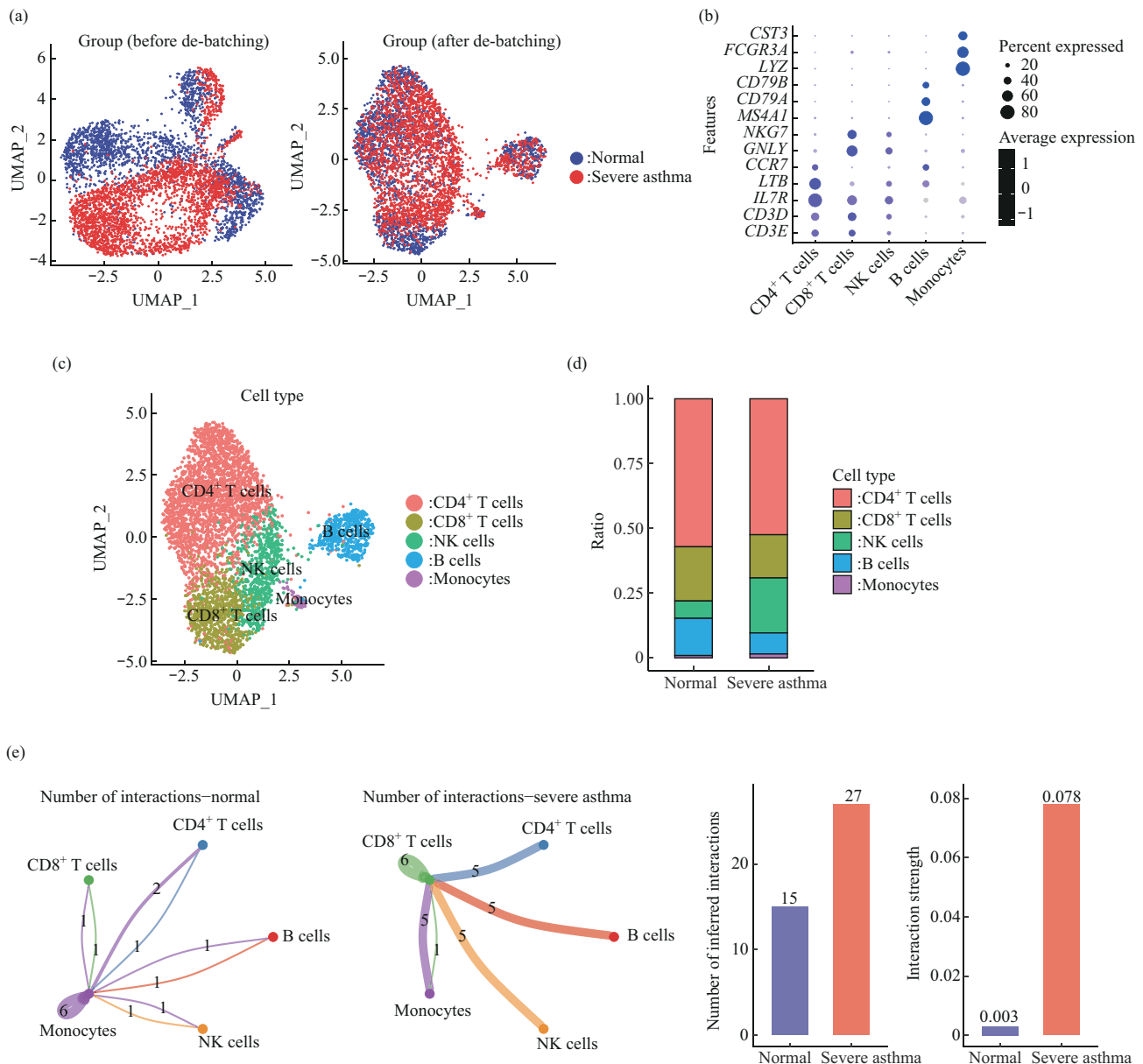


Fig. 3 Cell type annotations in severe asthma and normal

(a) UMAP plots before and after Seurat de-batching; (b) dot plot of the average expression and the percentage of cell type-specific genes; (c) UMAP plot of cell type annotations; (d) stacked bar graph of cell type occupancy in severe asthma and normal; (e) network plots of intercellular communication in severe asthma and normal, histogram of the number and intensity of inter-cellular interactions compared between severe asthma and normal.

2.4 识别重症哮喘中的关键细胞类型

为了深入探究重症哮喘在单细胞层面的代谢特征,图4展示了单细胞水平上的单样本基因集富集分析结果。通过比较重症哮喘患者和对照组的代谢通路得分发现:在鞘脂代谢、甘油磷脂代谢通路中,CD4⁺ T细胞和CD8⁺ T细胞的活性显著降低;

在烟酸和烟酰胺代谢通路中,CD4⁺ T细胞和CD8⁺ T细胞的活性显著降低,同时B细胞和单核细胞的活性也较为显著;在组氨酸代谢通路中,CD4⁺ T细胞和CD8⁺ T细胞的活性也存在降低的情况,且NK细胞和B细胞的活性较为显著。综合这4条代谢通路中表现显著的细胞类型,我们可以推断,在

CD4⁺ T细胞和CD8⁺ T细胞中鞘脂代谢通路、甘油磷脂代谢通路、烟酸和烟酰胺代谢通路以及组氨酸

代谢通路的活性抑制, 可能是重症哮喘发病机制中的一个重要特征。

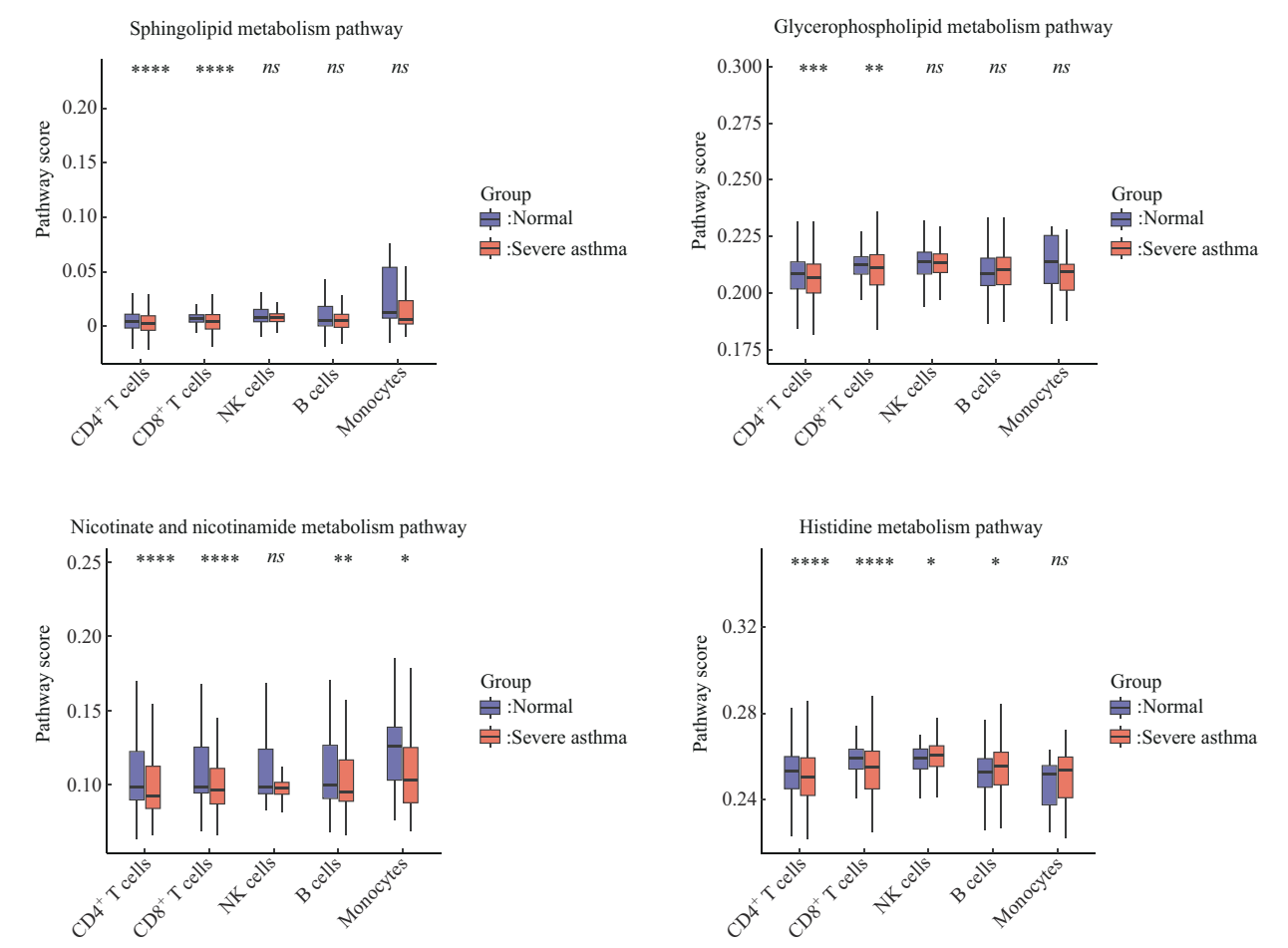


Fig. 4 Box plots of metabolic pathways in different cell types in severe asthma and normal
ns: P≥0.05; * P<0.05; ** P<0.01; *** P<0.001; **** P<0.000 1.

2.5 重症哮喘细胞类型的差异基因分析

通过分析KEGG数据库中的代谢通路基因集, 确定在重症哮喘患者中差异表达的基因, 这些基因可能对代谢通路有重要作用, 并可能影响疾病进展。结果(图5)发现在重症哮喘患者的CD4⁺ T细胞和CD8⁺ T细胞中, 特定代谢通路中的一些基因表达水平发生了显著变化。在甘油磷脂代谢通路中, 观察到5个基因(*DGKA*、*DGKD*、*DGKZ*、*DGKH*、*CDIPT*) 在重症哮喘患者的CD4⁺ T细胞和

CD8⁺ T细胞中均表现出差异表达。在烟酸和烟酰胺代谢通路中, *NT5C3A* 和 *NMRK1* 在同样的细胞类型中也有显著的差异表达。值得注意的是, 先前在烟酸和烟酰胺代谢通路的研究中, 已经发现烟酰胺可能作为重症哮喘的一个生物标志物。此外, 在组氨酸代谢通路中, *LCMT1* 和 *TRMT11* 在重症哮喘患者的CD4⁺ T细胞和CD8⁺ T细胞中同样显示出了显著的差异表达。

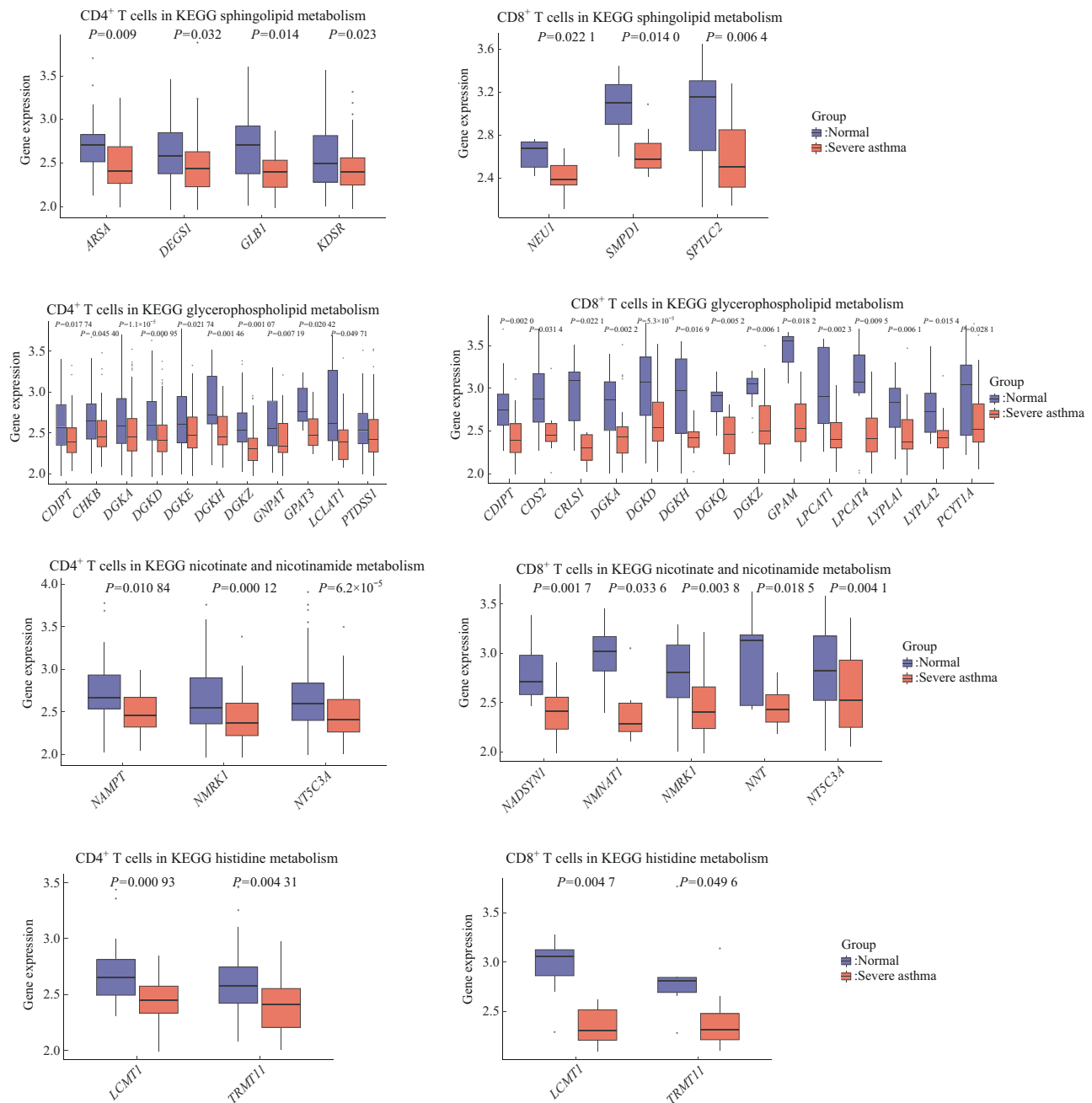


Fig. 5 Differential gene expression box plots in CD4⁺ T cells and CD8⁺ T cells between severe asthma and normal

3 讨 论

综上所述, 本文针对重症哮喘和对照组进行了代谢组学和单细胞转录组学研究, 以探讨代谢物及细胞类型在重症哮喘发病中的潜在作用。在代谢组研究中, 发现了一组与重症哮喘相关的差异代谢物, 经过通路分析发现, 这些差异代谢产物在功能上与鞘脂代谢、甘油磷脂代谢、烟酸和烟酰胺代谢、组氨酸代谢相关。

鞘脂是一种复杂多样的脂类, 其鞘脂碱基、脂肪酸和头部基团存在大量变化。鞘脂是细胞膜的主要组成成分, 参与信号转导、细胞识别和炎症反应等过程, 鞘脂结构和功能的独特性导致其在生物学过程的复杂性^[21]。值得一提的是, 研究发现, 鞘脂代谢是细胞重要的代谢活动, 在哮喘中发挥关键作用, 鞘脂代谢异常可能与气道高反应性的发生和加重相关, 而气道高反应性是哮喘发病的主要特征之一, 这也是目前哮喘相关研究中关注较多的脂质

之一^[22-23]。甘油磷脂是机体中普遍存在的一种脂质,其在细胞膜中占主导地位,参与信号传递、磷酸合成等过程,研究表明甘油磷脂相关的代谢物可能与哮喘具有临床相关性,其相关的代谢物有望进一步开发成可靠的生物标志物^[24]。烟酸和烟酰胺都是维生素B3的形式,在人体中参与能量代谢过程,其抗氧化作用有助于维持细胞的正常生理功能^[25]。组氨酸是构成组蛋白和血红蛋白的重要氨基酸,参与蛋白质的合成和修复、组胺代谢、生物活性反应等过程。此前已有文献研究甘油磷脂代谢、烟酸和烟酰胺代谢、组氨酸代谢参与不同哮喘表型的发病机制^[26]。

根据研究结果,我们推测鞘脂代谢通路、甘油磷脂代谢通路、烟酸和烟酰胺代谢通路以及组氨酸代谢通路在CD4⁺T细胞和CD8⁺T细胞中存在显著变化,从侧面反映了代谢通路与细胞的作用在重症哮喘中的表现。CD4⁺T细胞被认为深入参与了哮喘的发病机制,且是哮喘表型的重要决定因素。由CD4⁺T细胞决定的哮喘表型包括Th2型哮喘(即嗜酸性粒细胞性哮喘)和非Th2型哮喘(即中性粒细胞哮喘)。二者在发病机制上存在差异性,Th2型哮喘主要以Th2细胞为主,通过分泌高水平的白介素(IL)-4、IL-5和IL-13影响发病,非Th2哮喘是通过中性粒细胞浸润,以Th1和Th17细胞分泌高水平的 γ 干扰素(IFN- γ)和IL-17为主要特征^[27]。与此同时,也有文献表明,CD8⁺T细胞能够产生IL-5或IL-13,预示着CD8⁺T细胞在哮喘加重中可能存在一些潜在作用^[28]。

本文发现*DGKA*、*NT5C3A*等基因在CD4⁺T和CD8⁺T细胞中表达下调。已有文献表明,*DGKA*基因编码的蛋白质二酰基甘油激酶 α (DGK α)在T细胞中起着关键作用,尤其是在调节T细胞的信号转导和免疫反应方面,DGK α 通过调节T细胞受体(TCR)信号转导,影响T细胞的活化、分化和功能,从而在免疫应答中发挥重要作用^[29],同时,DGK α 在肿瘤免疫治疗中也具有潜在的重要性,可能作为治疗靶点来调节T细胞对肿瘤的反应^[30]。此外,研究表明,*NT5C3A*基因在调节T细胞的炎症反应中发挥作用,尤其是在抑制T细胞产生的促炎细胞因子方面^[31]。这些发现对于理解*DGKA*、*NT5C3A*等基因在免疫系统中的作用具有重要意义。

随着近年来组学技术的研发和进步,单细胞代谢组学技术正处于发展阶段,该技术基于单细胞水

平对代谢物进行定量分析,有望深入研究代谢物及其通路在不同细胞类型之间针对疾病所发挥的作用,同时也是研究细胞异质性的有力工具^[32]。但是目前受限于单细胞代谢组学技术的灵敏度和特异性、数据库信息不完备等因素,其在哮喘相关研究中的应用及有效发现都比较少。此外,单一的组学解释哮喘的发病机制未免存在一些局限性,从基因组学、转录组学、蛋白质组学、表观基因组学、微生物组学等不同角度联合开展的多组学研究,可以更好地理解哮喘这一高度异质性和复杂性疾病的发病机制,提高哮喘的诊断水平^[33]。

4 结 论

本研究对重症哮喘患者和健康对照的血液样本进行了代谢组学分析表明,影响重症哮喘患者的差异代谢物主要集中在鞘脂代谢、甘油磷脂代谢、烟酸和烟酰胺代谢以及组氨酸代谢这4条通路,其中L-谷氨酸、烟酰胺、植物鞘氨醇和鞘氨醇等13种代谢物被确认为重症哮喘的潜在生物标志物。单细胞转录组分析鉴定了5种主要细胞类型,包括CD4⁺T细胞、CD8⁺T细胞、NK细胞、B细胞和单核细胞,并发现重症哮喘患者中NK细胞的数量增加,且CD8⁺T细胞与其他细胞的通讯更为频繁。此外,在CD4⁺T和CD8⁺T细胞中观察到与重症哮喘患者中差异代谢物相关的四条通路表达下调,这表明这些通路相关的基因(如*DGKA*和*NT5C3A*)可能在这些细胞中受到了抑制。这些发现加深了对重症哮喘患者代谢和细胞特征的理解,为后续的研究提供了基础。

参 考 文 献

- [1] Sockrider M, Fussner L. What is asthma?. Am J Respir Crit Care Med, 2020, **202**(9): P25-P26
- [2] García-Marcos L, Chiang, Asher M I, et al. Asthma management and control in children, adolescents, and adults in 25 countries: a Global Asthma Network Phase I cross-sectional study. Lancet Glob Health, 2023, **11**(2): e218-e228
- [3] Levy M L, Bacharier L B, Bateman E, et al. Key recommendations for primary care from the 2022 Global Initiative for Asthma (GINA) update. NPJ Prim Care Respir Med, 2023, **33**(1): 7
- [4] Xu S, Panettieri R A, Jude J. Metabolomics in asthma: a platform for discovery. Mol Aspects Med, 2022, **85**: 100990
- [5] Wang C, Jiang S, Zhang S, et al. Research progress of metabolomics in asthma. Metabolites, 2021, **11**(9): 567
- [6] Pité H, Morais-Almeida M, Rocha S M. Metabolomics in asthma: where do we stand?. Curr Opin Pulm Med, 2018, **24**(1): 94-103

- [7] Kozik A J, Holguin F, Segal L N, *et al.* Microbiome, metabolism, and immunoregulation of asthma: an American thoracic society and national institute of allergy and infectious diseases workshop report. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2022, **67**(2): 155-163
- [8] Rago D, Pedersen C T, Huang M, *et al.* Characteristics and mechanisms of a sphingolipid-associated childhood asthma endotype. *Am J Respir Crit Care Med*, 2021, **203**(7): 853-863
- [9] Jiang T, Dai L, Li P, *et al.* Lipid metabolism and identification of biomarkers in asthma by lipidomic analysis. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*, 2021, **1866**(2): 158853
- [10] Brandsma J, Schofield J P R, Yang X, *et al.* Stratification of asthma by lipidomic profiling of induced sputum supernatant. *J Allergy Clin Immunol*, 2023, **152**(1): 117-125
- [11] O'Brien K L, Finlay D K. Immunometabolism and natural killer cell responses. *Nat Rev Immunol*, 2019, **19**(5): 282-290
- [12] Lim S A, Su W, Chapman N M, *et al.* Lipid metabolism in T cell signaling and function. *Nat Chem Biol*, 2022, **18**: 470-481
- [13] Wishart D S, Guo A, Oler E, *et al.* HMDB 5.0: the human metabolome database for 2022. *Nucleic Acids Res*, 2022, **50**(D1): D622-D631
- [14] Kanehisa M, Sato Y, Kawashima M, *et al.* KEGG as a reference resource for gene and protein annotation. *Nucleic Acids Res*, 2016, **44**(D1): D457-D462
- [15] Pang Z, Chong J, Zhou G, *et al.* MetaboAnalyst 5.0: narrowing the gap between raw spectra and functional insights. *Nucleic Acids Res*, 2021, **49**(W1): W388-W396
- [16] Chen A, Diaz-Soto M P, Sanmamed M F, *et al.* Single-cell characterization of a model of poly I: C-stimulated peripheral blood mononuclear cells in severe asthma. *Respir Res*, 2021, **22**(1): 122
- [17] Butler A, Hoffman P, Smibert P, *et al.* Integrating single-cell transcriptomic data across different conditions, technologies, and species. *Nat Biotechnol*, 2018, **36**(5): 411-420
- [18] Hu C, Li T, Xu Y, *et al.* CellMarker 2.0: an updated database of manually curated cell markers in human/mouse and web tools based on scRNA-seq data. *Nucleic Acids Res*, 2023, **51**(D1): D870-D876
- [19] Liberzon A, Birger C, Thorvaldsdóttir H, *et al.* The Molecular Signatures Database (MSigDB) hallmark gene set collection. *Cell Syst*, 2015, **1**(6): 417-425
- [20] Jin S, Guerrero-Juarez C F, Zhang L, *et al.* Inference and analysis of cell-cell communication using CellChat. *Nat Commun*, 2021, **12**(1): 1088
- [21] Canals D, Clarke C J. Compartmentalization of sphingolipid metabolism: implications for signaling and therapy. *Pharmacol Ther*, 2022, **232**: 108005
- [22] Bahlas S, Damiani L A, Al-Hazmi A S, *et al.* Decoding the role of sphingosine-1-phosphate in asthma and other respiratory system diseases using next generation knowledge discovery platforms coupled with luminex multiple analyte profiling technology. *Front Cell Dev Biol*, 2020, **8**: 444
- [23] Guo C, Sun L, Zhang L, *et al.* Serum sphingolipid profile in asthma. *J Leukoc Biol*, 2021, **110**(1): 53-59
- [24] Wang S, Tang K, Lu Y, *et al.* Revealing the role of glycerophospholipid metabolism in asthma through plasma lipidomics. *Clin Chim Acta*, 2021, **513**: 34-42
- [25] Chini C C S, Zeidler J D, Kashyap S, *et al.* Evolving concepts in NAD⁺ metabolism. *Cell Metab*, 2021, **33**(6): 1076-1087
- [26] Liu Y, Zhang X, Zhang L, *et al.* Sputum metabolomic profiling reveals metabolic pathways and signatures associated with inflammatory phenotypes in patients with asthma. *Allergy Asthma Immunol Res*, 2022, **14**(4): 393-411
- [27] Robinson D S. The role of the T cell in asthma. *J Allergy Clin Immunol*, 2010, **126**(6): 1081-1091; quiz 1092-1093
- [28] Gelfand E W, Dakhama A. CD8⁺ T lymphocytes and leukotriene B₄: novel interactions in the persistence and progression of asthma. *J Allergy Clin Immunol*, 2006, **117**(3): 577-582
- [29] Sakane F, Hoshino F, Ebina M, *et al.* The roles of diacylglycerol kinase α in cancer cell proliferation and apoptosis. *Cancers*, 2021, **13**(20): 5190
- [30] Fu L, Li S, Xiao W, *et al.* DGKA mediates resistance to PD-1 blockade. *Cancer Immunol Res*, 2021, **9**(4): 371-385
- [31] Al-Haj L, Khabar K S A. The intracellular pyrimidine 5'-nucleotidase NT5C3A is a negative epigenetic factor in interferon and cytokine signaling. *Sci Signal*, 2018, **11**(518): eaal2434
- [32] Vandereyken K, Sifrim A, Thienpont B, *et al.* Methods and applications for single-cell and spatial multi-omics. *Nat Rev Genet*, 2023, **24**(8): 494-515
- [33] Abdel-Aziz M I, Vijverberg S J H, Neerincx A H, *et al.* A multi-omics approach to delineate sputum microbiome-associated asthma inflammatory phenotypes. *Eur Respir J*, 2022, **59**(1): 2102603

Metabolic and Cellular Characterization of Severe Asthma*

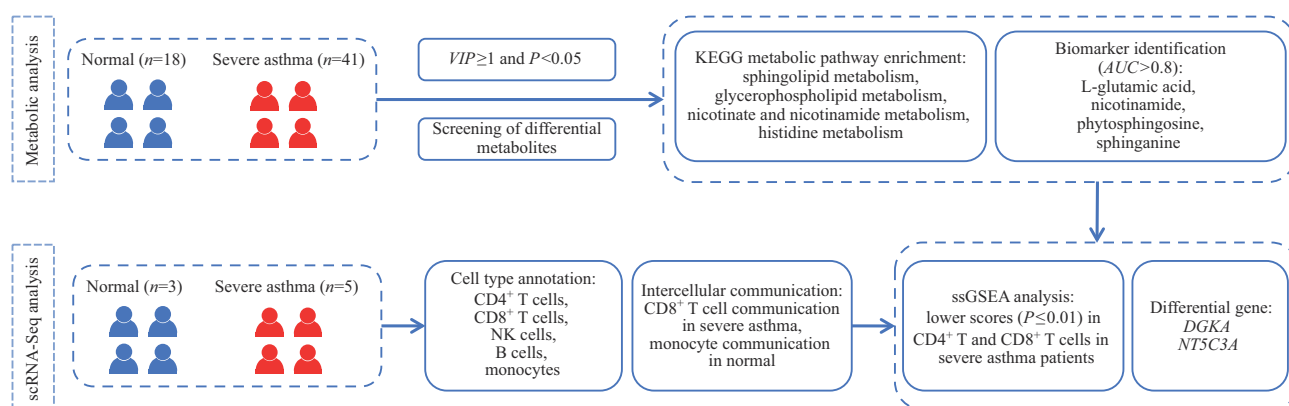
JIANG Chen-Rong¹⁾, CHEN Zhi-Hong²⁾, LIU Hong-De^{1)**}

⁽¹⁾State Key Laboratory of Digital Medical Engineering, School of Biological Science and Medical Engineering,

Southeast University, Nanjing 210096, China;

⁽²⁾Department of Respiratory and Critical Care Medicine, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China)

Graphical abstract



Abstract Objective Asthma is a common chronic inflammatory airway disease, and severe asthma poses a significant challenge in its diagnosis and management. Immune cells are involved in and altered by asthma pathogenesis, and several lipid metabolites can serve as diagnostic markers for the disease. In this study, we investigated the characterization of severe asthma at the metabolic and cellular level. **Methods** Differential metabolites in blood samples from severe asthma (41 cases) and controls (18 cases) were screened using multifactorial statistical analysis and independent samples *t*-tests; key pathways were identified by KEGG enrichment analysis, and biomarkers were characterized based on ROC curves; immune cell types and proportions in the blood were identified based on the results of cell-type annotations (5 severe and 3 control cases); and single-sample Gene Enrichment Analysis (ssGSEA) to investigate the characterization of differential metabolic pathways in single cells. **Results** Compared with controls, the abundance of 28 metabolites was increased and the abundance of 13 metabolites was decreased in the blood of patients with severe asthma ($P < 0.05$); the differential metabolites were enriched in 4 pathways: sphingolipid metabolism, glycerophospholipid metabolism, nicotinate and nicotinamide metabolism, and histidine metabolism. Among them, 13 differential metabolites could be used as biomarkers for the diagnosis of severe asthma, including L-glutamic acid ($AUC=0.809$), nicotinamide ($AUC=0.886$), phytosphingosine ($AUC=0.882$), and sphinganine ($AUC=0.893$). In single-cell transcriptome analysis,

* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (82270026) and the Key Research and Development Program in Jiangsu Province (BE2022828).

** Corresponding author.

Tel: 86-18951637501, E-mail: liuhongde@seu.edu.cn

Received: January 16, 2024 Accepted: April 2, 2024

5 key cell types were identified: CD4⁺ T cells, CD8⁺ T cells, NK cells, B cells, and monocytes. The number of NK cells was increased in patients with severe asthma, and severe asthma exhibited more frequent cellular communication, particularly dense communication between CD8⁺ T cells and other cell types. In healthy samples, monocytes were the primary cells engaging in dense communication. Single-sample gene enrichment analysis (ssGSEA) showed that 4 pathways enriched for differential metabolites had lower scores ($P < 0.01$) in CD4⁺ T and CD8⁺ T cells in severe patients, and it was hypothesized that the expression of genes associated with these pathways was suppressed in these two types of cells. The suppressed genes included *DGKA* and *NT5C3A*, which are associated with immune processes. We observed that these genes play key roles in the regulation of T cell signaling, activation, differentiation, and immune responses. **Conclusion** L-glutamic acid, nicotinamide, phytosphingosine, and sphinganine can be used as biomarkers for the diagnosis of severe asthma; genes of the severe asthma-associated pathway were suppressed in CD4⁺ T cells and CD8⁺ T cells.

Key words severe asthma, metabolome, single-cell transcriptome, biomarkers, cell type

DOI: 10.16476/j.pibb.2024.0021