

【实验研究】

基于生物信息学及铁死亡分析特发性肺纤维化的差异基因及潜在的治疗中药预测

李永顺¹, 谢嘉嘉^{1, 2*}, 李航^{1, 2}, 张立^{1, 2}, 欧阳子琛¹, 徐铭芝¹, 雷雅涵¹

1. 广州中医药大学第七临床医学院, 广东 深圳 518000

2. 深圳市宝安区中医院 肺病科, 广东 深圳 518000

摘要: **目的** 通过生物信息学方法筛选与铁死亡相关的特发性肺纤维化基因, 分析其作用机制, 并预测潜在具有治疗作用的中药及活性成分。**方法** 在GEO数据库搜集符合条件的特发性肺纤维化患者数据集, 利用R软件对数据集进行差异分析获得差异表达基因(DEGs)。同时在FerrDb平台收集铁死亡相关基因(FRGs)。对DEGs和FRGs取交集得到铁死亡相关DEGs, 进一步对铁死亡相关DEGs进行蛋白质相互作用(PPI)网络分析, 筛选核心基因, 并对其进行GSEA通路富集分析。将核心基因提交至Coremine数据库查找对应中药, 并通过TCMSP数据库找到对应中药活性成分, 得到药物-活性成分网络, 进一步筛选得到核心中药和核心活性成分。对核心基因与核心活性成分进行分子对接分析。**结果** 筛选得到723个DEGs, 共收集到铁死亡相关基因487个, 两者取交集得到18个铁死亡相关DEGs, 通过PPI进一步筛选得到5个核心基因: 环加氧酶2(*PTGS2*)、血红素加氧酶1(*HOMX1*)、白细胞介素6(*IL6*)、转录因子AP-1(*JUN*)和转录激活因子3(*ATF3*)。GSEA分析显示核心基因可能通过结节样受体、丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)、信号转导子和转录激活子(JAK/STAT)、T细胞受体等信号通路发挥干预特发性肺纤维化的作用。通过预测得到丹参、干姜、人参、桑叶、桑枝等12种中药, 以及4种关键活性成分槲皮素、山柰酚、谷甾醇和 β -谷甾醇。分子对接显示核心基因与核心活性成分结合良好。**结论** 以铁死亡作为切入点, 通过生物信息学分析得到特发性肺纤维化的潜在靶点, 并得到潜在具有特发性肺纤维化治疗作用的中药及其活性成分。

关键词: 特发性肺纤维化; 铁死亡; 生物信息学; 差异表达基因; 丹参; 干姜; 人参; 桑叶; 桑枝; 槲皮素; 山柰酚; 谷甾醇; β -谷甾醇

中图分类号: R974; R285 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2023)03-0501-09

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2023.03.005

Analysis of differentially expressed genes of idiopathic pulmonary fibrosis and potential intervention of traditional Chinese medicine based on bioinformatics and ferroptosis

LI Yongshun¹, XIE Jiajia^{1, 2}, LI Hang^{1, 2}, ZHANG Li^{1, 2}, OUYANG Zichen¹, XU Mingzhi¹, LEI Yahan¹

1. The Seventh Clinical Medical College Affiliated to Guangzhou University of Chinese Medicine, Shenzhen 518000, China

2. Department of Pulmonary Disease, Shenzhen Bao'an Traditional Chinese Medicine Hospital, Shenzhen 518000, China

Abstract: Objective To screen the idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) genes associated with ferroptosis by bioinformatics methods, analyze their mechanisms of action, and predict potential therapeutic traditional Chinese medicine. **Methods** Eligible IPF patient datasets were collected in the GEO database, and differential analysis of the datasets was performed using R software to obtain differentially expressed genes (DEGs). Ferroptosis-associated genes (FRGs) were also collected in the FerrDb platform. The DEGs and FRGs were intersected to obtain ferroptosis-related DEGs, and further protein-protein interaction (PPI) network analysis was performed to screen the core genes for ferroptosis-related DEGs and enrichment analysis of the GSEA pathway was performed. The

收稿日期: 2022-10-20

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(82004141); 深圳市科创委项目(JCYJ20210324131204012); 宝安区中医药发展基金会项目(2020KJCX-KTYJ-5)

第一作者: 李永顺(1995—), 男, 硕士研究生在读, 研究方向为呼吸系统疾病诊治。E-mail: 1756398307@qq.com

*通信作者: 谢嘉嘉(1976—), 男, 硕士, 主任医师, 研究方向为呼吸系统疾病诊治。E-mail: 108752306@qq.com

core genes were submitted to the Coremine database to find the corresponding traditional Chinese medicine, and the traditional Chinese medicine-active ingredient network map was produced after finding the corresponding traditional Chinese medicine active ingredients by TCMSP to obtain the core traditional Chinese medicine and core active ingredients. Finally, molecular docking analysis was performed between the core genes and the core active ingredients. **Results** 723 DEGs were screened, and 487 ferroptosis-related genes were collected. 18 ferroptosis-related DEGs were obtained by taking the intersection of the two, and five core genes were further screened by PPI: *PTGS2*, *HOMX1*, *IL6*, *JUN*, and *ATF3*. GSEA analysis showed that the core genes may play a role in interfering with IPF through nodule-like receptors, MAPK, JAK/STAT, T-cell receptors and other signaling pathways to intervene in IPF. Twelve Chinese herbs, including *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma*, *Zingiberis Rhizoma*, *Ginseng Radix et Rhizoma*, *Mori Folium* and *Mori Ramulus*, etc. and four key active ingredients, quercetin, kaempferol, glutathione and β -sitosterol were obtained by prediction. Molecular docking showed good binding of the core genes to the core active ingredients. **Conclusion** Ferroptosis was used as an entry point to obtain potential biomarkers and therapeutic targets of IPF through bioinformatics analysis, and potential therapeutic herbal medicines for IPF and their active ingredients were obtained, providing new ideas for new targets and new drug development for IPF treatment.

Key words: idiopathic pulmonary fibrosis; ferroptosis; differentially expressed genes; *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma*; *Zingiberis Rhizoma*; *Ginseng Radix et Rhizoma*; *Mori Folium*; *Mori Ramulus*; quercetin; kaempferol; glutathione; β -sitosterol

特发性肺纤维化是一种慢性、进行性且最终致命的肺部疾病,其特征是肺功能不可逆性恶化,主要发生于50岁及以上人群^[1]。其病因及发病机制尚不明确,目前认为与遗传易感性、环境污染和职业暴露有关^[2]。特发性肺纤维化早期发病隐匿,病情逐渐加重,确诊时大多为疾病晚期,诊断后中位生存期仅有2~3年,且有研究表明15%特发性肺纤维化患者最终发展为肺癌^[3]。目前除肺移植外无任何其他治疗手段显示出生存获益,虽然近年来批准用于治疗特发性肺纤维化的药物(如吡非尼酮、尼达尼布)能有效减缓肺纤维化的进展,但不能完全阻止或者改善肺纤维化^[4]。因此明确特发性肺纤维化发生发展的相关基因靶点,并挖掘潜在的治疗中药,对特发性肺纤维化的临床诊断及治疗具有重大意义。

铁死亡是一种新型的细胞程序性死亡方式,与自噬和细胞凋亡不同,是一种依赖铁及活性氧的细胞死亡方式,其通常伴随脂质和铁代谢的紊乱^[5]。已有大量研究表明,铁代谢的异常与肺部疾病的发生发展有密切联系^[6-7],对特发性肺纤维化的进展亦有促进作用^[8]。本研究以铁死亡为切入点,探索铁死亡在特发性肺纤维化中的可能作用靶点,并预测潜在的具有治疗作用的中药,为特发性肺纤维化的诊治提供参考。

1 方法

1.1 数据的获得与处理

在 GEO 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)检索特发性肺纤维化相关数据集,以样本量大于20,同时包含正常样本和疾病样本作为筛选条件,并对数据集进行质量控制和主成分分析,保证得到的数据集可用于差异分析。随后使用 R 软件对筛选得到的数据集进行归一化处理及差异分析,以

$|\log_2FC| \geq 1$, $\text{adj.}P < 0.05$ 为筛选标准得到差异表达基因(DEGs)。从 FerrD 数据库 (<http://www.zhounan.org/ferrdb/current/>)获取铁死亡基因(FRGs)。利用韦恩图对 DEGs 和 FRGs 取交集得到铁死亡相关 DEGs。

1.2 蛋白质相互作用网络(PPI)构建及核心基因筛选

将铁死亡相关 DEGs 基因导入 STRING 平台 (<https://cn.string-db.org/>),设置对比物种为“homo sapiens”,选择置信度为0.4,进行 PPI 分析,并通过 Cytoscape 软件中的 hubba 插件筛选基因并可视化,hubba 插件中的 MCC 算法被认为是更科学的算法,将 MCC 得分前5的基因作为核心基因。

1.3 基因集富集分析(GSEA)

为进一步探索核心基因在特发性肺纤维化中的相关信号通路,使用 GSEA 软件(4.2.3)进行 GSEA 富集分析,以核心基因表达量的中位数将特发性肺纤维化组分为基因高表达组和低表达组,在分子特征数据库 (<http://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/index.jsp>)下载“c2.cp.kegg.v7.5.1.symbols.gmt”数据集作为背景,采用默认加权富集法,随机组合设置为1 000次,以 $\text{adj.}P < 0.05$, $|NES| > 1$, $FDR < 0.25$ 作为筛选条件筛选显著富集的信号通路。

1.4 潜在的具有治疗作用的中药及成分预测

通过 Coremine 数据库 (<https://coremine.com/medical/#search>)搜集核心基因对应的中药,以核心基因共有中药且 Significance < 0.05 作为目标中药导入中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP, <http://tcmispw.com/tcmisp.php>),以药动学参数口服生物利用度(OB) $\geq 30\%$ 和类药性(DL) ≥ 0.18 为条件^[9-10],筛选出核心中药并收集其活性成分,运用

Cytoscape(3.9.0)Version软件,构建核心中药-活性成分网络图,筛选出核心活性成分。

1.5 核心基因与核心活性成分分子对接验证

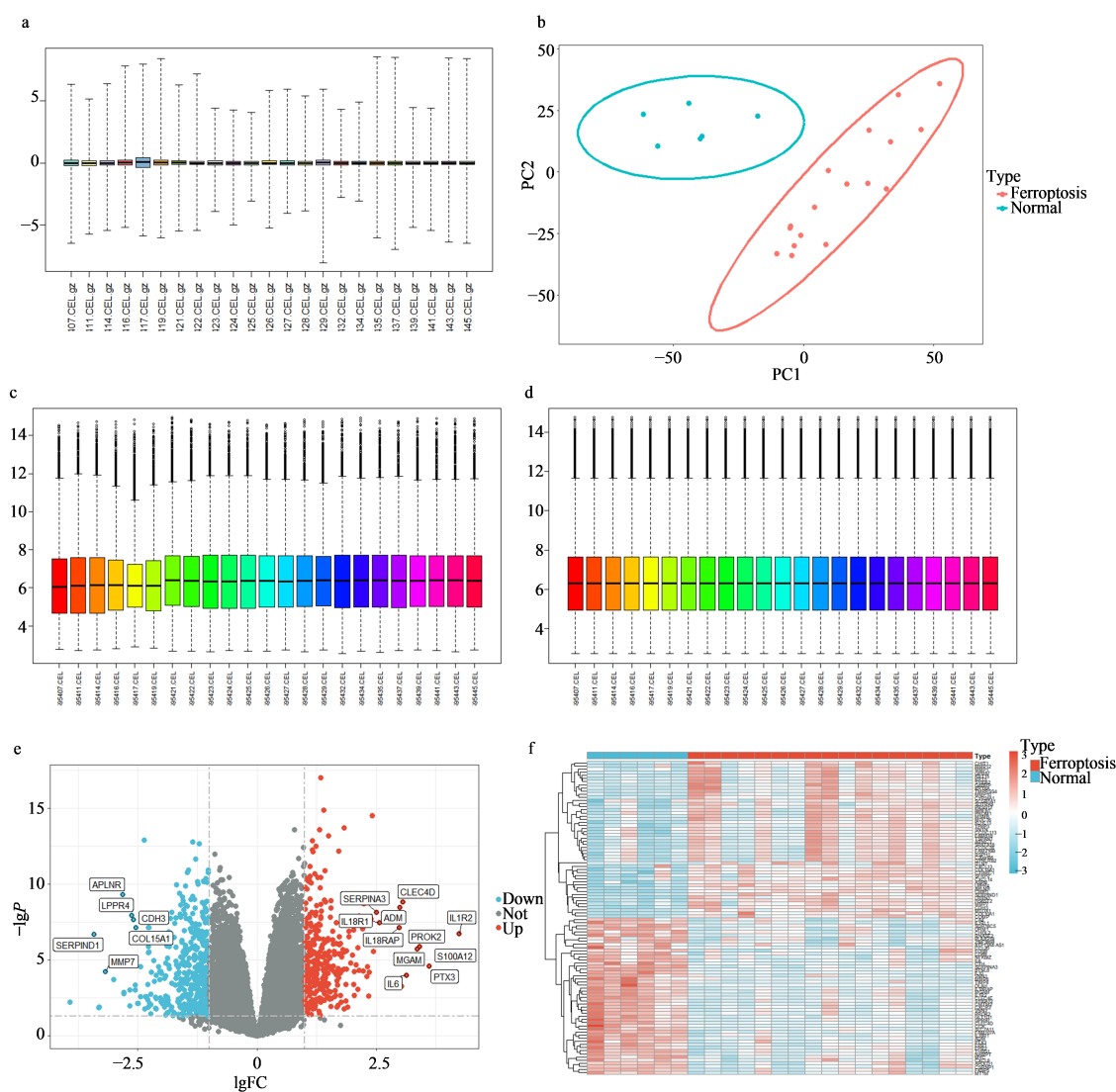
利用PDB数据库(<https://www.rcsb.org>)下载核心基因靶点已验证的3D晶体结构,使用Pymol软件进行去水加氢等预处理。从TCMSP中下载核心活性成分的MOL2格式文件,再使用Autodock Vina软件将核心活性成分和核心基因靶点进行分子对接,以结合能大小作为判断成分与基因靶点是否能够结合的指标,最后使用Pymol软件对分子对接结果进行可视化处理。

2 结果

2.1 DEGs和FRGs获得情况

在GEO数据库中筛选得到GSE24206数据集,

其包含6例正常肺组织样本和17例特发性肺纤维化肺组织样本。运用R语言对GSE24206数据集进行质量控制,选择其中的RLE箱线图进行展示(图1-a),结果表明:GSE24206数据集芯片间具有较好的一致性,可以用于进行差异基因分析。主成分分析显示特发性肺纤维化组和正常对照组,组内距离较近,组间距离较远,两组样本间无明显交集,有较好的可比性(图1-b)。同时为去除各样本间批次效应,进行差异分析前对数据集进行归一化处理(图1-c为归一化处理前,图1-d为归一化处理)。最终差异分析共获得723个DEGs,其中308个上调基因,415个下调基因,并绘制火山图(图1-e)和热图(图1-f)。在FerrDb数据库中共获得487个FRGs。



a-RLE箱线图;b-主成分分析;c-归一化处理前;d-归一化处理后;e-火山图;f-热图

a-RLE box line diagram; b-principal component analysis; c-before normalization process; d-after normalization process; e-volcano map; f-heat map

图1 特发性肺纤维化差异表达基因分析

Fig. 1 Analysis of differentially expressed genes in idiopathic pulmonary fibrosis

2.2 特发性肺纤维化差异表达和铁死亡共同靶点PPI和核心基因分析

利用韦恩图对DEGs和FRGs取交集,共得到18个铁死亡相关的DEGs,分别为溶质载体家族7成员11(*SLC7A11*)、驱动家族成员20A(*KIF20A*)、长链脂肪酸辅酶A连接酶1(*ACSL1*)、前动力蛋白2(*PROK2*)、胱硫醚- β -合成酶(*CBS*)、白血病抑制因子受体(*LIFR*)、花生四烯酸-15-脂加氧酶(*ALOX15*)、白细胞介素6(*IL6*)、水通道蛋白3(*AQP3*)、转录激活因子3(*ATF3*)、水通道蛋白5(*AQP5*)、4次跨膜蛋白A15(*MS4A15*)、转录因子AP-1(*JUN*)、人金属硫蛋白1G(*MT1G*)、环加氧酶2(*PTGS2*)、花生四烯酸-15-脂加氧酶B(*ALOX15B*)、肿瘤坏死因子 α 引导蛋白3(*TNFAIP3*)和血红素加氧酶1(*HMOX1*)。韦恩图见图2。将18个铁死亡相关DEGs导入String平台构建PPI网络,通过Cytoscape软件中的hubba插件“MCC”算法确定5个核心基因,分别为*PTGS2*、*HOMX1*、*IL6*、*JUN*和*ATF3*,其中*PTGS2*的分值最高(见表1)。可视化结果见图3。

2.3 GSEA富集分析

GSEA分析结果显示,核心基因高表达显著富集的通路有:结节样受体信号通路、丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路、信号转导子和转录激活子(JAK/STAT)信号通路、T细胞受体信号通路及

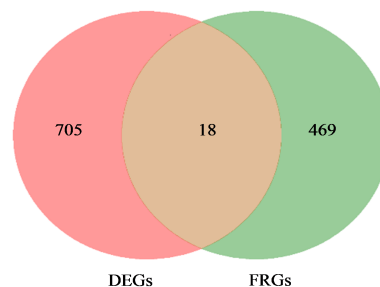


图2 特发性肺纤维化差异表达和铁死亡共同靶点基因韦恩图

Fig. 2 Venn diagram of differentially expressed and ferroptosis common target genes in idiopathic pulmonary fibrosis

表1 核心基因MCC算法分值

Table 1 MCC algorithm scores of core genes

基因	MCC算法分值
<i>PTGS2</i>	52
<i>HOMX1</i>	51
<i>IL6</i>	48
<i>JUN</i>	48
<i>ATF3</i>	26

Toll样受体信号通路等。其中结节样受体信号通路、MAPK信号通路和JAK/STAT信号通路在4个核心基因高表达中均显著富集。部分结果展示见图4。

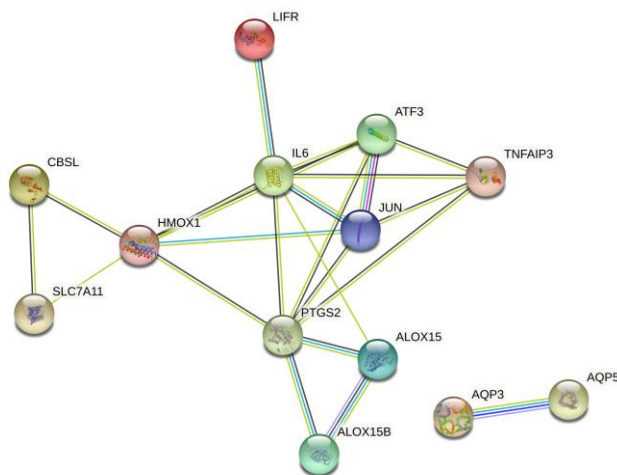


图3 特发性肺纤维化差异表达和铁死亡共同靶点基因PPI

Fig. 3 PPI of differentially expressed and ferroptosis common target genes in idiopathic pulmonary fibrosis

2.4 潜在治疗中药及成分预测

将核心基因*PTGS2*、*HOMX1*、*IL6*、*JUN*和*ATF3*导入Coremine数据库,查找对应中药,规范中药名后整理,共得到134种中药,其中5种基因共有中药17种,将17种中药导入TCMSP数据库,以 $OB \geq 30\%$ 和 $DL \geq 0.18$ 为条件搜集活性成分,去除无活性成分的中药,

共得到12种中药(丹参、干姜、莲子心、人参叶、桑叶、桑枝、生姜、桂枝、人参、高良姜、乳香、甘草)和242种活性成分,运用Cytoscape(3.9.0)Version软件,构建核心中药-活性成分网络图(图5);其中六边形为核心中药,圆形为中药活性成分,活性成分度值越大则图形越大,度值排名前4位的确定为核

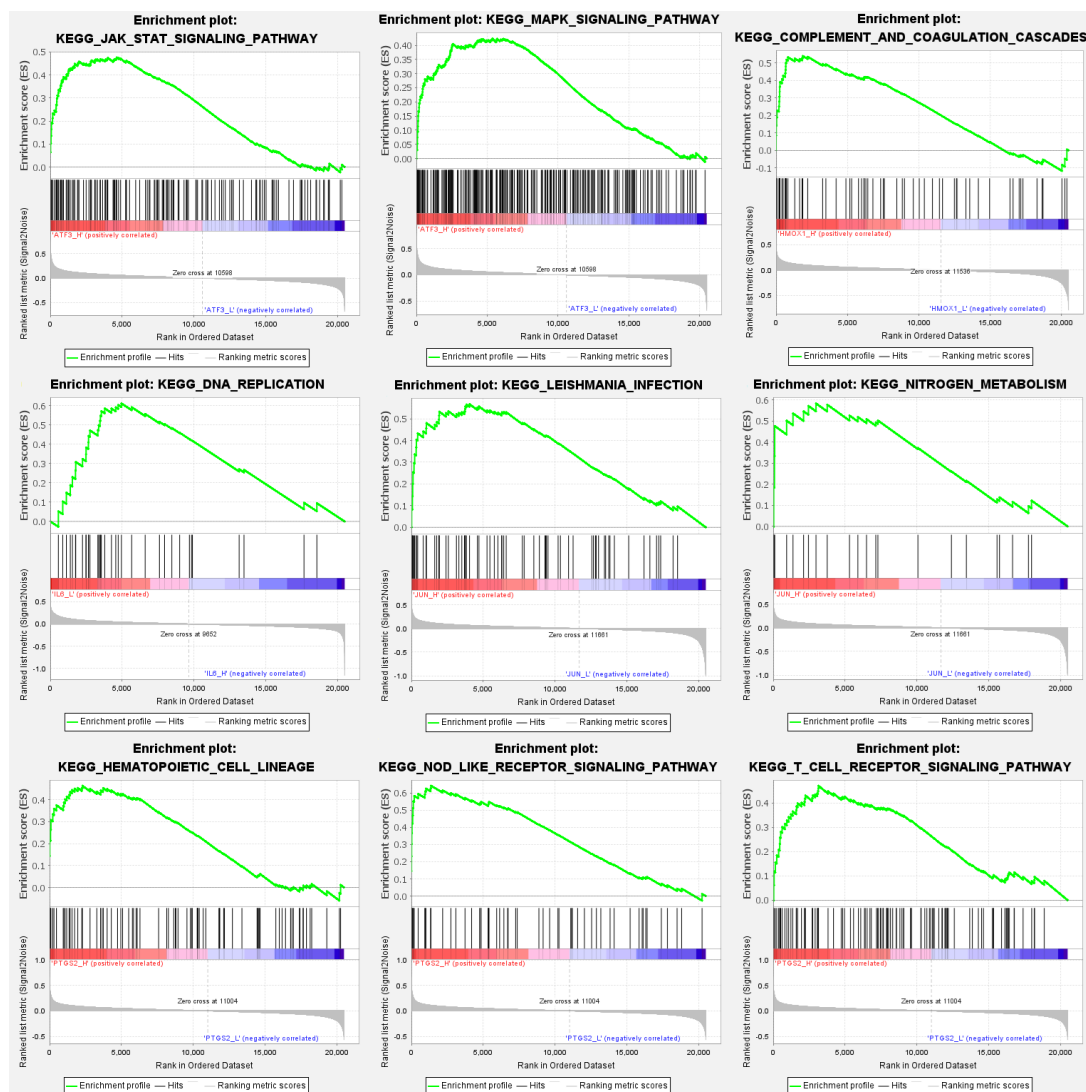


图4 GSEA富集通路分析

Fig. 4 GSEA enrichment pathway analysis

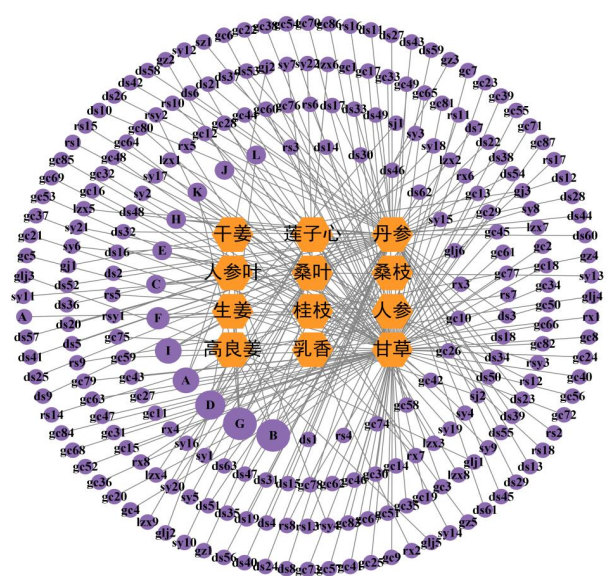


图5 预测的核心中药-活性成分网络

Fig. 5 Core herbal-active ingredient network for prediction

心活性成分,分别为槲皮素、山柰酚、谷甾醇和 β -谷甾醇。部分活性成分相关信息见表2。

2.5 分子对接验证结果

将核心活性成分与核心基因靶点进行分子对接验证。结果显示结合能均 <0 (表3)。一般认为化合物和靶点结合能 <0 提示两者可自发结合,结合能越低,配体和受体结合的构象越稳定,发生作用的可能性越大,一般认为结合能 $<-20.92 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ 表示有良好结合活性。最后使用PyMol软件对分子对接结果进行可视化,并选取部分对接结果进行展示(图6)。

3 讨论

特发性肺纤维化是特发性间质性肺炎中最常见的且预后极差的疾病,其临床病程具有高度异质性和不可预测性,大多数患者的临床症状、肺功能情况及影像学表现恶化相对较慢,但少数患者会出

表2 部分活性成分信息

Table 2 Selected active ingredient information

成分代号	MOL ID	名称	OB/%	DL	度值
A	MOL000359	谷甾醇(sitosterol)	36.91	0.75	5
B	MOL000422	山柰酚(kaempferol)	41.88	0.24	6
C	MOL003975	顺式-11,14,17-二十碳三烯酸(icoso-11,14,17-trienoic acid methyl ester)	44.81	0.23	2
D	MOL000098	槲皮素(quercetin)	46.43	0.38	5
E	MOL005344	人参皂苷 rh2(ginsenoside rh2)	36.32	0.56	2
F	MOL000449	豆甾醇(stigmasterol)	43.83	0.76	3
G	MOL000358	β -谷甾醇(beta-sitosterol)	36.91	0.75	6
H	MOL000006	木犀草素(luteolin)	36.16	0.25	2
I	MOL001771	多孔甾-5-烯-3 β -醇(poriferast-5-en-3beta-ol)	36.91	0.75	4
J	MOL000729	羟孕酮(oxyanguinarine)	46.97	0.87	2
K	MOL000354	异鼠李素(isorhamnetin)	49.60	0.31	2
L	MOL002565	美迪紫檀素(medicarpin)	49.22	0.34	2

表3 核心活性成分与核心靶点分子对接亲和力

Table 3 Docking affinity of core active ingredients with and core target molecules

核心活性成分	结合能/(kJ·mol ⁻¹)				
	PTGS2 (PDB ID:5IKV)	HOMX1 (PDB ID:3TGM)	IL6 (PDB ID:1IL6)	JUN (PDB ID:5T01)	ATF3 (PDB ID:4UYA)
MOL000098(槲皮素)	-35.98	-26.77	-25.52	-32.21	-25.52
MOL000358(β -谷甾醇)	-32.63	-32.63	-29.70	-29.28	-33.05
MOL000359(谷甾醇)	-28.45	-23.40	-25.94	-30.12	-30.96
MOL000422(山柰酚)	-40.58	-30.96	-31.79	-31.38	-26.77

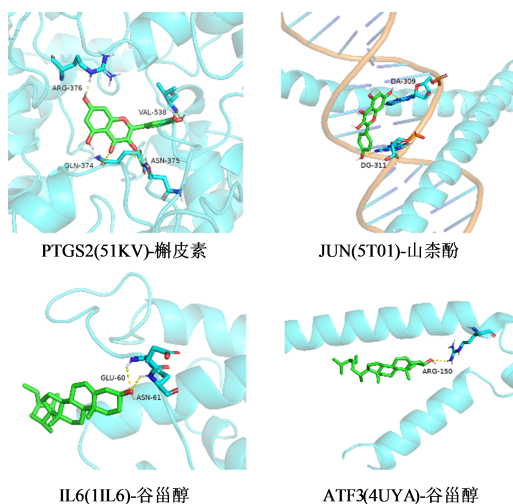


图6 部分核心成分与核心基因靶点分子对接示意图

Fig. 6 Schematic diagram of molecular docking of some core components to core gene targets

率不断增加,并随之带来沉重的卫生经济负担,而临床治疗手段却非常有限。因此挖掘特发性肺纤维化潜在治疗靶点和有效治疗药物意义重大。已有相关研究表明中药及中药成分在治疗特发性肺纤维化上具有一定疗效^[12-15],但作用机制尚不明确。通过明确铁死亡与特发性肺纤维化的共同表达基因并预测潜在治疗中药及中药成分,可为特发性肺纤维化的治疗药物开发带来新的思路。

本研究通过生物信息学得到可能从铁死亡方向治疗特发性肺纤维化的18个铁死亡DEGs,并通过进一步筛选得到5个核心基因:PTGS2、HOMX1、IL6、JUN和ATF3。其中PTGS2是前列腺素生物合成中的关键酶,既是一种双加氧酶又是一种过氧化物酶。有研究表明,PTGS2可能通过其2个主要产物前列腺素E₂(PGE₂)和前列腺素D₂(PGD₂)发挥其抗纤维化作用^[16]。IL6是由成纤维细胞、单核细胞、B细胞、巨噬细胞、树突状细胞等合成的多方面促炎细胞因子,在慢性炎症、自身免疫和纤维化中发挥

现呼吸系统急性恶化,且死亡率高达40%^[11]。近年来随着空气污染加重等原因,特发性肺纤维化发病

重要作用^[17-18]。ATF3是一种应激诱导的转录因子,在调节代谢、免疫和癌变中起着至关重要的作用,同时也与肺纤维化密切相关^[19]。研究表明吡非尼酮可以通过下调ATF3抑制成纤维细胞向肌成纤维细胞转化^[20]。上述结果表明,核心基因PTGS2、HOMX1、IL6、JUN和ATF3可能是从铁死亡方向治疗特发性肺纤维化的潜在靶点。

核心基因进行GSEA通路分析,鉴定出JAK/STAT、MAPK及Toll样受体等信号通路。其中JAK/STAT信号通路可以被大量促纤维化或促炎细胞因子(如IL6、IL11和IL13等)的相互作用下激活,从而促进肺纤维化的发展^[21-22],最新研究表明通过阻断IL6的JAK抑制剂可以减轻新型冠状病毒性肺炎的过度炎症反应及肺纤维化^[23]。MAPK信号通路也在肺纤维化进展中发挥重要作用,MAPK信号通路第一个确定的成员是细胞外信号调节激酶(ERK),其在特发性肺纤维化中过表达^[24],抑制ERK可以阻断上皮-间充质转化(EMT)过程从而减轻博来霉素诱导的PF^[25]。另有研究发现MAPK在LiCl和Wnt1诱导的A549细胞EMT中起关键作用,通过SB203580或MAPK siRNA对MAPK信号通路的干扰,可以阻断EMT和纤维蛋白合成,且可以通过转染MAPK表达质粒逆转这一过程^[26]。Toll样受体是一系列模式识别受体,通过激活核因子- κ B(NF- κ B)和干扰素调节因子(IRFs),对脂多糖等微生物抗原做出反应,最终启动促炎基因的表达,在先天免疫中起着至关重要的作用^[27-28]。然而,虽然Toll样信号通路对病原体的清除至关重要,但其信号传导不足或过度会对宿主造成伤害,导致慢性炎症疾病的发生,从而促进纤维化的发生发展^[29]。上述GSEA结果表明,可能通过调节JAK/STAT、MAPK及Toll样受体等信号通路调节铁死亡从而干预特发性肺纤维化的进展。

通过Coremine数据库和TCMSP数据库预测得到丹参、干姜、人参、生姜、人参叶、桑叶、桑枝、桂枝、乳香、莲子心、高良姜和甘草12种中药,以及4种关键活性成分槲皮素、山柰酚、谷甾醇和 β -谷甾醇。相关研究表明人参活性成分通过多种途径延缓肺纤维化的进展。人参皂苷元AD-1可显著抑制脂多糖诱导的成纤维细胞增殖与迁移^[30]。人参皂苷R1同样具有延缓肺纤维化的作用,其机制可能通过抑制过氧化氢诱导的人胚胎细胞MRC-5细胞PI3K/Akt通路蛋白的磷酸化,抑制细胞增殖,减少胶原沉淀,提高细胞的抗氧化能力^[31]。丹参及其活

性成分丹参酮II_A在治疗肺纤维化方面已被广泛研究;可以抑制JAK2-STAT3/STAT1信号通路诱导的成纤维细胞的活化和迁移,发挥抗炎和纤维化的作用,从而缓解特发性肺纤维化的进展^[32];丹酚酸B通过抑制炎性细胞浸润、肺泡结构破坏和胶原蛋白沉积,发挥明显的抗炎和抗纤维化作用,其可以通过抑制Smad依赖性信号通路和非Smad依赖性的MAPK信号通路,抑制TGF- β 诱导的肌成纤维细胞分化和TGF- β 介导的A549细胞的EMT^[33];此外,隐丹参酮可通过抑制脂多糖诱导后肺组织中的内皮间质转化过程从而延缓急性呼吸窘迫综合征小鼠早期肺纤维化^[34]。莲子心为临床常用中药之一,其有效成分异莲心碱对半乳糖所致的肺纤维化氧化损伤有保护作用^[35]。莲子心提取物可通过抑制胶原纤维合成、抗氧化、下调 α -SMA的表达以此减少细胞外基质的沉积,并降低TGF- β 1的表达抑制成纤维细胞的活化、增殖,从而起到抗纤维化作用^[36]。关键活性成分 β -谷甾醇为6种中药的共有成分,为本研究预测最有可能的潜在治疗成分之一,有相关研究显示 β -谷甾醇可抑制肺组织细胞凋亡,降低炎症反应,并减轻肺纤维化^[37]。Park等^[38]发现 β -谷甾醇能通过抑制TGF- β 1/Snail途径抑制EMT过程来减轻肺纤维化。另一关键成分槲皮素通过抑制TGF- β 1对人肺腺癌细胞株A549细胞诱导的EMT的转变,减轻肺纤维化大鼠的炎症反应,缓解博来霉素所致大鼠肺纤维化,还可通过抑制NOX4-P62信号途径,激活自噬,减轻大鼠肺纤维化^[39-40]。

本研究以铁死亡为切入点,运用生物信息学分析特发性肺纤维化的潜在治疗靶点、作用机制以及潜在治疗中药及成分,预测得到丹参、人参、莲子心、桂枝等12种中药和槲皮素、 β -谷甾醇、山柰酚、谷甾醇4种活性成分,这些药物可通过作用于PTGS2、HOMX1、IL6、JUN和ATF3治疗靶点,参与结节样受体、MAPK和JAK/STAT等相关信号通路,起到调节铁死亡治疗特发性肺纤维化的作用。为治疗特发性肺纤维化的新药研发及中药单体研发提供思路及理论依据,为特发性肺纤维化的临床治疗和后续实验研究提供新方向。本研究基于理论层面预测通过调节铁死亡方式干预特发性肺纤维化的可能治疗靶点、中药及成分,具有一定局限性,后期将行进一步的实验研究对结果进行验证。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Raghu G, Remy-Jardin M, Myers J L, et al. Diagnosis of idiopathic pulmonary fibrosis. an official ATS/ERS/JRS/ALAT clinical practice guideline [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2018, 198(5): e44-e68.
- [2] Sharif R. Overview of idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) and evidence-based guidelines [J]. Am J Manag Care, 2017, 23(11 Suppl): S176-S182.
- [3] Kato E, Takayanagi N, Takaku Y, et al. Incidence and predictive factors of lung cancer in patients with idiopathic pulmonary fibrosis [J]. ERJ Open Res, 2018, 4(1): 00111-02016.
- [4] Saito S, Alkhatib A, Kolls J K, et al. Pharmacotherapy and adjunctive treatment for idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) [J]. J Thorac Dis, 2019, 11(S14): S1740-S1754.
- [5] Han Y, Ye L, Du F, et al. Iron metabolism regulation of epithelial-mesenchymal transition in idiopathic pulmonary fibrosis [J]. Ann Transl Med, 2021, 9(24): 1755.
- [6] Sutendra G, Bonnet S. The iron paradigm of pulmonary arterial hypertension: Popeye knows best [J]. Circ Res, 2015, 116(10): 1636-1638.
- [7] Ghio A J, Hilborn E D, Stonehuerner J G, et al. Particulate matter in cigarette smoke alters iron homeostasis to produce a biological effect [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2008, 178(11): 1130-1138.
- [8] Pei Z, Qin Y F, Fu X H, et al. Inhibition of ferroptosis and iron accumulation alleviates pulmonary fibrosis in a bleomycin model [J]. Redox Biol, 2022, 57: 102509.
- [9] Tao W Y, Xu X, Wang X, et al. Network pharmacology-based prediction of the active ingredients and potential targets of Chinese herbal *Radix Curcumae* formula for application to cardiovascular disease [J]. J Ethnopharmacol, 2013, 145(1): 1-10.
- [10] Xu X, Zhang W X, Huang C, et al. A novel chemometric method for the prediction of human oral bioavailability [J]. Int J Mol Sci, 2012, 13(6): 6964-6982.
- [11] Natsuizaka M, Chiba H, Kusunuma K, et al. Epidemiologic survey of Japanese patients with idiopathic pulmonary fibrosis and investigation of ethnic differences [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2014, 190(7): 773-779.
- [12] Wu Z H, Jia M Q, Zhao W J, et al. Schisandrol A, the main active ingredient of *Schisandrae Chinensis* Fructus, inhibits pulmonary fibrosis through suppression of the TGF- β signaling pathway as revealed by UPLC-Q-TOF/MS, network pharmacology and experimental verification [J]. J Ethnopharmacol, 2022, 289: 115031.
- [13] 逢建, 孙钢. 益肺通络方治疗气阴两虚型特发性肺纤维化疗效观察 [J]. 河北中医, 2018, 40(12): 1803-1806, 1811.
- [14] Feng J, Sun G. Clinical observation of Yifei Tongluo recipe in the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis with Qi-Yin deficiency type [J]. Hebei J Tradit Chin Med, 2018, 40(12): 1803-1806, 1811.
- [15] 赵梦雅, 刘杨, 姜梦笔, 等. 加味补肺汤通过激活 Nrf2-Keap1 信号通路改善大鼠特发性肺纤维化的实验研究 [J]. 中药药理与临床, 2022, 38(3): 48-52.
- [16] Zhao M Y, Liu Y, Jiang M B, et al. Jiawei Bufei Decoction improves idiopathic pulmonary fibrosis in rats by activating Nrf2-Keap1 signaling pathway [J]. Pharmacol Clin Chin Mater Med, 2022, 38(3): 48-52.
- [17] 张喆, 赵舒, 韩云鹏, 等. 补阳还五汤对特发性肺纤维化大鼠 Keap1/Nrf2/HO-1 抗氧化信号通路的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(17): 9-16.
- [18] Zhang Z, Zhao S, Han Y P, et al. Effect of Buyang Huanwutang on Keap1/Nrf2/HO-1 antioxidant signaling pathway in rats with idiopathic pulmonary fibrosis [J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2022, 28(17): 9-16.
- [19] Yu G Y, Kovkova-Naumovski E, Jara P, et al. Matrix metalloproteinase-19 is a key regulator of lung fibrosis in mice and humans [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2012, 186(8): 752-762.
- [20] Barnes T C, Anderson M E, Moots R J. The many faces of interleukin-6: The role of IL-6 in inflammation, vasculopathy, and fibrosis in systemic sclerosis [J]. Int J Rheumatol, 2011, 2011: 721608.
- [21] Wermuth P J, Jimenez S A. The significance of macrophage polarization subtypes for animal models of tissue fibrosis and human fibrotic diseases [J]. Clin Transl Med, 2015, 4: 2.
- [22] Labzin L I, Schmidt S V, Masters S L, et al. ATF3 is a key regulator of macrophage IFN responses [J]. J Immunol, 2015, 195(9): 4446-4455.
- [23] Wu C C, Lin H B, Zhang X. Inhibitory effects of pirfenidone on fibroblast to myofibroblast transition in rheumatoid arthritis-associated interstitial lung disease via the downregulation of activating transcription factor 3 (ATF3) [J]. Int Immunopharmacol, 2019, 74: 105700.
- [24] Colomiere M, Ward A C, Riley C, et al. Cross talk of signals between EGFR and IL-6R through JAK2/STAT3 mediate epithelial-mesenchymal transition in ovarian carcinomas [J]. Br J Cancer, 2009, 100(1): 134-144.
- [25] Xiao J, Gong Y N, Chen Y, et al. IL-6 promotes epithelial-to-mesenchymal transition of human peritoneal mesothelial cells possibly through the JAK2/STAT3 signaling pathway [J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2017, 313(2): F310-F318.

- [23] Seif F, Aazami H, Khoshmirsafa M, et al. JAK inhibition as a new treatment strategy for patients with COVID-19 [J]. *Int Arch Allergy Immunol*, 2020, 181(6): 467-475.
- [24] Antoniou K M, Margaritopoulos G A, Soufla G, et al. Expression analysis of Akt and MAPK signaling pathways in lung tissue of patients with idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) [J]. *J Recept Signal Transduct Res*, 2010, 30(4): 262-269.
- [25] Zou M L, Zhang G Q, Zou J F, et al. Inhibition of the ERK1/2-ubiquitous calpains pathway attenuates experimental pulmonary fibrosis *in vivo* and *in vitro* [J]. *Exp Cell Res*, 2020, 391(1): 111886.
- [26] Fang C X, Ma C M, Jiang L, et al. p38 MAPK is crucial for Wnt1- and LiCl-induced epithelial mesenchymal transition [J]. *Curr Med Sci*, 2018, 38(3): 473-481.
- [27] Colonna M. TLR pathways and IFN-regulatory factors: To each its own [J]. *Eur J Immunol*, 2007, 37(2): 306-309.
- [28] O'Neill L A. How Toll-like receptors signal: What we know and what we don't know [J]. *Curr Opin Immunol*, 2006, 18(1): 3-9.
- [29] Cook D N, Pisetsky D S, Schwartz D A. Toll-like receptors in the pathogenesis of human disease [J]. *Nat Immunol*, 2004, 5(10): 975-979.
- [30] 苏光悦, 柯昂昂, 李涛, 等. 人参皂苷元 AD-1 抗肺纤维化作用及机制 [J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2021, 35(10): 748-749.
- Su G Y, Ke A A, Li T, et al. Anti-pulmonary fibrosis effect and mechanism of ginsenoside element AD-1 [J]. *Chin J Pharmacol Toxicol*, 2021, 35(10): 748-749.
- [31] 管梦月. 人参皂苷 Rg1 基于 PI₃k/Akt 通路对人胚肺成纤维细胞 MRC-5 作用机制及相关临床研究 [D]. 济南: 山东中医药大学, 2018.
- Guan M Y. The mechanism and clinical study of ginsenoside Rg1 on human lung fibroblast MRC-5 based on PI₃k/Akt pathway [D]. Jinan: Shandong University of Traditional Chinese Medicine, 2018.
- [32] Xue Z F, Zhao F Z, Sang X Q, et al. Combination therapy of tanshinone IIA and puerarin for pulmonary fibrosis via targeting IL6-JAK2-STAT3/STAT1 signaling pathways [J]. *Phytother Res*, 2021, 35(10): 5883-5898.
- [33] Liu Q M, Chu H Y, Ma Y Y, et al. Salvianolic acid B attenuates experimental pulmonary fibrosis through inhibition of the TGF- β signaling pathway [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 27610.
- [34] 张人子, 李晟, 王导新. 隐丹参酮减轻 LPS 诱导的 ARDS 小鼠早期肺纤维化及机制研究 [J]. *陆军军医大学学报*, 2022, 44(18): 1819-1825, 1834.
- Zhang R Z, Li S, Wang D X. Effect and mechanism of cryptotanshinone on early pulmonary fibrosis in LPS-induced acute respiratory distress syndrome in mice [J]. *J Army Med Univ*, 2022, 44(18): 1819-1825, 1834.
- [35] Zhou M G, Jiang M, Ying X H, et al. Identification and comparison of anti-inflammatory ingredients from different organs of Lotus nelumbo by UPLC/Q-TOF and PCA coupled with a NF- κ B reporter gene assay [J]. *PLoS One*, 2013, 8(11): e81971.
- [36] 李艳晓, 高颖, 王火, 等. 莲心子提取物对博来霉素致小鼠肺纤维化的干预作用研究 [J]. *中国现代医学杂志*, 2017, 27(3): 1-6.
- Li Y X, Gao Y, Wang H, et al. Intervention of Plumula Nelumbinis extracts on Bleomycin-induced pulmonary fibrosis of mice [J]. *China J Mod Med*, 2017, 27(3): 1-6.
- [37] 周强, 张坤, 李富强, 等. β -谷甾醇缓解 LPS 诱导的急性肺损伤大鼠炎症反应和纤维化 [J]. *西部医学*, 2022, 34(6): 813-818.
- Zhou Q, Zhang K, Li F Q, et al. β -sitosterol alleviated inflammation response and fibrosis in rats with LPS-induced acute lung injury [J]. *Med J West China*, 2022, 34(6): 813-818.
- [38] Park Y J, Bang I J, Jeong M H, et al. Effects of β -sitosterol from corn silk on TGF- β 1-induced epithelial - mesenchymal transition in lung alveolar epithelial cells [J]. *J Agric Food Chem*, 2019, 67(35): 9789-9795.
- [39] 薛兰, 毛春迎, 王慧, 等. 槲皮素治疗大鼠肺纤维化的作用及相关机制研究 [J]. *中国比较医学杂志*, 2022, 32(7): 94-100, 117.
- Xue L, Mao C Y, Wang H, et al. Effects of quercetin on pulmonary fibrosis in rats and its related mechanism [J]. *Chin J Comp Med*, 2022, 32(7): 94-100, 117.
- [40] 李畅, 王浩, 贺千羽, 等. 槲皮素通过诱导铁死亡抑制 A549 细胞增殖的作用及机制研究 [J]. *中草药*, 2022, 53(22): 7112-7120.
- Xue L, Wang H, He Q Y, et al. Effect and mechanism of quercetin on inhibiting proliferation of A549 cells via induction of ferroptosis [J]. *Chin Tradit Herb Drug*, 2022, 53(22): 7112-7120.

[责任编辑 刘东博]