

特发性肺纤维化特征基因和靶向中药的探索与验证

谢银子^{1,2,3,4}, 张欣欣^{1,2,3,4}, 黄慧婷^{2,4}, 詹少锋^{2,4}, 黄秀芳^{1,2,3,4}, 刘建博^{2,4*}, 连乐荣^{5*}

1. 广州中医药大学第一临床医学院, 广东 广州 510405
2. 广州中医药大学第一附属医院, 广东 广州 510405
3. 广州中医药大学 岭南医学研究中心, 广东 广州 510405
4. 广东省中医临床研究院, 广东 广州 510405
5. 广州中医药大学东莞医院, 广东 东莞 523000

摘要: **目的** 探索特发性肺纤维化 (idiopathic pulmonary fibrosis, IPF) 的特征基因及靶向中药预测, 为疾病机制研究及新药研发提供思路。**方法** 通过 GEO 数据库获取 4 个 IPF 相关芯片, 挖掘差异表达基因 (differentially expressed genes, DEGs) 后进行基因本体 (gene ontology, GO) 和京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 富集分析。利用机器学习方法从 DEGs 中筛选特征基因并做外部芯片验证, 再进行免疫浸润分析, 探索特征基因与免疫浸润的相关性。然后通过动物实验验证 IPF 的特征基因。基于特征基因在 Coremine 和 TCMS 数据库中预测靶向中药及活性成分, 通过 Cytoscape 3.7.2 构建网络图, 并进行活性成分与 IPF 特征基因的分子对接验证。**结果** 在 271 个 IPF 的 DEGs 中共筛选出 11 个特征基因, 外部芯片验证提示 *CDH3*、*MAOA*、*FND1*、*ITGB1* 在 IPF 组呈高表达, 而 *EPB41L5*、*FAM167A*、*MS4A15*、*SCARA3*、*CRTAC1*、*CCK*、*TSPAN7* 呈低表达, 且受试者工作特征 (receiver operator characteristic, ROC) 曲线提示特征基因的准确性良好。免疫浸润提示特征基因可能与活化的记忆性 CD4⁺ T 细胞和调节性 T 细胞等免疫细胞的浸润存在相关性。富集分析提示含胶原蛋白的细胞外基质、趋化因子信号通路和糖尿病并发症中的晚期糖基化终产物-晚期糖基化终产物受体 (advanced glycation end products-receptor for advanced glycosylation end products, AGE-RAGE) 信号通路等可能与 IPF 的发生发展密切相关。动物实验显示, IPF 组小鼠肺组织 *CDH3*、*FND1*、*ITGB1* 和 *MAOA* 的 mRNA 及蛋白表达水平平均高于对照组, 而 *SCARA3* mRNA 及蛋白表达水平反之, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。预测地骨皮、太子参与西红花等补虚药和活血药对 IPF 具有干预作用, 符合中医对 IPF “虚” 和 “瘀” 的病机认识; 槲皮素、 β -谷甾醇与山柰酚等活性成分对 IPF 具有干预作用。分子对接显示中药活性成分与 IPF 特征基因具有较好的结合能力。**结论** *CDH3*、*MAOA*、*FND1*、*ITGB1* 和 *SCARA3* 是 IPF 的潜在特征基因, 地骨皮、太子参与西红花等是治疗 IPF 的潜在中药。

关键词: 特发性肺纤维化; 机器学习; 特征基因; 免疫浸润; 地骨皮; 太子参; 西红花; 槲皮素; β -谷甾醇; 山柰酚

中图分类号: Q811.4; R285 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)21-7381-18

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.21.018

Exploration and validation of characteristic genes and targeted traditional Chinese medicines for idiopathic pulmonary fibrosis

XIE Yizi^{1,2,3,4}, ZHANG Xinxin^{1,2,3,4}, HUANG Huiting^{2,4}, ZHAN Shaofeng^{2,4}, HUANG Xiufang^{1,2,3,4}, LIU Jianbo^{2,4}, LIAN Leshen⁵

1. The First Clinical Medical School of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China
2. The First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China
3. Lingnan Medical Research Center of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China
4. Guangdong Clinical Research Academy of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China
5. Dongguan Hospital Affiliated to Guangzhou University of Chinese Medicine, Dongguan 523000, China

Abstract: Objective To provide ideas for disease mechanism research and novel therapeutic development, the characteristic genes

收稿日期: 2024-07-13

基金项目: 深圳市“医疗卫生三名工程”(SZZYSM202206013); 广东省中药管理局项目(20221144); 广州市科技计划项目(202201020457); 国家中医优势专科建设项目(广州中医药大学第一附属医院肺病科); 广州中医药大学青年拔尖人才(团队)培育“揭榜挂帅”项目

作者简介: 谢银子, 博士研究生, 研究方向为中医药防治呼吸系统疾病。E-mail: eazer1@163.com

***通信作者:** 刘建博, 主任中医师, 从事中西医防治呼吸系统疾病研究。E-mail: 13538759071@163.com

连乐荣, 主任中医师, 从事中西医防治呼吸系统疾病研究。E-mail: 5298596@qq.com

and herbs of idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) were explored. **Methods** Differentially expressed genes (DEGs) were mined using 4 microarrays linked to IPF that were acquired from the GEO database. Next, gene ontology (GO) and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) enrichment analyses were carried out. Characteristic genes from DEGs were screened using a machine learning method, and its external validation was also carried out. Additionally, an analysis was done on the relationship between characteristic genes and immune infiltration. An experiment on animals was done to confirm the presence of characteristic genes. In the meantime, Cytoscape 3.7.2 was used to build the networks of herbs and their active ingredients based on predictions made in the TCMSP and Coremine databases. Ultimately, molecular docking validation was carried out to confirm the combining ability between characteristic genes and active ingredients. **Results** A total of 11 characteristic genes were obtained from 271 DEGs in IPF. External validation showed that whereas *CDH3*, *MAOA*, *FNDC1* and *ITGBL1* were highly expressed in IPF, *EPB41L5*, *FAM167A*, *MS4A15*, *SCARA3*, *CRTAC1*, *CCK* and *TSPAN7* were lowly expressed. ROC curves indicated that characteristic genes have good accuracy. The infiltration of immune cells, such as T cells CD4 memory activated and T cells regulatory, may also be correlated with the characteristic genes. The development of IPF may be intimately linked to collagen-containing extracellular matrix, chemokine signaling pathway and AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications, according to enrichment analyses. Animal experiment suggested the mRNA and protein levels of *CDH3*, *FNDC1*, *ITGBL1* and *MAOA* were higher in IPF group than those in control group, while the *SCARA3* mRNA and protein expression levels were opposite, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). Herbs that were predicted to be deficiency tonics and blood activators were Digupi (*Lycii Cortex*), Taizishen (*Pseudostellariae Radix*) and Xihonghua (*Croci Stigma*). These findings aligned with the understanding of traditional Chinese medicine on the pathogenesis of IPF as “deficiency and blood stasis” in IPF held by Traditional Chinese Medicine. Quercetin, beta-sitosterol and kaempferol were their active ingredients. Lastly, molecular docking indicated that the active ingredients exhibited strong binding capacity with characteristic genes. **Conclusion** *CDH3*, *MAOA*, *FNDC1*, *ITGBL1* and *SCARA3* are potential characteristic genes of IPF. *Lycii Cortex*, *Pseudostellariae Radix* and *Croci Stigma* are potentially important herbs for the treatment of IPF.

Key words: idiopathic pulmonary fibrosis; machine learning; characteristic gene; immune infiltration; *Lycii Cortex*; *Pseudostellariae Radix*; *Croci Stigma*; quercetin; β -sitosterol; kaempferol

特发性肺纤维化 (idiopathic pulmonary fibrosis, IPF) 是一种不明原因的慢性纤维化间质性肺炎, 其特征是呼吸困难和肺功能进行性恶化^[1]。IPF 影响着全球约 300 万人, 且老年人的发病率不断升高^[2]。IPF 预后不良, 生存期短, 美国的 65 岁及以上人群中, IPF 中位生存期仅有 3.8 年^[3]。IPF 的发病机制尚未研究清楚, 目前认为肺纤维化是由肺上皮重复性损伤引起的, 伴有成纤维细胞累积、肌成纤维细胞活化与基质沉积; 同时, 损伤与机体免疫反应、成纤维细胞功能障碍等相结合, 造成了组织重塑与纤维化^[2]。现有的治疗方案中, 肺移植仅适用于少数患者, 大多数患者主要采用抗纤维化治疗以及支持性和姑息性措施^[2]。抗纤维化的一线药物主要有尼达尼布和吡非尼酮, 但其难以治愈疾病, 且存在药物耐受性的问题^[4]。因此, 进一步探索 IPF 的发病机制, 挖掘 IPF 特征基因, 并靶向特征基因寻求新的治疗药物, 突破当前药物的局限性, 是亟待研究的重要方向。而在 IPF 的新药研究中, 中医药研究及其密切相关的天然药物研究方向是当前研究的热点与重点。

IPF 在中医学中属于“肺痹”“肺痿”等范畴,

其病机以“虚”和“瘀”为主^[5-6]。中医药治疗 IPF 临床效果显著。网状 Meta 分析提示, 中西医联合治疗 IPF 在提高临床有效率与改善肺功能方面优于常规的西医治疗^[7-8], 其中推荐补阳还五汤或血府逐瘀汤联合西医常规治疗^[7]。因此, 将现代研究技术与中医药相结合, 挖掘靶向 IPF 特征基因的中药及活性成分, 具有较大的临床意义及较好的研究前景。

本研究拟通过生物信息学及机器学习方法, 基于 IPF 患者的测序数据, 挖掘 IPF 的特征基因、生物过程、通路及免疫细胞浸润特点, 靶向特征基因挖掘潜在中药及活性成分, 并进行动物实验验证及分子对接验证。研究流程见图 1。

1 材料

1.1 动物

SPF 级 C57BL/6J 小鼠 20 只, 雄性, 8~10 周, 购自广东维通利华实验动物技术有限公司, 合格证号为 SCXK (粤) 2022-0063。动物饲养于广州中医药大学动物实验中心, 许可证号为 SYXK (粤) 2018-0001, 环境温度为 22~24 °C, 相对湿度为 40%~50%, 自由进食进水, 饲养光照周期 12 h。动物实验经广州中医药大学实验动物伦理委员会批准, 批

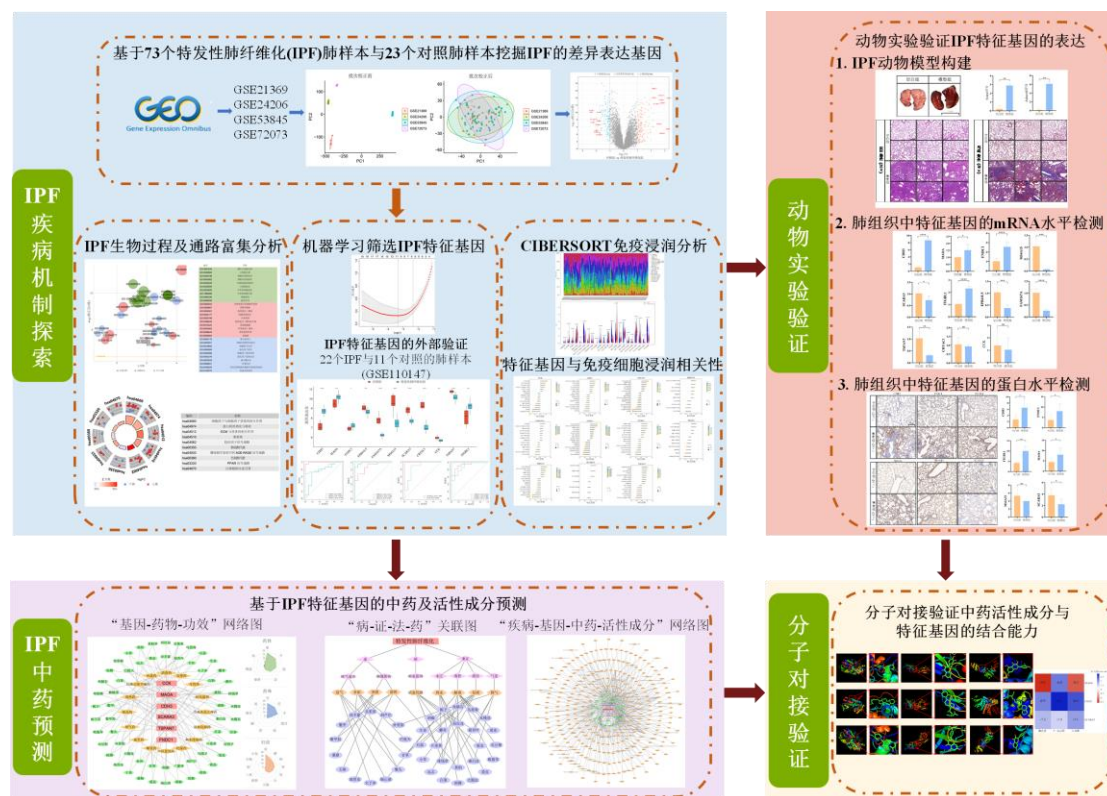


图 1 特发性肺纤维化的特征基因及潜在干预中药的研究流程

Fig. 1 Research process of characteristic genes and targeted traditional Chinese medicines for idiopathic pulmonary fibrosis

准号为 20231026002。

1.2 药品与试剂

硫酸博来霉素 (MACKLIN 公司, 货号 B802467)、Trizol 试剂 (Invitrogen 公司, 货号 15596018CN)、逆转录试剂 (Taraka 公司, 货号 RR047A)、TB Green® Ex Taq™ II 预混试剂 (Taraka 公司, 货号 RR820A)、钙黏蛋白-3 (cadherin-3, CDH3) 抗体 (Abclonal 公司, 货号 A14235)、III 型纤维连接蛋白域蛋白 1 (fibronectin type III domain-containing protein 1, FNDC1) 抗体 (BIOSS 公司, 货号 bs-8460R)、整合素 $\beta 1$ (integrin beta-like protein 1, ITGBL1) 抗体 (Abclonal 公司, 货号 A17592)、单胺氧化酶 A (monoamine oxidase type A, MAOA) 抗体 (Servicebio 公司, 货号 GB112401)、膜跨越 4 域亚家族 A 成员 15 (membrane-spanning 4-domains subfamily A member 15, MS4A15) 抗体 (BIOSS 公司, 货号 bs-13691R)、清道夫受体 A 类成员 3 (scavenger receptor class A member 3, SCARA3) 抗体 (BIOSS 公司, 货号 bs-17270R)、辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 标记的山羊抗兔免疫球蛋白 G (immunoglobulin G, IgG) 购自

Servicebio 公司, 货号 GB23303。

1.3 仪器

SR310-M 型小动物喉镜 (上海玉研科学仪器有限公司)、NanoPhotometer N50 Touch 超微量分光光度计 (德国 Implen 公司)、Veriti 型 96 孔热循环仪 (美国 Thermo Fisher 公司)、QuantStudio 5 型实时荧光定量 PCR 仪 (美国 Thermo Fisher 公司)、Pannoramic MIDI 型数字病理切片扫描系统 (匈牙利 3D HISTECH 公司)。

2 方法

2.1 IPF 基因芯片获取

IPF 相关基因来源于高通量基因表达 (Gene Expression Omnibus, GEO, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) 数据库的 5 个芯片, 分别为 GSE21369、GSE24206、GSE53845、GSE72073 和 GSE110147。前 4 个基因芯片用于 IPF 特征基因预测, 共涉及 IPF 样本 73 个、对照样本 23 个。其中, 芯片 GSE21369 中含有 11 个 IPF 样本及 6 个对照样本; 芯片 GSE24206 中含有 17 个 IPF 样本及 6 个对照样本; 芯片 GSE53845 中纳入了 40 个 IPF 样本与 8 个对照样本; 芯片 GSE72073 中纳入了 5 个 IPF 样本和 3 个对照样本。

而 GSE110147 则用于 IPF 特征基因的外部芯片验证, 包含了 22 个 IPF 样本和 11 个对照样本。

2.2 IPF 差异基因分析

采用 R 4.3.3 软件中的“sva”与“limma”包, 去除芯片 GSE21369、GSE24206、GSE53845 和 GSE72073 的批次效应, 并进行主成分分析 (principal component analysis, PCA)。以 $\log_2FC$ [FC 表示差异倍数 (fold change)] 绝对值 >1 、校正后 P 值 (P_{adj}) <0.05 为标准, 筛选 IPF 的差异表达基因 (differentially expressed genes, DEGs)。

2.3 富集分析

设置 $P<0.05$, 采用“clusterProfiler”R 包对 IPF 的 DEGs 进行基因本体 (gene ontology, GO) 功能富集分析及京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路富集分析。 P 值越小代表显著性越高, 选取显著性较高的条目进行可视化展示。

2.4 IPF 特征基因预测及外部芯片验证

基于 IPF 的 DEGs, 利用“glmnet”R 包构建最小绝对收缩和选择算子 (least absolute shrinkage and selection operator, Lasso) 回归模型, 寻找交叉验证误差最小的点以获取 IPF 的特征基因。通过芯片 GSE110147 对特征基因进行外部验证, 计算各个特征基因的表达水平, 并采用“pROC”R 包绘制受试者工作特征 (receiver operator characteristic, ROC) 曲线, 以验证特征基因的准确性。

2.5 免疫浸润分析

通过 CIBERSORT 算法对样本进行免疫细胞浸润分析, 分析 IPF 组与对照组的免疫微环境中 22 种免疫细胞所占比例, 并比较两组间的免疫细胞浸润差异。采用 Spearman 相关性分析, 探索 IPF 特征基因与免疫细胞浸润之间的相关性, 通过 Lollipop 图进行可视化。图形可视化基于微生信网站 (<https://www.bioinformatics.com.cn/>) 完成。

2.6 动物实验验证 IPF 特征基因

2.6.1 分组及造模 将 20 只小鼠随机分成对照组和模型组, 每组各 10 只。小鼠麻醉后, 经气管滴注 3.5 mg/kg 硫酸博来霉素, 对照组给予生理盐水, 滴注完成后轻柔地摇晃小鼠, 使液体在肺中均匀分布。等待小鼠麻醉苏醒, 观察一般情况无异常后, 放回笼中继续饲养。造模后第 21 天留取肺组织进行检测。

2.6.2 肺大体观及病理学观察 剥离肺组织后, 用生理盐水清洗血渍, 观察肺的大体观。将肺组织固

定、石蜡包埋后连续切片, 进行苏木精-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色、马松 (Masson) 染色, 观察病理学变化。采用 Szapiel 评分量化炎症程度, Ashcroft 评分量化纤维化程度, 分数越高提示肺组织的炎症程度、纤维化程度越高。

2.6.3 特征基因的 mRNA 水平检测 为验证 IPF 特征基因在模型小鼠中的表达情况, 从 mRNA 角度观察 IPF 特征基因的转录情况。根据试剂盒说明书对小鼠肺组织进行总 RNA 提取, 并逆转录成 cDNA, 通过实时荧光定量聚合酶链反应 (Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR) 法检测特征基因 mRNA 的水平。以 β -actin 为内参, 引物序列见表 1。

2.6.4 特征基因的蛋白水平检测 为验证 IPF 特征基因在模型小鼠中的表达情况, 从蛋白角度观察 IPF 特征基因的翻译情况。通过免疫组化方法观察小鼠肺组织特征基因的蛋白水平。将石蜡切片脱蜡至水, 进行抗原修复并阻断内源性过氧化物酶后,

表 1 RT-qPCR 所用引物序列

Table 1 Primer sequences used for RT-qPCR

基因	引物序列 (5'-3')
β -actin	F: GGCTGTATCCCCCTCCATCG R: CCAGTTGGTAACAATGCCATGT
CDH3	F: CTGGAGCCGAGCCAAGTTC R: GGAGTGCATCGCATCCTTCC
MAOA	F: GCCCAGTATCACAGGCCAC R: CGGGCTTCCAGAACCAAGA
FNDCl	F: AACAAGCCCTTGCGTATGC R: CCCAGAAGAAAACCCCGAGA
EPB4IL5	F: GAAATGGCTCTCTGCTACCAG R: TCCTGCATTCTTCACATTATGCT
FAM167A	F: GCCTGGCTCAGAAAGGAACTG R: AGTGGCATGGAAAGGCTGAAA
MS4A15	F: GCGCCCAGAGCTACTCAAC R: GTGGATGAGACCGATCAGGAT
SCARA3	F: TGACAGGGATGTACTGTGTGT R: TGCAAAGATAGGTTCTTCTGGC
CRTACI	F: CAGTCACCAACTCAGTCCTGC R: CACAACGATCTCGAAGTCCCC
CCK	F: AAGAGCGGCGTATGTCTGTG R: CATCCAGCCCATGTAGTCCC
TSPAN7	F: AGACCAAACCTGTGATAACCTGT R: GGGAGCATTGTGGAGTTCTC
ITGBL1	F: GCAGAGTCCGAACGCAGAT R: ACACAGTGGACCGAAGTAGGT

行血清封闭,滴加 CDH3 (1:800)、FNDC1 (1:150)、ITGBL1 (1:300)、MAOA (1:1 500)、MS4A15 (1:400) 和 SCARA3 (1:300) 抗体 4 ℃ 孵育过夜。PBS 洗涤后,滴加 HRP 标记的山羊抗兔 IgG,室温孵育 50 min。PBS 洗涤后,滴加 DAB 显色液后复染细胞核,脱水封片。

2.6.5 统计学方法 采用 GraphPad Prism 8.0.2 软件进行统计学分析。对定量数据进行正态性检验, $P>0.05$ 为正态分布,反之为偏态分布。正态分布采用成组两样本 t 检验,偏态分布采用成组两样本秩和检验。以 $P<0.05$ 认为组间差异具有统计学意义。

2.7 基于 IPF 特征基因预测靶向中药

利用 Coremine 数据库 (<https://coremine.com/medical/#search>) 预测 IPF 特征基因的潜在靶向中药,设置 $P<0.05$ 。参考《中国药典》2020 年版^[9]、《中药学》^[10]以及《广东省中药材标准(第一册)》^[11]对中药名称进行规范,并对药性、药味、归经与功效进行统计分析及雷达图可视化展示。同时,采用 Cytoscape 3.7.2 绘制“基因-药物-功效”网络图,并根据 IPF 的中医理论,构建“病-证-法-药”关联图。

2.8 基于中药预测活性成分

基于“病-证-法-药”关联图中所涉及到的与 IPF 临床治疗密切相关的中药,在 TCMSP 数据中,以口服生物利用度 ≥ 30 、类药性 ≥ 0.18 为筛选标准,预测中药活性成分。构建“疾病-基因-中药-活性成分”网络图,并计算网络的度值,选取度值最高的前 3 位作为中药核心活性成分。

2.9 分子对接验证中药活性成分与 IPF 特征基因的结合能力

对中药核心活性成分与 IPF 特征基因进行分子对接。在 PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 数据库中获取目标成分的结构。在 PDB 蛋白质数据库 (<http://www.rcsb.org/>) 中获取目标蛋白的结构,并去除水分子、加氢等。采用 AutoDock vina 1.5.6 软件将目标蛋白结构和目标成分结构转为 pdbqt 格式,并确定活性口袋,最后进行分子对接。若结合能 <0 kcal/mol (1 kcal=4.2 kJ),代表目标蛋白和目标成分可自发结合,若结合能 ≤ -5 kcal/mol,代表二者可良好结合^[12]。

3 结果

3.1 IPF 的 DEGs

PCA 结果提示芯片间的批次效应去除效果较为理想,见图 2-A、B。4 个芯片共获得 271 个与 IPF

相关的 DEGs,包含 111 个下调基因和 160 个上调基因,见图 2-C。

3.2 富集分析

对 271 个 DEGs 进行富集分析。GO 功能富集分析提示,中性粒细胞迁移与趋化、含胶原蛋白的细胞外基质、纤维状胶原三聚体、整合素结合、趋化因子活性、细胞因子受体活性等可能与 IPF 的疾病机制相关,见图 3-A。KEGG 通路富集分析提示,细胞因子与细胞因子受体的相互作用、蛋白质的消化和吸收、趋化因子信号通路、细胞外基质(extracellular matrix, ECM)与受体的相互作用、糖尿病并发症中的晚期糖基化终产物-晚期糖基化终产物受体(advanced glycation end products-receptor for advanced glycosylation end products, AGE-RAGE)信号通路、过氧化物酶体增殖物激活受体(peroxisome proliferator activated receptor, PPAR)信号通路等可能参与了 IPF 的发生发展,见图 3-B。

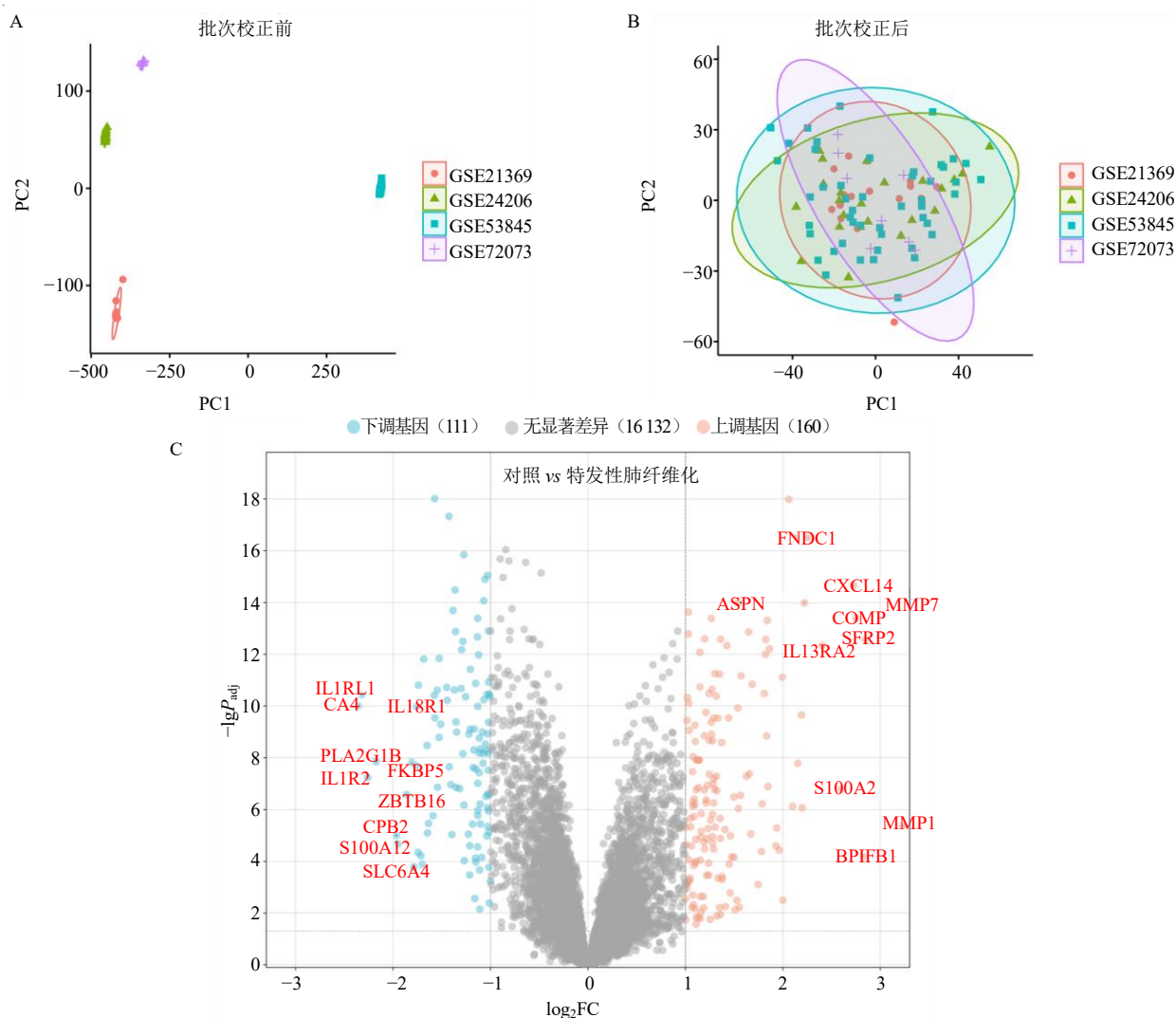
3.3 IPF 特征基因预测及外部芯片验证

Lasso 回归模型提示,交叉验证误差最小的点所对应的基因数目为 11,见图 4-A。将这 11 个基因视为 IPF 特征基因,分别为 CDH3、MAOA、FNDC1、红细胞膜蛋白条带 4.1 样 5 (erythrocyte membrane protein band 4.1 like 5, EPB41L5)、序列相似度为 167 的家族成员 A (family with sequence similarity 167, member A, FAM167A)、MS4A15、SCARA3、软骨酸性蛋白 1 (cartilage acidic protein 1, CRTAC1)、胆囊收缩素 (cholecystokinin, CCK)、四旋蛋白 7 (tetraspanin 7, TSPAN7) 和 ITGBL1。

采用芯片 GSE110147 对 IPF 特征基因进行外部验证。IPF 特征基因的组间表达差异见图 4-B。*CDH3*、*MAOA*、*FNDC1*、*ITGBL1* 在 IPF 组中呈高表达,*EPB41L5*、*FAM167A*、*MS4A15*、*SCARA3*、*CRTAC1*、*CCK*、*TSPAN7* 在 IPF 组中呈低表达,差异具有统计学意义 ($P<0.05$)。ROC 曲线显示,11 个特征基因的 ROC 曲线下面积均大于 0.7,提示这些基因作为 IPF 的特征基因具有良好的准确性。其中, *CDH3*、*FAM167A*、*MS4A15*、*SCARA3*、*CRTAC1*、*TSPAN7* 的 ROC 曲线下面积大于 0.9,提示其准确性较高,见图 4-C~F。

3.4 免疫浸润分析

22 种免疫细胞的浸润丰度见图 5-A。进一步分析每种免疫细胞在 IPF 组与对照组之间的浸润差异,结果见图 5-B。记忆 B 细胞、CD8⁺ T 细胞、静



A-4 个芯片的基因表达情况；B-4 个芯片去除批次效应后的基因表达情况；C-差异表达基因的火山图。

A-gene expression of four microarrays; B-gene expression of four microarrays after batch correction; C-volcano map of differentially expressed genes.

图 2 特发性肺纤维化的差异表达基因

Fig. 2 Differentially expressed genes in idiopathic pulmonary fibrosis

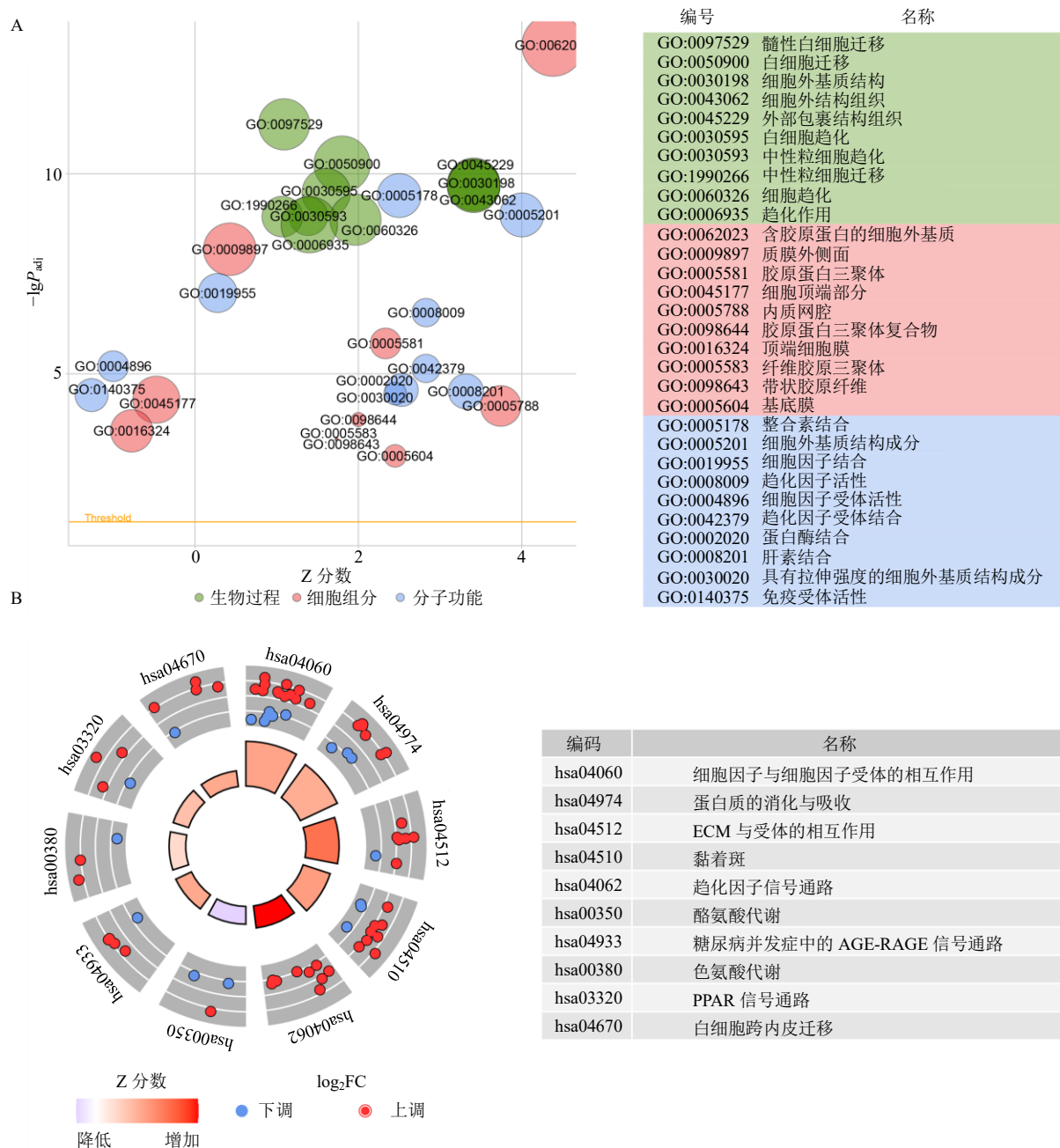
息的记忆性 CD4⁺T 细胞、活化的记忆性 CD4⁺T 细胞、调节性 T 细胞、静息的 NK 细胞、单核细胞、M1 型巨噬细胞、静息的树突状细胞、静息的肥大细胞与中性粒细胞在对照组和 IPF 组中存在浸润差异，且差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

将 IPF 的特征基因逐一与免疫细胞进行相关性分析，见图 6。CDH3 与活化的记忆性 CD4⁺T 细胞、单核细胞相关性最大，MAOA、CKK 与中性粒细胞、滤泡辅助性 T 细胞相关性最大，FNDC1 与活化的 NK 细胞、静息的 NK 细胞相关性最大，EPB41L5 与静息的记忆性 CD4⁺T 细胞、调节性 T 细胞相关性最大，FAM167A 与单核

细胞、调节性 T 细胞相关性最大，MS4A15、CRTAC1 与活化的 NK 细胞、浆细胞相关性最大，SCARA3 与静息的肥大细胞、滤泡辅助性 T 细胞相关性最大，TSPAN7 与滤泡辅助性 T 细胞、活化的记忆性 CD4⁺T 细胞相关性最大，ITGBL1 与 CD8⁺T 细胞、浆细胞相关性最大。提示 IPF 特征基因可能通过调节肺组织的免疫细胞浸润程度影响疾病的发生发展。

3.5 动物实验验证 IPF 特征基因

3.5.1 肺大体观及病理学观察 对照组与模型组小鼠的肺大体观见图 7-A。相比于对照组，模型组小鼠的肺大体观更加瘀暗，病变明显。显微镜下，HE



A-GO 功能富集分析; B-KEGG 通路富集分析。

A-GO function enrichment analysis; B-KEGG pathway enrichment analysis.

图 3 特发性肺纤维化差异表达基因的富集分析

Fig. 3 Enrichment analyses on differentially expressed genes of idiopathic pulmonary fibrosis

染色及 Masson 染色的肺组织病理显示, IPF 小鼠的肺组织呈现明显的炎症浸润及纤维化; Szapiel 评分和 Ashcroft 评分也提示模型组小鼠的肺部炎症程度、纤维化程度显著高于对照组, 组间差异具有统计学意义 ($P < 0.01$), 见图 7-B~D。

3.5.2 特征基因的 mRNA 水平检测 通过 RT-qPCR 检测肺组织中 IPF 特征基因的 mRNA 水平,

见图 8。与对照组比较, 模型组小鼠肺组织 *CDH3*、*MAOA*、*FNDC1*、*ITGBL1* 的 mRNA 水平显著升高, 而 *MS4A15*、*SCARA3*、*EPB41L5*、*FAM167A*、*TSPAN7* 的 mRNA 水平显著降低, 组间差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001 、 0.0001); *CRTAC1*、*CCK* 的 mRNA 水平降低, 但差异不具有统计学意义 ($P > 0.05$)。结果表明, 11 个特征基因中有 9 个基

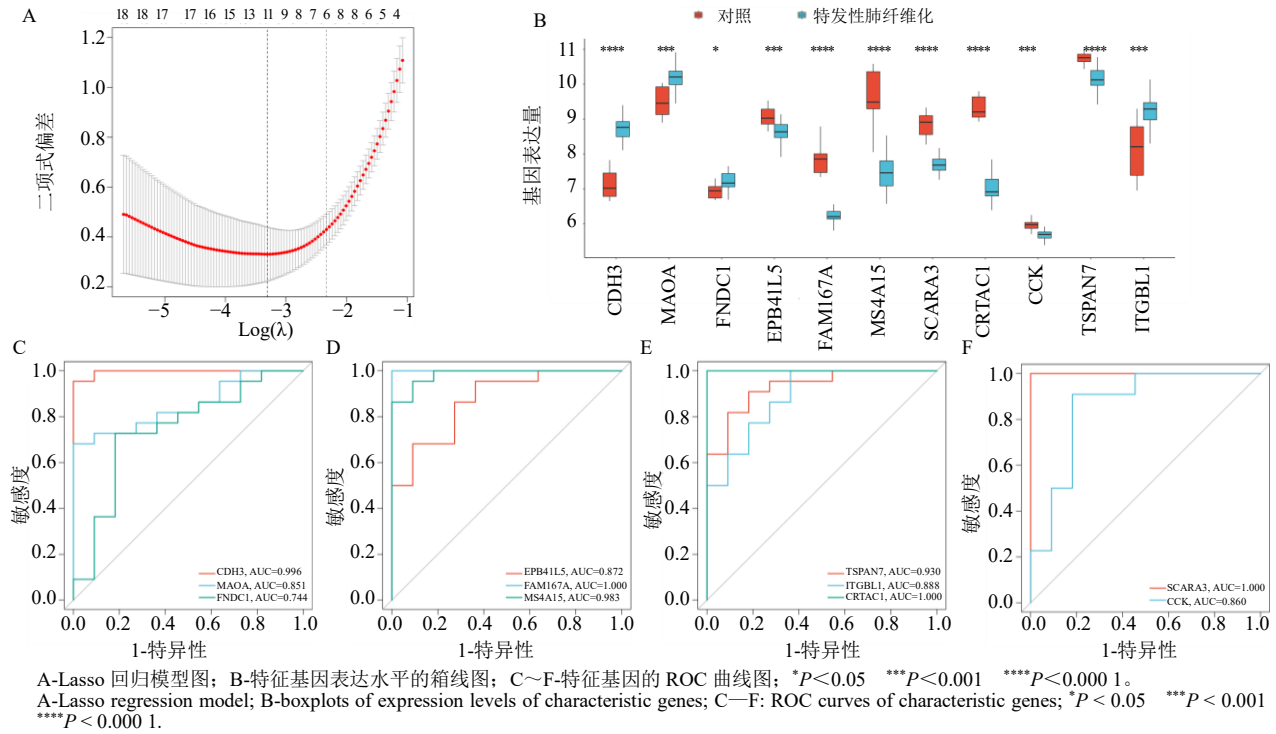


图 4 特发性肺纤维化特征基因筛选并进行外部验证

Fig. 4 Screening and external validation of characteristic genes in idiopathic pulmonary fibrosis

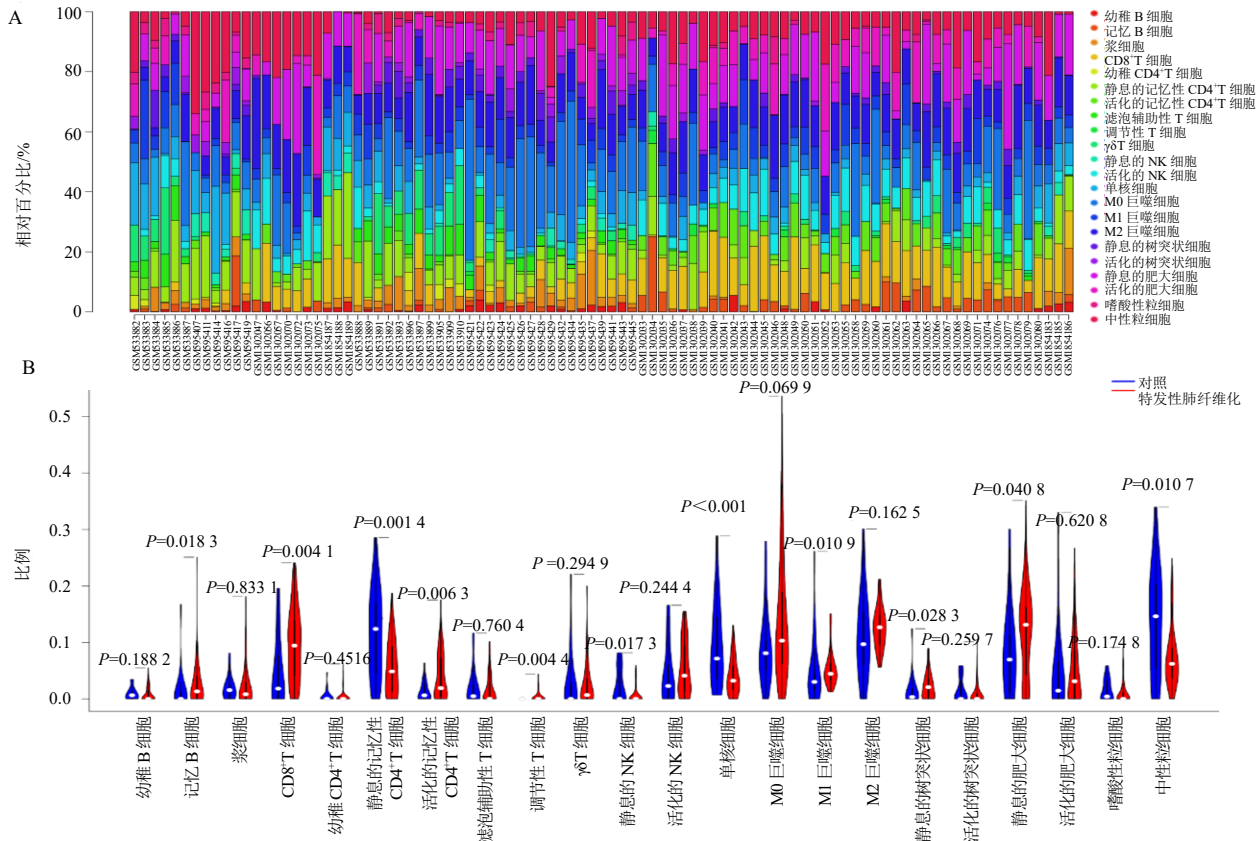


图 5 特发性肺纤维化的免疫细胞浸润分析

Fig. 5 Immune infiltration analysis on idiopathic pulmonary fibrosis

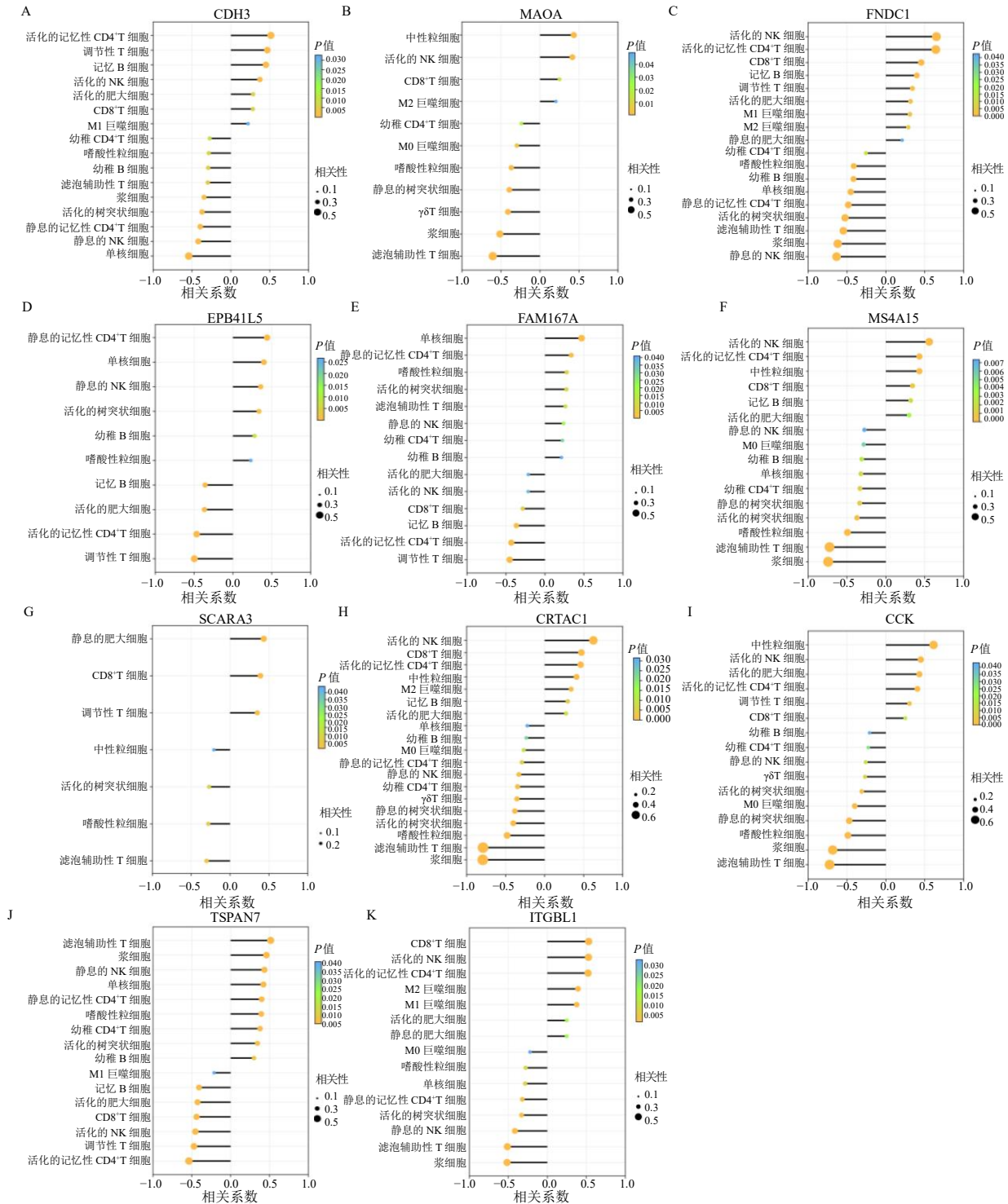


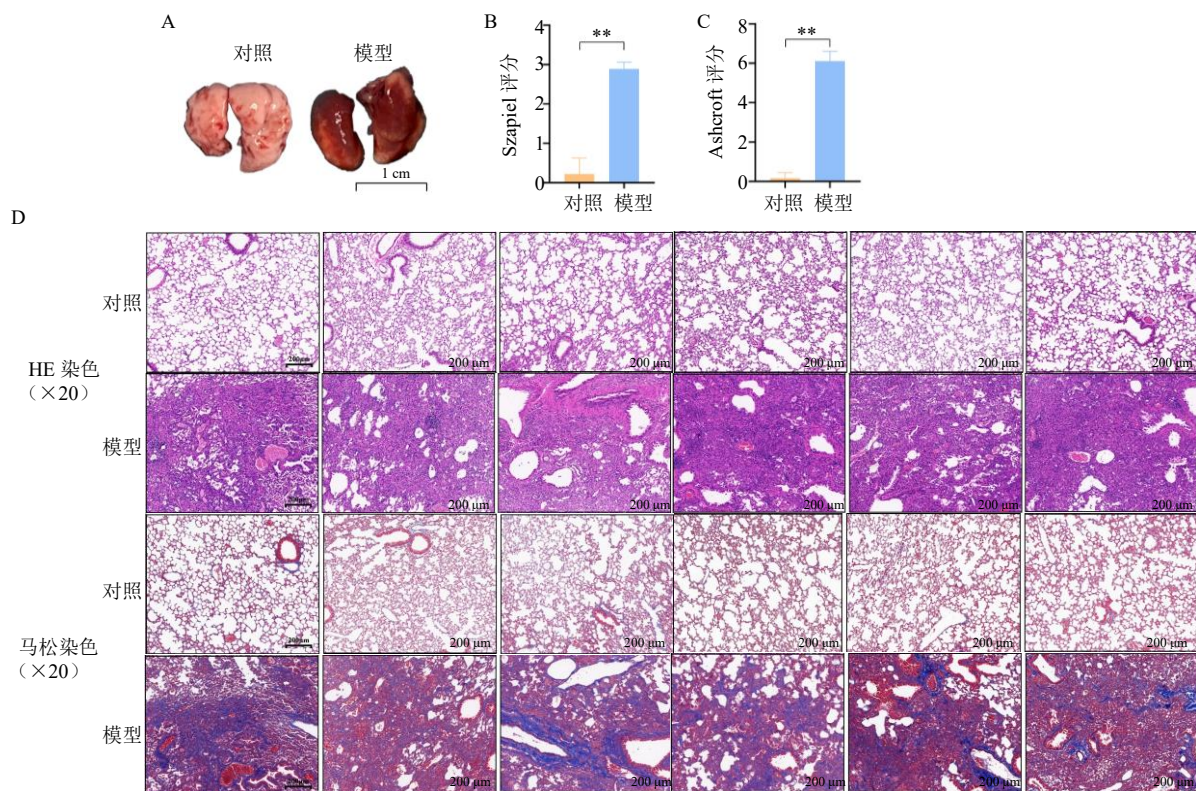
图 6 特发性肺纤维化特征基因与免疫细胞浸润程度的相关性

Fig. 6 Correlation between characteristic genes of idiopathic pulmonary fibrosis and immune infiltration

因 IPF 模型小鼠中得到基因转录层面的验证。

3.5.3 特征基因的蛋白水平检测 共有 9 个特征基因得到 mRNA 转录层面的验证。从中挑选 RT-qPCR 检测趋势与基因功能相符的 6 个基因 (CDH3、MAOA、FNDC1、ITGBL1、MS4A15 和 SCARA3),

观察其在蛋白翻译层面的水平, 结果见图 9。与对照组比较, IPF 小鼠肺组织 CDH3、FNDC1、ITGBL1 和 MAOA 蛋白水平显著升高, 而 SCARA3 蛋白水平显著降低, 差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$ 、0.01); MS4A15 蛋白水平降低, 但差异不具有统计



A-肺大体观；B-Szapiel 评分柱状图；C-Ashcroft 评分柱状图；D-HE 染色及 Masson 染色的肺组织病理图；与对照组比较：** $P < 0.01$ ； $n = 6$ 。
A-view of lungs; B-histogram of Szapiel score; C-histogram of Ashcroft score; D-histopathological picture of lungs in HE and Masson staining; ** $P < 0.01$ vs control group; $n = 6$.

图 7 特发性肺纤维化模型组与对照组的肺大体观及病理

Fig. 7 Lung view and pathology of idiopathic pulmonary fibrosis model group and control group

学意义 ($P > 0.05$)。

3.6 基于 IPF 特征基因预测靶向中药

基于 IPF 特征基因进行靶向中药预测，剔除 $P \geq 0.05$ 或在《中国药典》2020 年版^[9]等资料中无法查询到的中药。最后共有 6 个基因预测到 69 种符合条件的中药，去除重复项后剩 60 种中药。“基因-药物-功效”网络见图 10-A。药物类别包含了补虚药和活血化瘀药等，且 MAOA 预测到的中药数目最多。由图 10-B~D 可知，所预测的中药中，药性以寒、平、温居多，药味以甘、苦、辛居多，归经以肝、脾、肺、肾居多。中医认为特发性肺纤维化的病机多为“虚”和“瘀”；虚证为肺燥阴伤、肺气虚冷，瘀证为瘀血阻络，可兼有其他病证，如水泛、毒积、痰结、气逆等；治当养阴清热、益气补阳、活血化瘀、利水、解毒、祛痰、降气等^[13-15]。而预测的中药中，可供选择药物有地骨皮、太子参、西红花和桑白皮等。由此绘制的“病-证-法-药”关联图见图 10-E。

3.7 基于中药预测活性成分

“病-证-法-药”关联图所涉及的与 IPF 临床治疗密切相关的 38 种中药中，只有 22 个中药能预测到相关的活性成分。构建“疾病-基因-中药-活性成分”网络图，见图 11。以网络的度值由大到小排列，前 3 名成分视为核心活性成分，分别是槲皮素、 β -谷甾醇与山柰酚。网络图共涉及特征基因 5 个，分别为 MAOA、CDH3、CCK、TSPAN7 和 SCARA3，提示这些基因可能是 IPF 临床所用中药可潜在靶向的基因。

3.8 分子对接验证中药活性成分与 IPF 特征基因的结合能力

根据“疾病-基因-中药-活性成分”网络图得到 3 个核心活性成分槲皮素、 β -谷甾醇与山柰酚；以及 5 个与 IPF 临床用药密切相关的特征基因 MAOA、CDH3、CCK、TSPAN7 和 SCARA3。这 5 个基因中，在动物实验中得到验证，且表达趋势与基因功能相符的有 3 个，分别为 MAOA、CDH3 和 SCARA3。

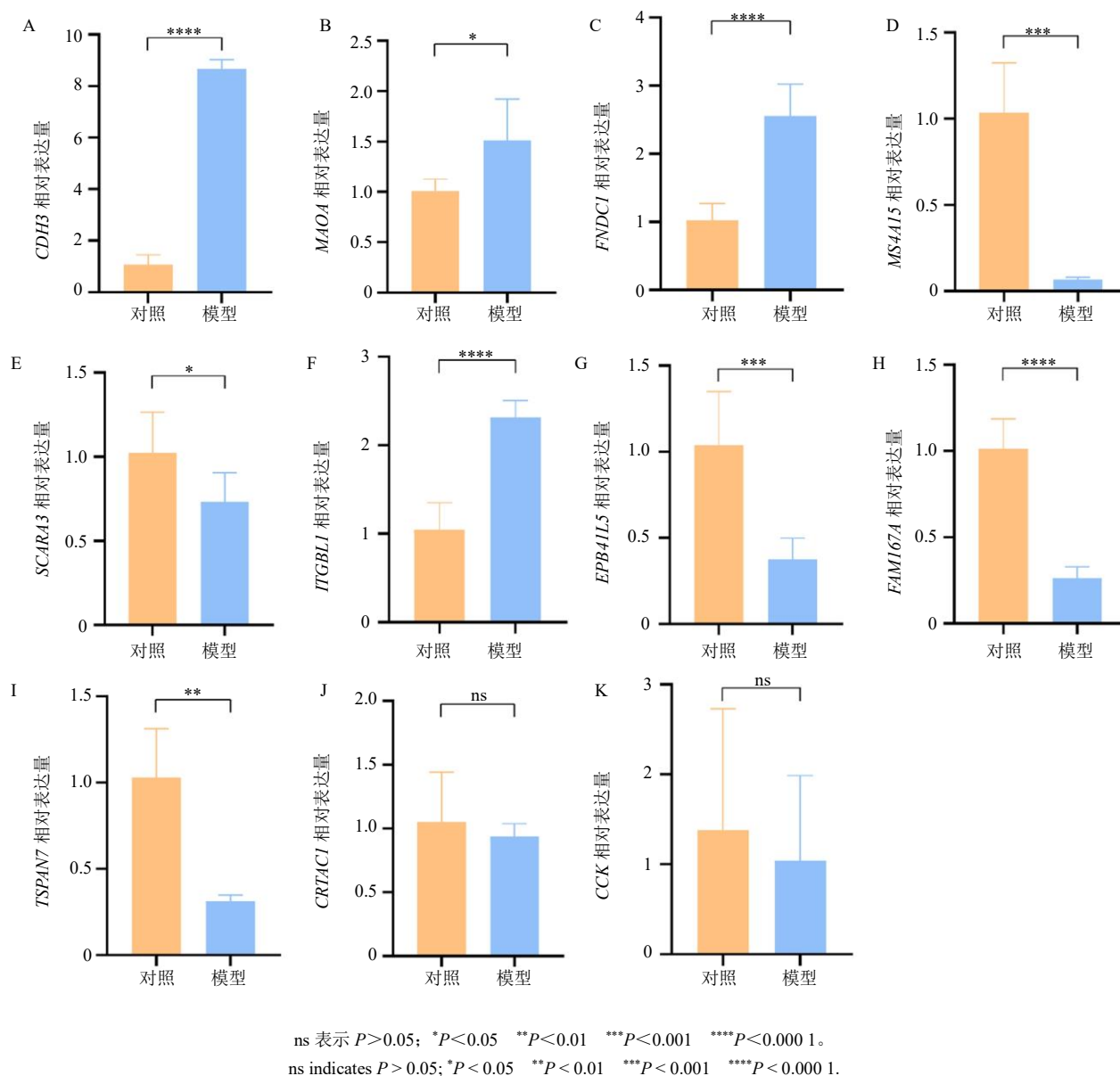


图 8 特征基因在特发性肺纤维化小鼠肺组织中的 mRNA 水平 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 8 mRNA Levels of characteristic genes in lung tissue of mice with idiopathic pulmonary fibrosis ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

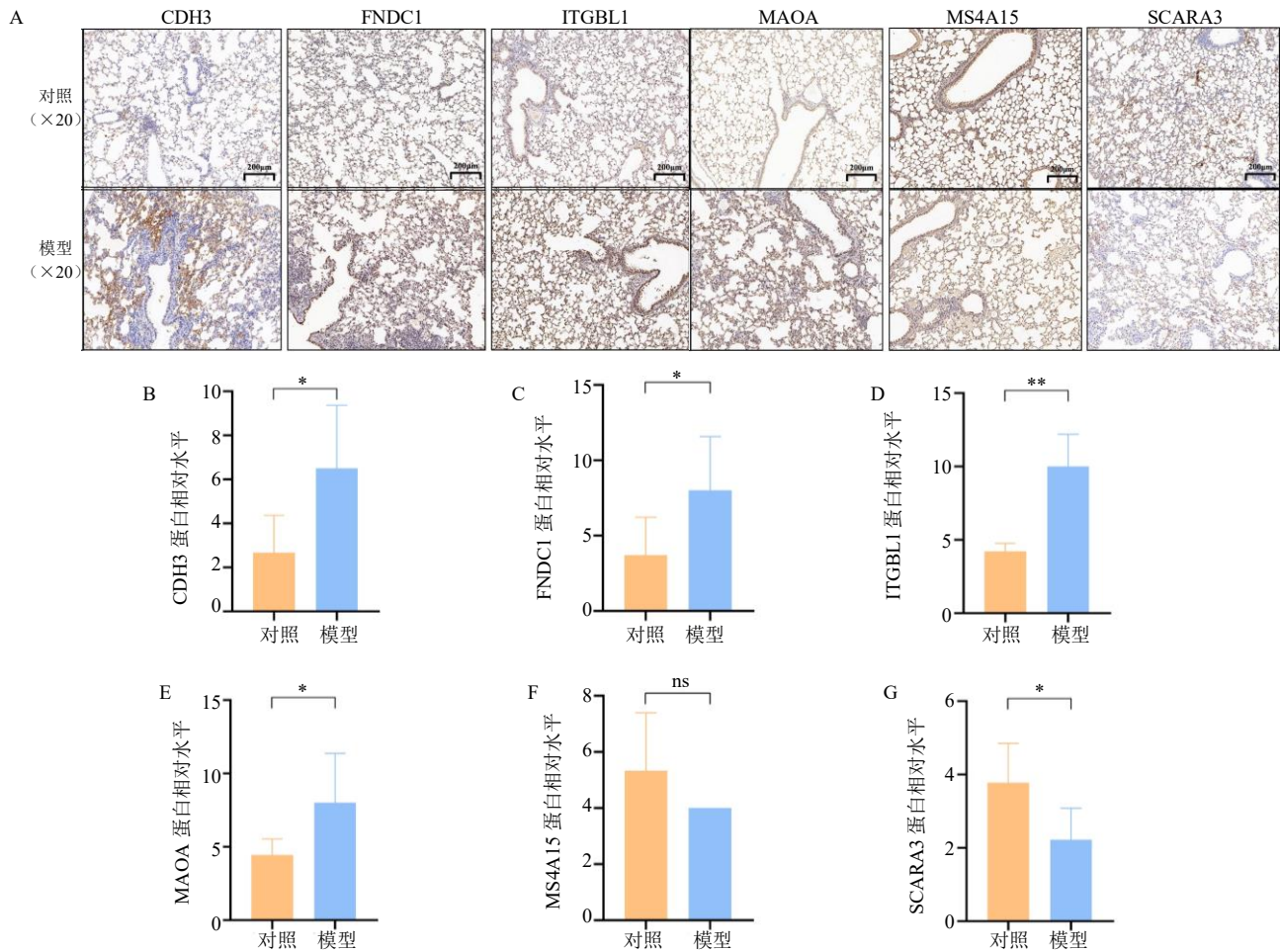
因此，本研究以槲皮素、 β -谷甾醇与山柰酚为目标成分，MAOA、CDH3 和 SCARA3 为目标蛋白，进行分子对接，结果见图 12。所有分子对接的结合能均小于 -5.0 kcal/mol，提示成分与蛋白之间可良好结合。其中，以槲皮素与 MAOA 的结合能最低，为 -9.6 kcal/mol，提示槲皮素在体内可能通过与 MAOA 蛋白的紧密结合，发挥治疗 IPF 的作用。

4 讨论

IPF 是一种病因不明的、慢性的、进展性的肺部纤维化疾病，其特征是肺功能进行性下降，最终导致呼吸衰竭、死亡^[4,16-17]。当前 IPF 的疾病机制尚

不明确，治疗手段受限。而新药研发离不开疾病机制的研究。因此，本研究探索了 IPF 的特征基因，并预测了靶向基因的中药及活性成分。

组织纤维化的特征是成纤维细胞过度活化与增殖，成纤维细胞分化为肌成纤维细胞，上皮细胞进行上皮-间充质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 以扩大成纤维细胞和肌成纤维细胞的数量，从而过度分泌与沉积 ECM 蛋白，造成纤维化^[18-19]。而氧化应激、炎症反应在成纤维细胞的激活和增殖中发挥了重要作用^[18]。本研究共挖掘出 11 个 IPF 特征基因，其中 CDH3、MAOA、FNDC1、



A-特征基因的免疫组化直观图；B~G-特征基因的免疫组化评分；ns 表示 $P > 0.05$, * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ 。

A-immunohistochemical visualization of characteristic genes; B~G-immunohistochemical scores of characteristic genes; ns indicates $P > 0.05$, * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$.

图 9 特征基因在特发性肺纤维化小鼠肺组织中的蛋白水平 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

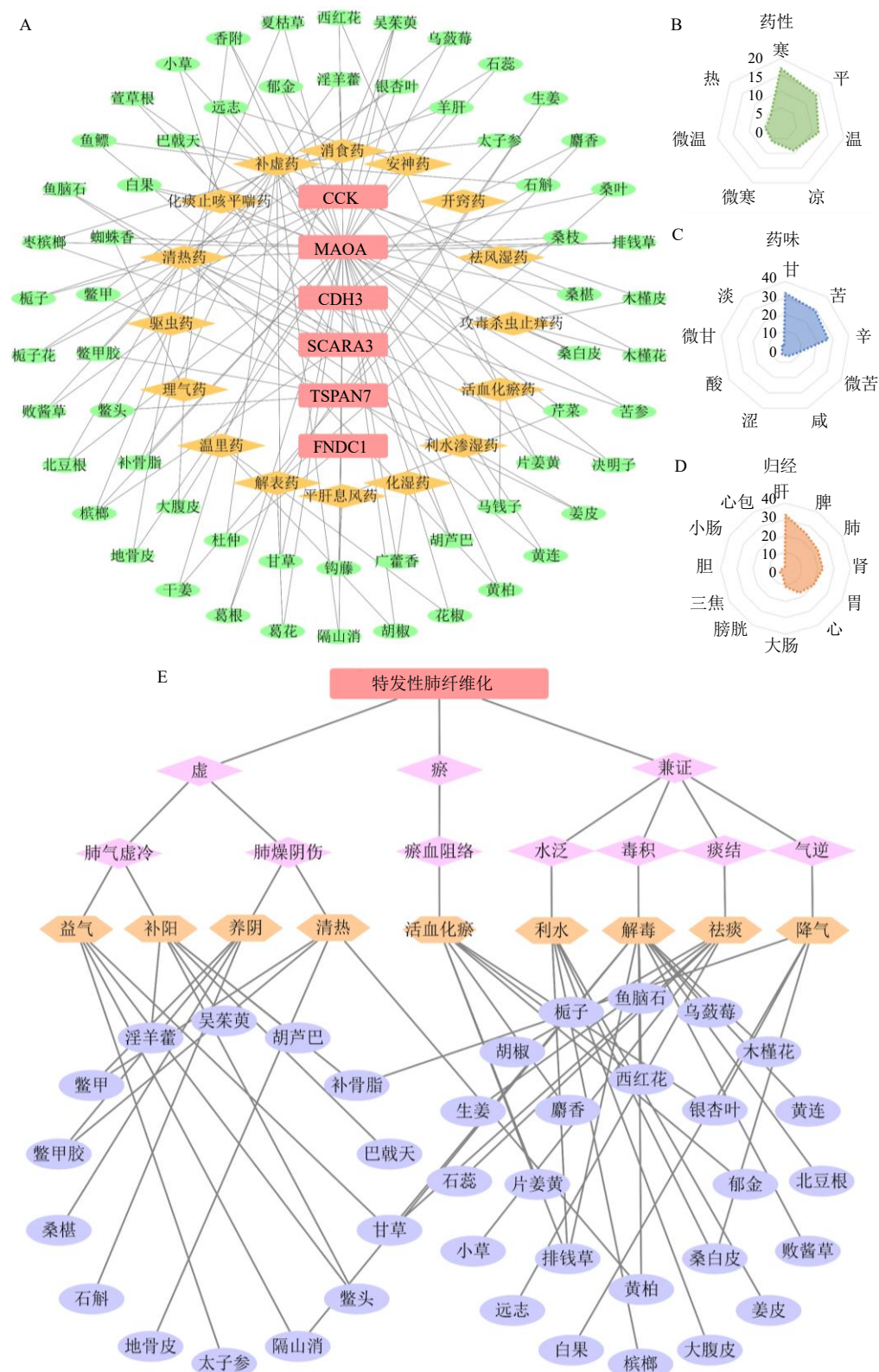
Fig. 9 Protein levels of characteristic genes in lung tissue of mice with idiopathic pulmonary fibrosis ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

ITGBL1 和 SCARA3 在动物实验中得到了验证。结合文献研究发现, 本研究挖掘的 IPF 特征基因主要聚焦于 ECM 重塑机制, 也有部分基因通过 EMT、肌成纤维细胞去分化和氧化应激等机制影响 IPF 肺中的 ECM 重塑。

ECM 是一种动态的三维网络, 可为组织提供结构支撑, 其组成含有蛋白聚糖、胶原蛋白、层黏连蛋白、弹性蛋白和纤连蛋白等糖蛋白^[20]。在 IPF 中, 胶原蛋白合成与降解平衡失调, 会造成肺 ECM 的过度积累与进行性肺瘢痕形成^[21]。FNDC1 是一种 ECM 重塑基因^[22]。CDH3 是具有单跨膜结构域的糖蛋白, 可介导细胞间黏附^[23]。钙黏蛋白家族与 IPF 密切相关, 例如 CDH11 是组织纤维化的中枢介质, 在 IPF 患者中表达增加^[24]; CDH3 可调节

ECM 重塑与 ECM 诱导的细胞迁移, 从而促进定向集体细胞迁移^[25]。本研究通过生物信息学及动物实验验证发现, FNDC1 与 CDH3 在 IPF 中呈高表达状态, 这提示 FNDC1 与 CDH3 可能诱导 ECM 重塑, 导致 IPF 的发生发展。

EMT 与 IPF 的病理生理学密切相关^[26]。EMT 会出现上皮标志物 E-钙黏蛋白丢失, 细胞极性与细胞间连接改变和 N-钙黏蛋白、波形蛋白与纤连蛋白等间充质标志物增加^[27]。SCARA3 表达水平上升可降低肺癌细胞的迁移与侵袭能力, 减少 EMT 标志物^[28]。本研究通过生物信息学及动物实验验证发现, SCARA3 在 IPF 中呈低表达水平, 推测 SCARA3 可能是 IPF 的保护因素, 可能通过减少 EMT, 改善 ECM 重塑, 减轻 IPF 纤维化。



A-“基因-药物-功效”网络图; B-药性分布雷达图; C-药味分布雷达图; D-归经分布雷达图; E-“病-证-法-药”关联图。

A-“gene-drug-efficacy” network map; B-radar map of medicinal properties distribution; C-radar map of medicinal flavor distribution; D-radar map of meridian distribution; E-“disease-evidence-method-medicine” correlation map.

图 10 特发性肺纤维化靶向中药预测

Fig. 10 Prediction of idiopathic pulmonary fibrosis targeting traditional Chinese medicines

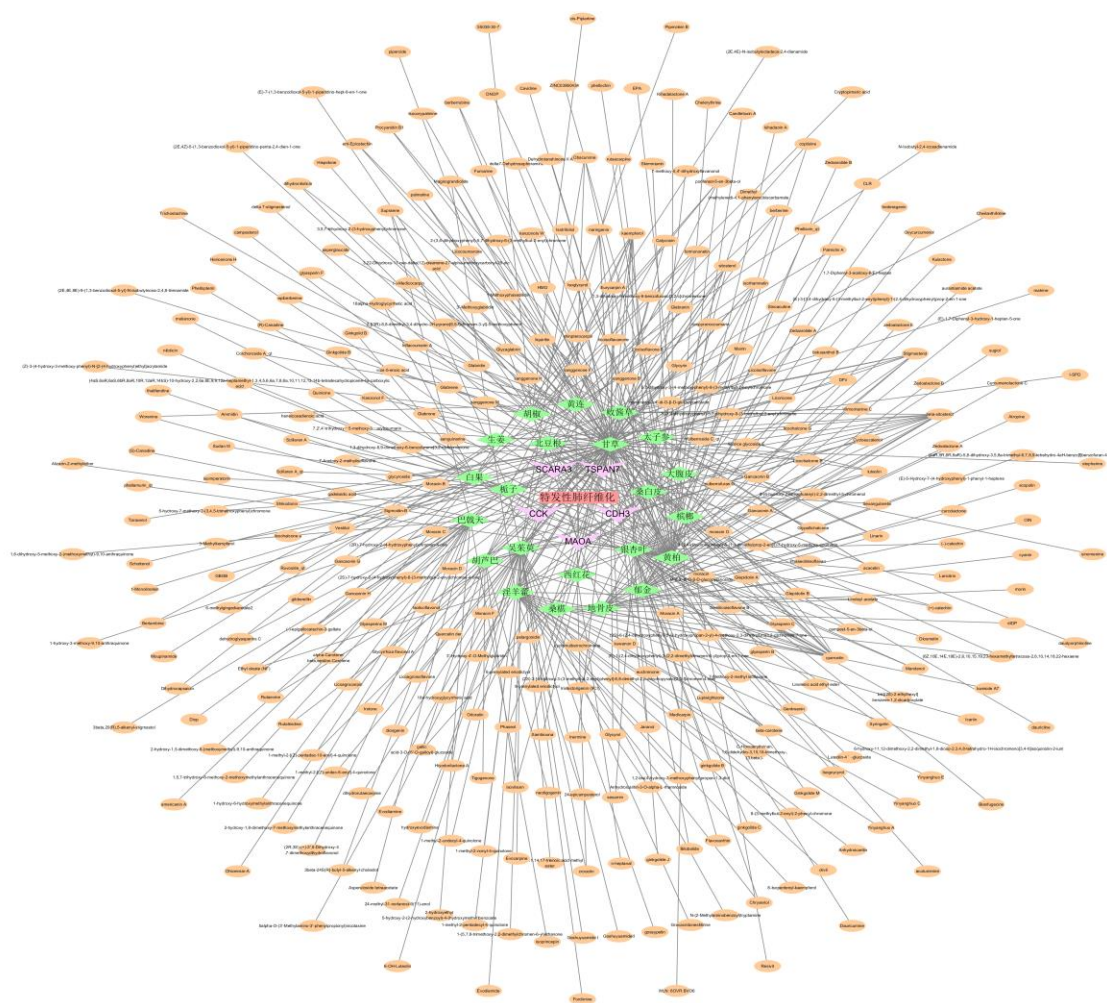


图 11 特发性肺纤维化靶向中药活性成分预测

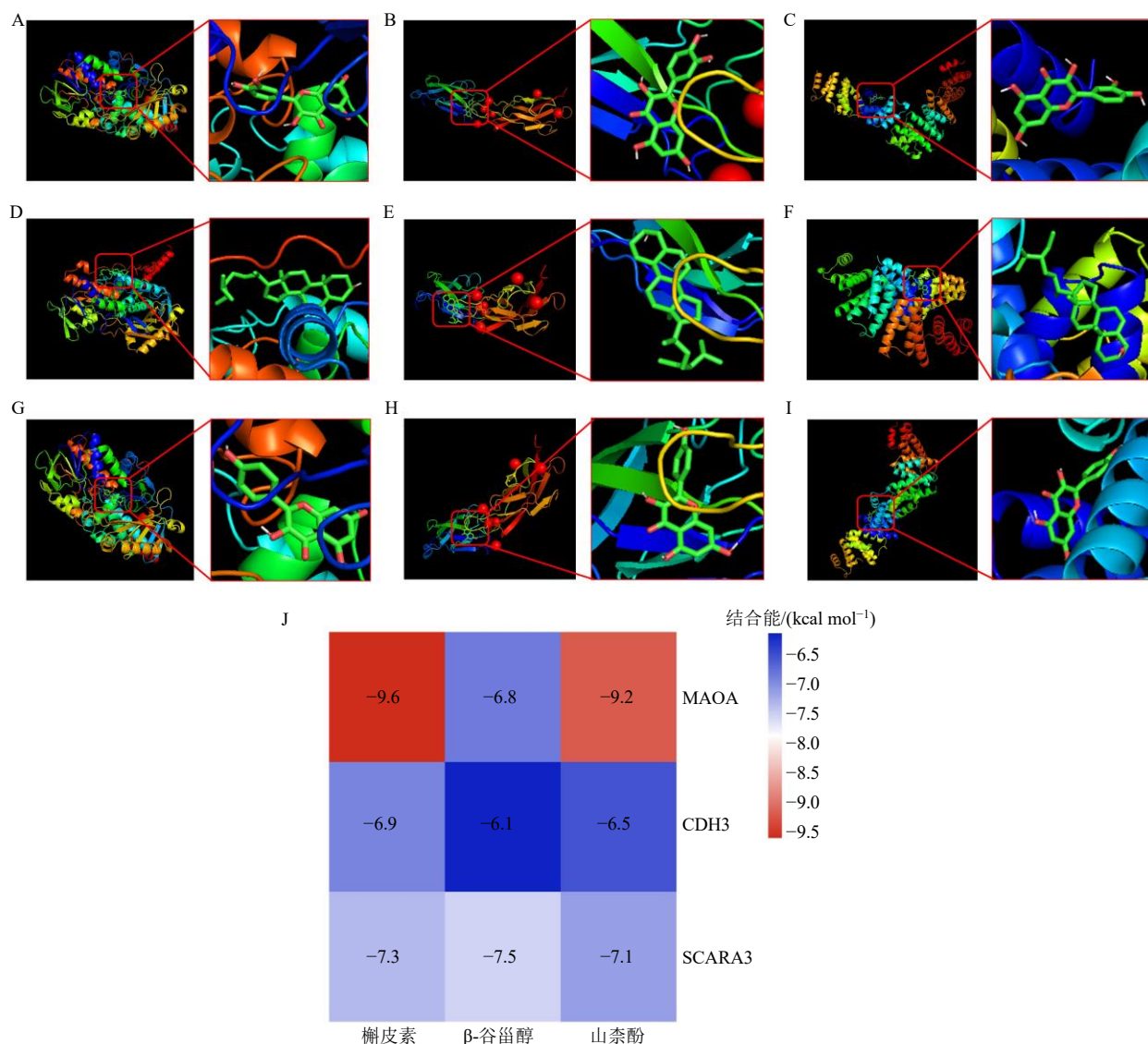
Fig. 11 Prediction of active ingredients in herbs for idiopathic pulmonary fibrosis

肌成纤维细胞是一种病理性纤维化效应物，主要来源于成纤维细胞，而近年发现的肌成纤维细胞去分化潜力，为纤维化疾病的治疗开拓了新思路^[29]。研究表明，肌成纤维细胞在压力疗法下，ITGBL1 的表达受抑制，可导致肌成纤维细胞向成纤维细胞去分化^[30]。本研究经动物实验证实，ITGBL1 在 IPF 中呈高表达趋势。结合文献推测，ITGBL1 表达上调可能抑制肌成纤维细胞的去分化能力，造成 ECM 重塑，发生组织纤维化。

氧化应激也与 IPF 的发生发展密切相关，IPF 的细胞成分大多可出现氧化剂与抗氧化剂不平衡的情况；在 IPF 患者身上也发现了大量氧化应激标志物^[31]。MAOA 是氧化应激的重要来源，而 MAOA 抑制剂可预防心脏收缩功能障碍和纤维化^[32]。本研究通过生物信息学及动物实验验证发现 MAOA 在 IPF 中呈高水平表达，推测其可能通过增加氧化应

激，促进成纤维细胞的活化与增殖，造成 ECM 重塑，促进组织纤维化。

除了 IPF 的特征基因，GO 与 KEGG 富集分析结果也靶向了 ECM 重塑。富集分析提示，含胶原蛋白的细胞外基质、整合素结合、细胞因子受体活性、蛋白质的消化和吸收、趋化因子信号通路、ECM 与受体的相互作用、糖尿病并发症中的 AGE-RAGE 信号通路、PPAR 信号通路等可能与 IPF 密切相关。如上所述，ECM 作为一种大分子网络，含有丰富的胶原蛋白与纤连蛋白，而胶原蛋白合成与降解失调会造成 ECM 过度积累，诱发 IPF^[20-21]。此外，趋化因子及细胞因子也被证实参与了 IPF 的发病。趋化因子可调节免疫和组织的稳态、损伤与修复；趋化因子受体信号通路可诱导成纤维细胞、肺泡巨噬细胞等肺驻留细胞的活化与增殖，而肺泡巨噬细胞又是 IPF 细胞因子和趋化因子的重要来源^[33]。临床研



A~C-槲皮素与 MAOA、CDH3、SCARA3 的分子对接图；D~F: β-谷甾醇与 MAOA、CDH3、SCARA3 的分子对接图；G~I: 山柰酚与 MAOA、CDH3、SCARA3 的分子对接图；J-各目标成分与目标蛋白的结合能。

A—C-molecular docking of quercetin with MAOA, CDH3 and SCARA3; D—F-molecular docking of β-sitosterol with MAOA, CDH3 and SCARA3; G—I-molecular docking of kaempferol with MAOA, CDH3 and SCARA3; J-binding energies of active ingredients with characteristic genes.

图 12 中药活性成分与特发性肺纤维化特征基因的分子对接

Fig. 12 Molecular docking of active ingredients of traditional Chinese medicines with characteristic genes of idiopathic pulmonary fibrosis

究发现 IPF 患者支气管肺泡灌洗液中的 CXC 趋化因子配体 6 (C-X-C motif chemokine 6, CXCL6) 水平升高, 且与生存率低有关系; 分泌细胞中 CXCL6 表达水平升高可驱动成纤维细胞合成胶原蛋白^[34]。AGE 是蛋白质与脂质老化时与氧化剂发生非酶促反应的结果; 而 RAGE 作为 AGE 的受体, 与肺纤维化和肺泡稳态有关^[35]。研究发现, IPF 患者肺部的 AGE 增加, RAGE 减少, AGEs-RAGEs 比例增加^[35]。在 IPF 患者与模型鼠的肺脏中, PPAR γ 的表

达均被显著抑制^[36]。因此, 富集分析结果提示, IPF 发病机制可能集中在 ECM 重塑方面, 与细胞因子/趋化因子等炎症反应、氧化应激相关。

而除了传统的致病基因、功能通路的探索, 免疫细胞浸润也是近些年研究的重要方向。免疫应答是 IPF 疾病发展过程中的关键环节, 研究 IPF 中免疫系统的作用可能有助于研发出改变疾病进程的、靶向免疫调节的疗法^[37]。本研究发现, 调节性 T 细胞、M1 型巨噬细胞、静息的树突状细胞、CD8⁺T 细

胞、静息的记忆性 CD4⁺ T 细胞、活化的记忆性 CD4⁺ T 细胞等免疫细胞在对照组和 IPF 组中存在浸润差异 ($P < 0.05$)。在 IPF 患者的 T 细胞亚群中, CD8⁺ T 细胞的百分比是上升的^[38]。CD4⁺ T 细胞也被发现与纤维化密切相关。CD4⁺ T 细胞的程序性细胞死亡-1 (programmed cell death-1, PD-1) 上调可借助信号转导和转录激活因子 3 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3) 介导 IL-17A 与转化生长因子- β 1 (transforming growth factor- β 1, TGF- β 1) 的产生, 发挥促肺纤维化的作用^[39]。因此, IPF 的特征基因也可能通过调节免疫反应影响疾病的发展。

本研究发现, IPF 的特征基因与免疫细胞浸润均存在一定的相关性, 如 CDH3 可能与活化的记忆性 CD4⁺ T 细胞、调节性 T 细胞关系密切。相同地, 也有研究指出肺癌患者 CDH3 的表达与 CD4⁺ T 细胞、调节性 T 细胞的浸润呈正相关^[23]。近年来也发现, *FNDC1* 基因的多态性可能是川崎病患者冠状动脉瘤形成的危险因素; 而川崎病作为一种免疫性疾病, 其发病机制主要是免疫细胞过度激活与炎症因子产生, 导致了免疫系统失衡^[40]。可见, *FNDC1* 也可能与疾病的免疫应答有一定的相关性。

综上所述, 在 IPF 疾病机制探讨部分, 本研究通过特征基因、通路富集分析、免疫浸润分析、特征基因与免疫浸润相关性分析以及动物实验验证等方法, 挖掘了 CDH3、MAOA、*FNDC1*、*ITGBL1* 和 *SCARA3* 等 IPF 特征基因, 以及含胶原蛋白的细胞外基质、细胞因子受体活性、ECM 与受体的相互作用、糖尿病并发症中的 AGE-RAGE 信号通路等生物过程, 提示 IPF 特征基因可能靶向了 ECM 重塑机制, 也可能通过调节 EMT、肌成纤维细胞去分化、氧化应激、炎症、免疫应答等生物过程, 影响 ECM 的重塑。

在探索 IPF 发病机制的基础上, 本研究还预测了靶向 IPF 特征基因的中药及活性成分。但中药的挖掘与运用并非通过简单的、机械性的计算机分析可得, 而是从“理法方药”出发, 寻求符合中医理论与临床实际的药物。从中医理论而言, IPF 属于“肺痹”“肺痿”的范畴, “虚”与“瘀”是病机重点^[5-6]。曹世宏认为病机主要为肺燥阴伤与肺气虚冷, 二者相互兼夹、常可致瘀、且易生水饮, 当治以滋阴清热、健脾温肺, 兼活血化痰与利水^[13]。于睿智等^[14]提出 IPF 的病机可概括为久病正气亏虚,

致痰、瘀、毒互结, 治当虚实兼顾, 补虚、祛痰、解毒与化痰相结合。此外, 肺气郁闭, 失于肃降, 气机上逆, 则发为气喘, 为 IPF 最典型的症状, 治当降气平喘。本研究预测的中药, 其药性以寒、平、温居多, 适用于肺燥阴伤之病性热者或肺气虚冷之病性寒者。药味以甘、苦、辛居多。甘能补、苦能泻、辛能散能行, 适用于虚者、热者、瘀者、毒者。归经以肝、脾、肺、肾居多。入肝可疏肝行气辅肺气宣降, 亦可行气散瘀; 入脾、肺可健脾温肺; 入肺、肾者则可补益肺气、降气平喘, 亦可补益肾气、纳气平喘。具体的中药包括地骨皮、太子参、西红花和桑白皮等。地骨皮功善清虚热、泻肺火; 太子参擅长益气健脾、生津润肺; 西红花可活血化瘀、凉血解毒; 桑白皮能泻肺平喘、利水消肿。因此, 本研究预测的中药符合 IPF 的病机、病证与病症, 也符合 IPF 的临床用药逻辑, 可为 IPF 的临床中药运用提供思路, 也对新药研发具有一定的参考价值。

而本研究还根据潜在中药预测了药物的活性成分。结果发现槲皮素、 β -谷甾醇与山柰酚等中药活性成分在研发成为 IPF 的治疗药物方面具有极大的潜力。槲皮素可抑制 ECM 的形成, 减少肺纤维化^[41]。槲皮素还可调节 TGF- β -Smad2/3 通路, 以影响巨噬细胞极性和巨噬细胞到肌成纤维细胞的转变, 缓解矽肺小鼠的肺纤维化^[42]。 β -谷甾醇是植物界中最丰富的甾醇之一, 可抑制人肺泡上皮细胞中胶原蛋白和纤连蛋白等纤维化蛋白的表达以及下调 EMT 标志物, 从而缓解肺部纤维化^[43]。山柰酚是源自草本植物的黄酮类化合物, 可发挥抗氧化应激、抗炎和抗纤维化等作用, 有效降低大鼠肝纤维化模型的 α -平滑肌肌动蛋白和 I 型胶原蛋白的表达^[44]。由此可见, 槲皮素、 β -谷甾醇与山柰酚均可能有抗肺部纤维化的作用, 其更深层次的机制也可能与改善 ECM 重塑有关。此外, 本研究还对中药活性成分与 IPF 特征基因进行了分子对接, 结果提示槲皮素、 β -谷甾醇、山柰酚与 MAOA、CDH3、*SCARA3* 之间可良好结合, 以槲皮素和 MAOA 的结合能最佳。这提示了中药活性成分可能自发结合 IPF 特征基因的蛋白结构, 影响肺组织 ECM 重塑, 发挥治疗 IPF 的作用。

5 结论

本研究挖掘了 CDH3、MAOA、*FNDC1*、*ITGBL1* 和 *SCARA3* 等 IPF 特征基因, 认为其可能靶向了 ECM 重塑机制, 也可能通过 EMT、肌成纤维细胞

去分化、氧化应激等影响 ECM 重塑。结合 IPF “虚”和“瘀”的中医病机特点以及“养阴清热、益气补阳、活血化瘀”等治则，本研究靶向 IPF 特征基因预测了地骨皮、太子参与西红花等中药供临床参考。而中药活性成分，如槲皮素、 β -谷甾醇与山柰酚等也可能通过改善 ECM 重塑发挥抗纤维化的作用。

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, Richeldi L, *et al.* Idiopathic pulmonary fibrosis (an update) and progressive pulmonary fibrosis in adults: An official ATS/ERS/JRS/ALAT clinical practice guideline [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2022, 205(9): e18-e47.
- [2] Koudstaal T, Wijssenbeek M S. Idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *La Presse Médicale*, 2023, 52(3): 104166.
- [3] Raghu G, Chen S Y, Yeh W S, *et al.* Idiopathic pulmonary fibrosis in US Medicare beneficiaries aged 65 years and older: Incidence, prevalence, and survival, 2001-11 [J]. *Lancet Respir Med*, 2014, 2(7): 566-572.
- [4] Spagnolo P, Kropski J A, Jones M G, *et al.* Idiopathic pulmonary fibrosis: Disease mechanisms and drug development [J]. *Pharmacol Ther*, 2021, 222: 107798.
- [5] 梁元钰, 吕晓东, 庞立健, 等. 基于“金水相生”理论探讨“肺生血”与特发性肺纤维化的效应机制 [J]. *中华中医药杂志*, 2023, 38(10): 4645-4649.
- [6] 庞立健, 臧凝子, 王琳琳, 等. 肺间质纤维化重症病机内涵 (肺虚络瘀) 初探 [J]. *中华中医药杂志*, 2013, 28(12): 3497-3499.
- [7] 罗成, 彭艳茹, 李舒, 等. 中医经典方剂治疗特发性肺间质纤维化的贝叶斯网状 Meta 分析 [J]. *中国医院用药评价与分析*, 2023, 23(11): 1338-1343.
- [8] 马嘉琦, 徐才轩, 毛果, 等. 中药注射液治疗特发性间质性肺炎的网状 Meta 分析 [J]. *中草药*, 2024, 55(17): 5938-5951.
- [9] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 1-403.
- [10] 钟赣生. 中药学 [M]. 第 4 版. 北京: 中国中医药出版社, 2016.
- [11] 广东省食品药品监督管理局. 广东省中药材标准 (第一册) [M]. 广州: 广东科技出版社, 2004: 1-222.
- [12] 陆岩, 王小云. 归肾丸治疗多囊卵巢综合征的网络药理学作用机制 [J]. *中药新药与临床药理*, 2021, 32(6): 825-833.
- [13] 智屹惠. 曹世宏教授论治肺间质纤维化 [J]. *南京中医药大学学报: 自然科学版*, 2001(3): 185-186.
- [14] 于睿智, 庞立健, 王天娇, 等. 从虚、毒、痰、瘀辨治特发性肺纤维化 [J]. *中华中医药杂志*, 2022, 37(10): 5815-5818.
- [15] 怀宝庚, 姚鹏宇, 梁景乾, 等. 刘德山教授基于“疏散通路”法治特发性肺纤维化经验 [J]. *现代中西医结合杂志*, 2022, 31(6): 825-829.
- [16] Richeldi L, Collard H R, Jones M G. Idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Lancet*, 2017, 389(10082): 1941-1952.
- [17] Hewlett J C, Kropski J A, Blackwell T S. Idiopathic pulmonary fibrosis: Epithelial-mesenchymal interactions and emerging therapeutic targets [J]. *Matrix Biol*, 2018, 71/72: 112-127.
- [18] Chen Y Q, Yuan S, Cao Y Y, *et al.* Gasotransmitters: Potential therapeutic molecules of fibrotic diseases [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 2021: 3206982.
- [19] Chanda D, Otoupalova E, Smith S R, *et al.* Developmental pathways in the pathogenesis of lung fibrosis [J]. *Mol Aspects Med*, 2019, 65: 56-69.
- [20] Karamanos N K, Theocharis A D, Piperigkou Z, *et al.* A guide to the composition and functions of the extracellular matrix [J]. *FEBS J*, 2021, 288(24): 6850-6912.
- [21] Tomos I P, Tzouvelekis A, Aidinis V, *et al.* Extracellular matrix remodeling in idiopathic pulmonary fibrosis. It is the ‘bed’ that counts and not ‘the sleepers’ [J]. *Expert Rev Respir Med*, 2017, 11(4): 299-309.
- [22] Brandli A, Khong F L, Kong R C K, *et al.* Transcriptomic analysis of choroidal neovascularization reveals dysregulation of immune and fibrosis pathways that are attenuated by a novel anti-fibrotic treatment [J]. *Sci Rep*, 2022, 12(1): 859.
- [23] Ma W R, Hu J H. Downregulated CDH3 is correlated with a better prognosis for LUAD and decreases proliferation and migration of lung cancer cells [J]. *Genes Genomics*, 2024, 46(6): 713-731.
- [24] Chavula T, To S, Agarwal S K. Cadherin-11 and its role in tissue fibrosis [J]. *Cells Tissues Organs*, 2023, 212(4): 293-303.
- [25] Le Borgne-Rochet M, Angevin L, Bazellieres E, *et al.* P-cadherin-induced decorin secretion is required for collagen fiber alignment and directional collective cell migration [J]. *J Cell Sci*, 2019, 132(21): jcs233189.
- [26] Sgalla G, Iovene B, Calvello M, *et al.* Idiopathic pulmonary fibrosis: Pathogenesis and management [J]. *Respir Res*, 2018, 19(1): 32.
- [27] Paolillo M, Schinelli S. Extracellular matrix alterations in metastatic processes [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(19): 4947.
- [28] Kim J, You H J, Youn C. SCARA3 inhibits cell proliferation and EMT through AKT signaling pathway in lung cancer [J]. *BMC Cancer*, 2022, 22(1): 552.
- [29] Xu R H, Wu M, Wang Y W, *et al.* Mesenchymal stem cells reversibly de-differentiate myofibroblasts to fibroblast-

- like cells by inhibiting the TGF- β -SMAD2/3 pathway [J]. *Mol Med*, 2023, 29(1): 59.
- [30] Zhao J L, Yang S, Xu Y B, *et al.* Mechanical pressure-induced dedifferentiation of myofibroblasts inhibits scarring via SMYD3/ITGBL1 signaling [J]. *Dev Cell*, 2023, 58(13): 1139-1152.e6.
- [31] Estornut C, Milara J, Bayarri M A, *et al.* Targeting oxidative stress as a therapeutic approach for idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 794997.
- [32] Umbarkar P, Singh S, Arkat S, *et al.* Monoamine oxidase-a is an important source of oxidative stress and promotes cardiac dysfunction, apoptosis, and fibrosis in diabetic cardiomyopathy [J]. *Free Radic Biol Med*, 2015, 87: 263-273.
- [33] Russo R C, Quesniaux V F J, Ryffel B. Homeostatic chemokines as putative therapeutic targets in idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Trends Immunol*, 2023, 44(12): 1014-1030.
- [34] Bahudhanapati H, Tan J N, Apel R M, *et al.* Increased expression of CXCL6 in secretory cells drives fibroblast collagen synthesis and is associated with increased mortality in idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Eur Respir J*, 2024, 63(1): 2300088.
- [35] Machahua C, Montes-Worboys A, Llatjos R, *et al.* Increased AGE-RAGE ratio in idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Respir Res*, 2016, 17(1): 144.
- [36] Wei A, Gao Q, Chen F, *et al.* Inhibition of DNA methylation de-represses peroxisome proliferator-activated receptor- γ and attenuates pulmonary fibrosis [J]. *Br J Pharmacol*, 2022, 179(7): 1304-1318.
- [37] Shenderov K, Collins S L, Powell J D, *et al.* Immune dysregulation as a driver of idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *J Clin Invest*, 2021, 131(2): e143226.
- [38] Wei X M, Jin C J, Li D W, *et al.* Single-cell transcriptomics reveals CD8⁺ T cell structure and developmental trajectories in idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Mol Immunol*, 2024, 172: 85-95.
- [39] Celada L J, Kropski J A, Herazo-Maya J D, *et al.* PD-1 up-regulation on CD4⁺ T cells promotes pulmonary fibrosis through STAT3-mediated IL-17A and TGF- β 1 production [J]. *Sci Transl Med*, 2018, 10(460): eaar8356.
- [40] Lin K, Zhang L Y, Wang Y S, *et al.* FNDC1 polymorphism (rs3003174 C > T) increased the incidence of coronary artery aneurysm in patients with Kawasaki disease in a southern Chinese population [J]. *J Inflamm Res*, 2021, 14: 2633-2640.
- [41] Geng F, Xu M Y, Zhao L, *et al.* Quercetin alleviates pulmonary fibrosis in mice exposed to silica by inhibiting macrophage senescence [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 912029.
- [42] Geng F, Zhao L, Cai Y H, *et al.* Quercetin alleviates pulmonary fibrosis in silicotic mice by inhibiting macrophage transition and TGF- β -Smad2/3 pathway [J]. *Curr Issues Mol Biol*, 2023, 45(4): 3087-3101.
- [43] 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.
- [44] Cao R, Cao C, Hu X, *et al.* Kaempferol attenuates carbon tetrachloride CCl₄-induced hepatic fibrosis by promoting ASIC1a degradation and suppression of the ASIC1a-mediated ERS [J]. *Phytomedicine*. 2023, 121: 155125.

[责任编辑 潘明佳]