DOI:10.13210/j.cnki.jhmu.20220817.002
网络出版地址:https://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1049.R.20220817.1330.004.html

基于生物信息学和体外实验探讨粉防己碱治疗早期矽肺的关键通路

梁 超[1]，周家伟[1]，刘亚锋[1]，郭健强[1]，王清森[1]，苏忆欣[1]，邢应如[4]，胡春晓[1]，谢 军[5]，吴 静[1,2,3]✉,胡 东[1,2,3]✉

(1.安徽理工大学医学院,安徽 淮南 232001;2.安徽省职业健康安全工程实验室,安徽 淮南 232001;3.工业粉尘深度净化与职业健康安全安徽省教育厅重点实验室,安徽 淮南 232001;4.安徽中科庚久医院检验科,安徽 合肥 230000;5.安徽理工大学附属肿瘤医院/淮南东方医院集团肿瘤医院,安徽 淮南 232033)

[摘要] **目的**:基于生物信息学和体外实验探究粉防己碱治疗早期矽肺发展的关键通路。**方法**:通过文献挖掘收集矽肺患者的差异表达基因;利用高通量基因表达数据库(GEO)收集二氧化硅滴注小鼠的差异表达基因;借助在线人类孟德尔遗传数据库(OMIM)、GeneCards、比较毒物基因组学数据库(CTD)获取矽肺相关的疾病靶点;分别将差异表达基因和疾病靶点通过R语言及Metascape平台进行基因本体(GO)富集分析和京都基因与基因组百科全书(KEGG)富集分析;使用薛定谔(Schrödinger)及Pymol软件进行分子对接及修饰;制备二氧化硅刺激的巨噬细胞和上皮细胞模型,通过PCR技术和蛋白免疫印迹(WB)验证分析结果。**结果**:筛选出矽肺病人差异表达基因2 065个,滴注二氧化硅大鼠差异表达基因2 291个,矽肺相关疾病靶点803个。GO富集分析主要涉及G蛋白偶联受体结合、调节炎症反应、参与免疫反应等。KEGG通路富集分析主要包括细胞外基质-受体相互作用(ECM-receptor interaction)、TNF信号通路、IL-17信号通路等。不同来源的差异基因和疾病靶点同时筛选出IL-17信号通路。分子对接结果表明矽肺药物粉防己碱与IL-17信号通路中的RAF/MEK/ERK通路有良好的结合效果。细胞实验表明粉防己碱通过调控RAF/MEK/ERK通路降低巨噬细胞中TNF-α、TGF-β等炎症因子的表达,同时抑制上皮细胞中上皮间质转化及炎症因子表达。**结论**:粉防己碱通过RAF/MEK/ERK通路调控炎症反应和上皮间质转化(EMT)从而影响早期矽肺进展。

[关键词] 矽肺;粉防己碱;生物信息学;分子对接;信号通路
[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1007-1237(2022)23-1792-11

Exploring the key pathways of tetrandrine in the treatment of early silicosis based on bioinformatics and *in vitro* experiments

LIANG Chao[1], ZHOU Jia-wei[1], LIU Ya-feng[1], GUO Jian-qiang[1], WANG Qing-sen[1], SU Yi-xin[1], XING Ying-ru[4], HU Chun-xiao[1], XIE Jun[5], WU Jing[1,2,3]✉, HU Dong[1,2,3]✉

(1. *School of Medicine, Anhui University of Science and Technology, Huainan* 232001, *China*; 2. *Anhui Occupational Health and Safety Engineering Laboratory, Huainan* 232001, *China*; 3. *Key Laboratory of Advanced Industrial Dust Purification and Occupational Health and Safety of Education Department, Huainan* 232001, *China*; 4. *Department of Clinical Laboratory, Gengjiu Hospital of Anhui Zhongke, Hefei* 232001, *China*; 5. *Affiliated Cancer Hospital of Anhui University of Science and Technology/Huainan Oriental Hospital Group Cancer Hospital, Huainan* 232001, *China*)

[*Foundation Project*]: *National Natural Science Foundation of China* (81971483); *Anhui University Collaborative Innovation Project* (*GXXT*-2020-058); *Anhui University of Science and Technology Innovation and Entrepreneurship Project* (2021*CX*2125, 2021*CX*2126, 2021*CX*2124)

[*Author*]: *LIANG Chao*, *E-mail*: 799659735@*qq.com*.
[*Correspondence to*]: *WU Jing*, *Professor*, *E-mail*: *wujing*8008@126.*com*; *HU Dong*, *Professor*, *E-mail*: *austhudong*@126.*com*.

Received: 2022-06-19 *Revised*: 2022-08-15 *JHMU*, 2022;28(23):1792-1802

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81971483);安徽省高校协同创新项目(GXXT -2020-058);安徽理工大学大学生创新创业项目(2021CX2125, 2021CX2126,2021CX2124)

[作者简介] 梁超,E-mail:799659735@qq.com。
[通讯作者] 吴静,教授,E-mail:wujing8008@126.com;胡东,教授,E-mail:austhudong@126.com。

[收稿日期] 2022-06-19 [修回日期] 2022-08-15 网络出版时间:2022-08-18 08:37:45

View from specialist: It is creative, and of certain scientific and educational value.

[ABSTRACT] **Objective**: Exploring the key pathways affecting the development of early silicosis based on bioinformatics and in vitro experiments. **Method**: Collecting differentially expressed genes in silicosis patients through literature mining; Collecting differentially expressed genes in silicon dioxide infusion mice by using a high-throughput gene expression database (GEO); Obtaining disease targets related to silicosis by means of online human Mendelian genetic database (OMIM), GeneCards and comparative toxicgenomics database (CTD); differentially expressed genes and disease targets were subjected to gene ontology (GO) enrichment analysis and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genome (KEGG) enrichment analysis via R-package and Metascape platforms, respectively. The Schrödinger and Pymol software were used for molecular docking and modification. Silicon dioxide-stimulated macrophages and epithelial cells were modeled and analyzed by PCR and western blot (WB). **Result**: 2065 differentially expressed genes in silicosis patients, 2 291 differentially expressed genes in rat infused with silicon dioxide, and 803 targets for silicosis-related diseases were screened out. GO enrichment analysis mainly involves G protein-coupled receptor binding, the regulation of inflammatory response, and participation in immune response. The enrichment analysis of KEGG pathway mainly included ECM-receptor interaction, TNF signaling pathway, and IL-17 signaling pathway. IL-17 signaling pathway was screened out from different genes and disease targets, indicating that IL-17 signaling pathway might be the key pathway for the development of silicosis. Molecular docking results showed that the silicosis drug tetrandrine had good binding effect with the RAF/MEK/ERK pathway in the IL-17 signaling pathway. Cellular experiments showed that tetrandrine reduced the expression of inflammatory factors such as IL-6 and TGF-β in macrophages by regulating the RAF/MEK/ERKpathway, and inhibited the epithelial-mesenchymal transition and expression of inflammatory factors in epithelial cells. **Conclusion**: Tetrandrine regulates the inflammatory response and epithelial-mesenchymal transition (EMT) through the RAF/MEK/ERK pathway and thus affects the early progression of silicosis.

[KEYWORDS] Silicosis; Tetrandrine; Bioinformatics; Molecular docking; signal pathway

矽肺是由于吸入二氧化硅或二氧化硅刺激的肺纤维化疾病,是最常见的职业性疾病之一。中国是矽肺患者最多的国家,平均年确诊病例超过5 000例,死亡病例超过20 000例。全球矽肺患者中欧洲超过300万,美国超过200万[1]。矽肺常与巨噬细胞受体激活、炎症小体有关,二氧化硅吸入肺后被巨噬细胞吞噬,巨噬细胞释放炎症因子刺激上皮细胞向间质细胞转化和成纤维细胞的募集,成纤维细胞被刺激后分化为肌成纤维细胞,产生胶原纤维[2,3]。已证明二氧化硅可以刺激PI3K蛋白激酶调节自噬体积累从而促进矽肺发展[4],也可以通过抑制NF-κB或TGF-β抑制矽肺进程[5],但人们对早期矽肺的关键通路并不清楚,无有效的手段可以进行早期矽肺的识别、诊断和治疗[6],所以对早期矽肺的深入研究有着重要的临床意义和社会意义。

根据矽肺证型的特点,古代中医学家利用中药以补为法,以通为用,通补兼施治疗矽肺,中药防己就是其中之一[7]。防己入药历史悠久,在《神农本草经》《伤寒杂病论》《药性论》等古书中均有记载,防己在《神农本草经》中记载味苦性寒,具有治疗风湿水肿、湿疹脉浮的功效[7]。在现代医疗中具有抗肿瘤,抗风湿性关节炎,保护心血管等作用。研究表明粉防己主要的化学成分是粉防己碱(tetrandrine),为喹啉类生物碱,具有抗肿瘤,抗炎、抗纤维化。抗矽肺等药理作用[7]。临床研究表明粉防己碱素治疗矽肺的临床效果显著,可以改善患者的肺功能水平[8]。同时发现粉防己碱可以减少脂多糖诱导的巨噬细胞的爆发[9],减少氧自由基的产生和肿瘤坏死因子-α(TGF-α)。白介素-6(IL-6)等炎症因子的积累,延缓矽肺前期的炎症阶段,减少胶原纤维的产生,改善肺部纤维化形成[10]。本研究基于前期课题组的中药研究成果,采用矽肺患者基因、二氧化硅滴注小鼠基因和网络药理学三种数据集进行筛选和预测,通过分子对接和体外实验验证,探究粉防己碱治疗早期矽肺的关键通路,为早期矽肺的治疗提供理论依据。

1 资料与方法

1.1 芯片及靶点基因

矽肺患者的相关芯片数据来源于文献,本研究收集了10例矽肺患者和7例正常人的肺组织RNA测序数据进行分析,10例矽肺患者和7例正常人的肺组织均来自于无锡市人民医院,肺组织在肺移植时获得,取样时避开了淋巴结和器官,所有参与者都给出书面知情同意书且获得了南京医科大学机构审查委员会和中国医学科学院基础医学研究所的批准[11]。二氧化硅滴注大鼠的相关芯片数据来自于GEO数据库[12](the Gene Expression Omnibus, GEO, https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/)。在GEO数据库搜索关键词"矽肺",经筛选得到芯片原始数据GSE188520以及平台注释文件GPL25290,其中GSE188520中样本包括6只普通大鼠和6只二氧化硅滴注大鼠。通过使用limma包[13]对上

述芯片数据进行差异化分析，差异基因的筛选条件为$P<0.05$，log(fold change，FC)＞1或＜－1，将筛选后的基因按照log FC绝对值大小进行排序，上调和下调排名前一百的基因进行后续分析。

1.2 矽肺靶点的收集

在OMIM数据库[14]、CTD数据库[15]、GeneCard数据库[16]中以“矽肺”为关键词进行检索，运用靶点交集可视化工具[17]将交集靶点进行提取构建。

1.3 功能富集分析

为说明筛选出的关键基因和靶点参与的信号通路和发挥的生物学功能，使用R studio软件并利用R/ggplot2、limma、pheatmap、ggsci、dplyr包对关键差异基因进行了基因本体分析和信号通路富集分析[18]。

1.4 蛋白质－蛋白质相互作用图

不同基因集筛选出来的通路进行交集得到关键通路，将关键通路相关靶点导入STRING数据库[19]，物种设置为“Home sapiens”，保存下载文件为tsv格式，导入cytoscape 3.8.0进行美化后得到关键蛋白[20]。

1.5 分子对接

在PDB[21]数据库中关键蛋白的格式化学结构，下载为PDB格式。在PubChem [22]中下载粉防己碱的化学结构，保存为SDF格式。利用Schrodinger软件中的Protein Preparation Wizard进行蛋白结构优化，选择保留或删除链、水域和配体等，修复填充丢失的侧链以及进行能量最小化。在Review and Modify选项中进行配体、水位置和电荷校正，在Refine选项中进行最后蛋白结构的优化。通过LigPrep进行配体准备，加氢、去盐、中和带电基团、产生质子化状态最后产生互变异构结构。软件的Ligand Docking模块用于分子对接，通过结合能来评价药物与蛋白结构的亲和力，最后用pymol修饰表现。

1.6 MTS检测细胞凋亡率

用PBS清洗培养皿两遍后，用胰酶消化细胞，根据细胞状态不同选择合适的胰酶消化时间，胰酶消化后吸取到15 mL离心管中，离心5 min，转速为5 000 r/min，离心后上清液倒掉，用PBS清洗再次离心5 min，转速为5 000 r/min。倒上清液后加1 mL培养液制备细胞悬液，准备计数，将细胞接种到96孔板，调整细胞浓度在5×10^3左右，每孔加入培养基100 μL，每个样本重复3～5孔，在37 ℃培养箱培养约6 h后加入不同浓度的药物，放入培养箱24 h后，每孔加入MTS溶液20 μL，再次放入培养箱4 h后测定吸光度值。

1.7 Q-PCR测定细胞炎症因子表达

将细胞样品用PBS洗净加入1 mL Trizol，在冰上放置5 min，吹打混匀后放入1.5 mL无RNA酶EP管中，加入氯仿200 μL，震荡混匀静置10 min。4 ℃12 000 r/min离心15 min，用无RNA酶枪头吸取上清液加入到500 μL异丙醇中震荡静置10 min，4 ℃12 000 r离心10 min收集RNA沉淀，用75%无水乙醇洗涤后离心5 min去上清，自然风干后加入适量DEPC水溶解沉淀。随后上机测RNA浓度，各组RNA量调整到同一水平，配置逆转录体系。逆转录完成后将cDNA、荧光染料和不同引物配置成不同的混合体系上机。

1.8 Western blot检测蛋白表达

将细胞样品用PBS洗涤后，根据细胞量的多少，加入还有蛋白酶抑制剂的RIPA裂解液，4 ℃冰箱放置30 min后，取细胞混合液离心，去上清取沉淀，测量不同组的细胞浓度并调整到同一浓度。各组蛋白用8%SDS-PAGE分离蛋白，在冰水中电转80 min，将蛋白转模至PVDF膜，用BSA封闭液封闭1 h后与一抗结合，放入4 ℃冰箱过夜，洗膜后与二抗结合60 min，再次洗膜后上机，最后获得的电泳条带图[23]。

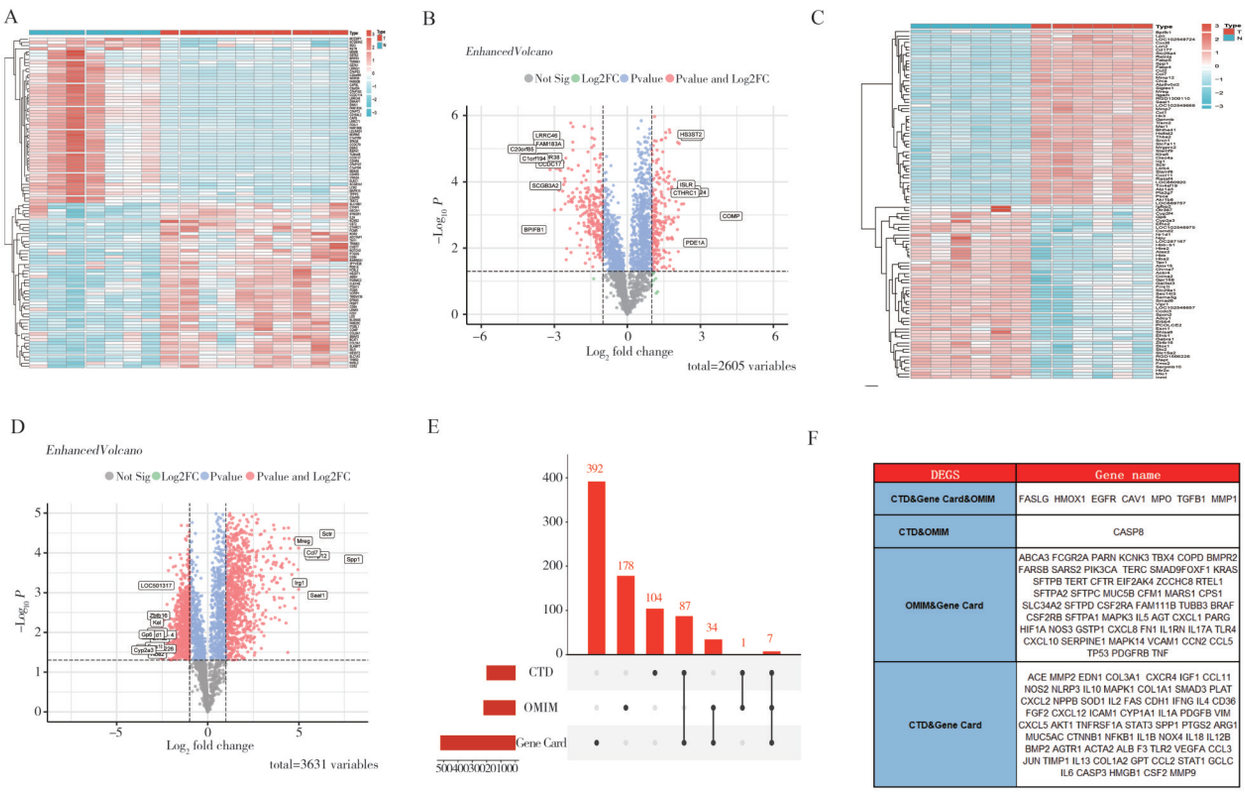
1.9 统计学处理

实验数据以$\bar{x}\pm s$表示。实验结果使用GraphPad Prism 8软件进行统计分析，多组建的比较采用单因素方差(One-Way ANOVA)分析，$P<0.05$为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 矽肺差异基因表达筛选

为了揭露矽肺差异基因表达情况，首先分析7例正常人和10例矽肺患者的肺实质的单细胞测序情况[11]，共获得2 065个差异基因，将数据标准化后根据limma包的分析，分别筛选出上调和下调基因各100个。其次从GEO数据库中下载表达谱芯片数据GSE188520，其中包括了6只正常大鼠和6只二氧化硅诱导大鼠，共获得2 291个差异基因，通过R包的差异基因筛选，分别筛选出上调和下调基因各100个。最后利用网络药理学通过Genecards、CTD、OMIM数据库检索，共得到与矽肺疾病相关803个基因，通过绘制UpSet图，获得交集基因129个，上述基因被认为是与矽肺有密切联系的基因。见图1。



DEGS	Gene name
CTD&Gene Card&OMIM	FASLG HMOX1 EGFR CAV1 MPO TGFB1 MMP1
CTD&OMIM	CASP8
OMIM&Gene Card	ABCA3 FCGR2A PARN KCNK3 TBX4 COPD BMPR2 FARSB SARS2 PIK3CA TERC SMAD9FOXF1 KRAS SFTPB TERT CFTR EIF2AK4 ZCCHC8 RTEL1 SFTPA2 SFTPC MUC5B CFM1 MARS1 CPS1 SLC34A2 SFTPD CSF2RA FAM111B TUBB3 BRAF CSF2RB SFTPA1 MAPK3 IL5 AGT CXCL1 PARG HIF1A NOS3 GSTP1 CXCL8 FN1 IL1RN IL17A TLR4 CXCL10 SERPINE1 MAPK14 VCAM1 CCN2 CCL5 TP53 PDGFRB TNF
CTD&Gene Card	ACE MMP2 EDN1 COL3A1 CXCR4 IGF1 CCL11 NOS2 NLRP3 IL10 MAPK1 COL1A1 SMAD3 PLAT CXCL2 NPPB SOD1 IL2 FAS CDH1 IFNG IL4 CD36 FGF2 CXCL12 ICAM1 CYP1A1 IL1A PDGFB VIM CXCL5 AKT1 TNFRSF1A STAT3 SPP1 PTGS2 ARG1 MUC5AC CTNNB1 NFKB1 IL1B NOX4 IL18 IL12B BMP2 AGTR1 ACTA2 ALB F3 TLR2 VEGFA CCL3 JUN TIMP1 IL13 COL1A2 GPT CCL2 STAT1 GCLC IL6 CASP3 HMGB1 CSF2 MMP9

A、B：矽肺患者差异基因；C、D：二氧化硅滴注大鼠差异基因；E、F：数据库筛选基因

图1　关键矽肺差异基因筛选

Fig 1　Screen of key silicosis differential genes

2.2　矽肺关键差异基因KEGG通路富集分析

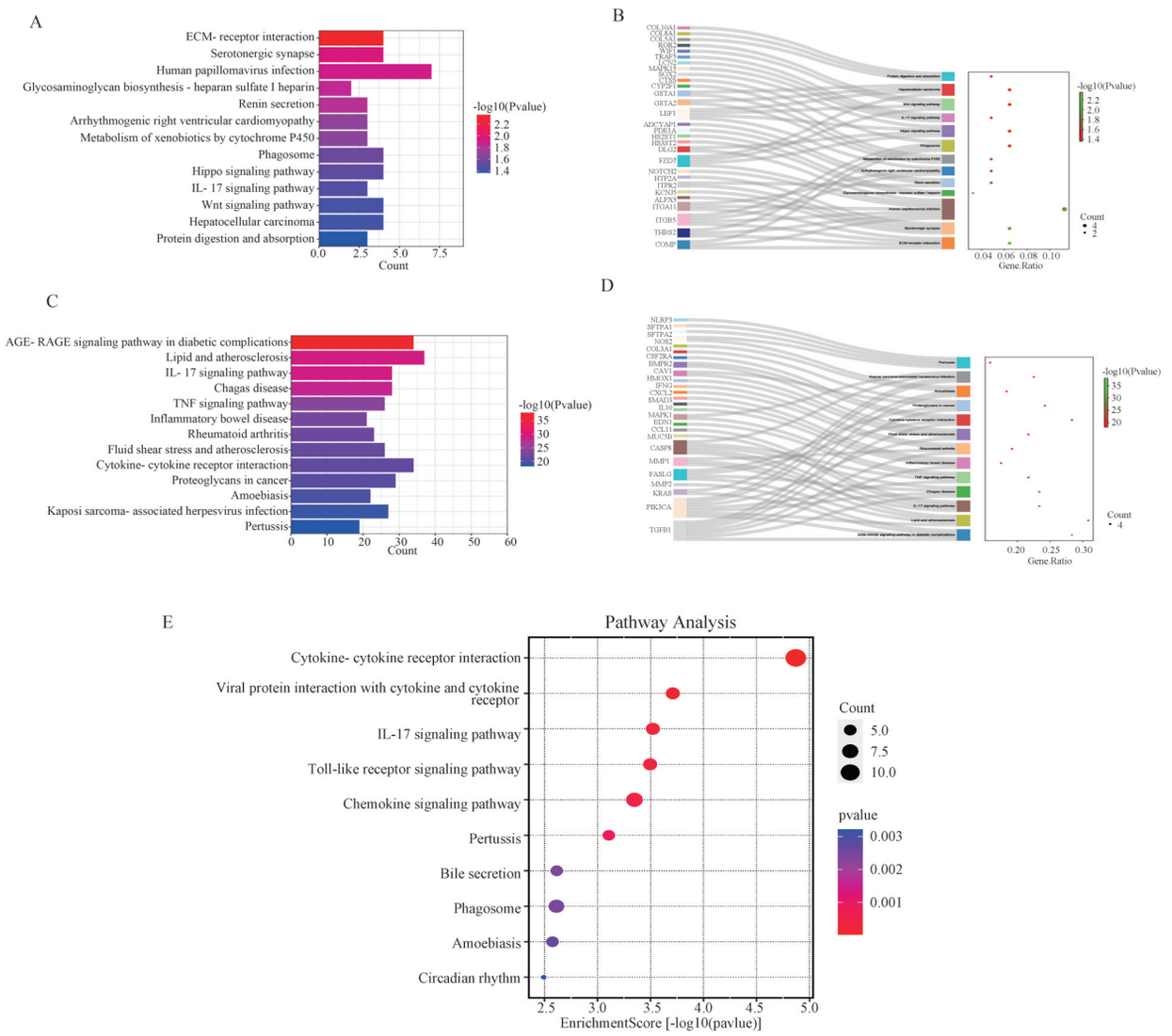
首先将正常人与矽肺患者的差异基因进行KEGG通路富集分析，以$P<0.05$为标准，共筛选出13条KEGG通路，其中细胞外基质-受体相互作用（ECM-receptor interaction）与纤维化的形成有关。人瘤病毒感染（human papillomavirus infection）与细胞周期及凋亡有关，IL-17信号通路（IL-17 signaling pathway）与细胞的生长、分化、炎症等有关。其次将网络药理学数据库的交集基因通路富集后共筛选出166条通路，主要的信号通路有AGE-RAGE信号通路、TNF信号通路、IL-17信号通路、受体因子相互作用信号通路等。最后将矽肺大鼠的差异基因进行通路富集后筛选出22条通路，主要有胃酸分泌、IL-17信号通路、疟疾、阿米巴病等信号通路有关，分析结果表明IL-17信号通路可能是影响矽肺的关键通路。见图2。

2.3　GO富集分析

通过R语言对矽肺患者的差异基因进行GO分析，结果显示共有282个生物过程、33个细胞组分和35个分子功能。其中主要结果包括纤毛运动、细胞外基质组织、T细胞的活化、参与免疫反应中中性粒细胞的活化等生物过程，G蛋白偶联受体结合、胶原蛋白结合、生长因子结合、Wnt蛋白结合等分子功能，活动纤毛、含胶原纤维的细胞外基质、基底膜等细胞组分。其次对网络药理学数据库进行GO分析，结果显示了2 576个生物过程、66个细胞组分和142个分子功能，生物过程包括对脂多糖的反应、细胞对生物刺激的反应、活性氧代谢过程、调节炎症反应等，分子功能包括细胞因子受体结合、蛋白质丝氨酸/苏氨酸激酶活性、受体配体活性、G蛋白偶联受体结合等，细胞组分包括囊泡腔、转录调节因子复合物等，最后对矽肺大鼠的差异基因进行GO分析，包括Toll样受体信号通路、细胞对肿瘤坏死因子反应、细胞对生物刺激反应等生物过程，糖胺聚糖结合、G蛋白偶联受体结合、趋化因子活性等分子功能，细胞组分与上述两组细胞组分大体相同。见图3。

2.4　PPI网络图

PPI网络图中，靶基因用节点表示，靶点之间的连线代表基因之间的相互作用，将最低互动分数设置为最高置信度。将IL-17信号通路所包含的靶基因导入STRING数据库，按照节点之间的交互分数



A、B：矽肺患者差异基因通路分析；C、D：网络数据库筛选基因通路分析；E：二氧化硅滴注大鼠差异基因通路分析

图2　差异基因KEGG通路分析

Fig 2　Analysis of differential gene KEGG pathway

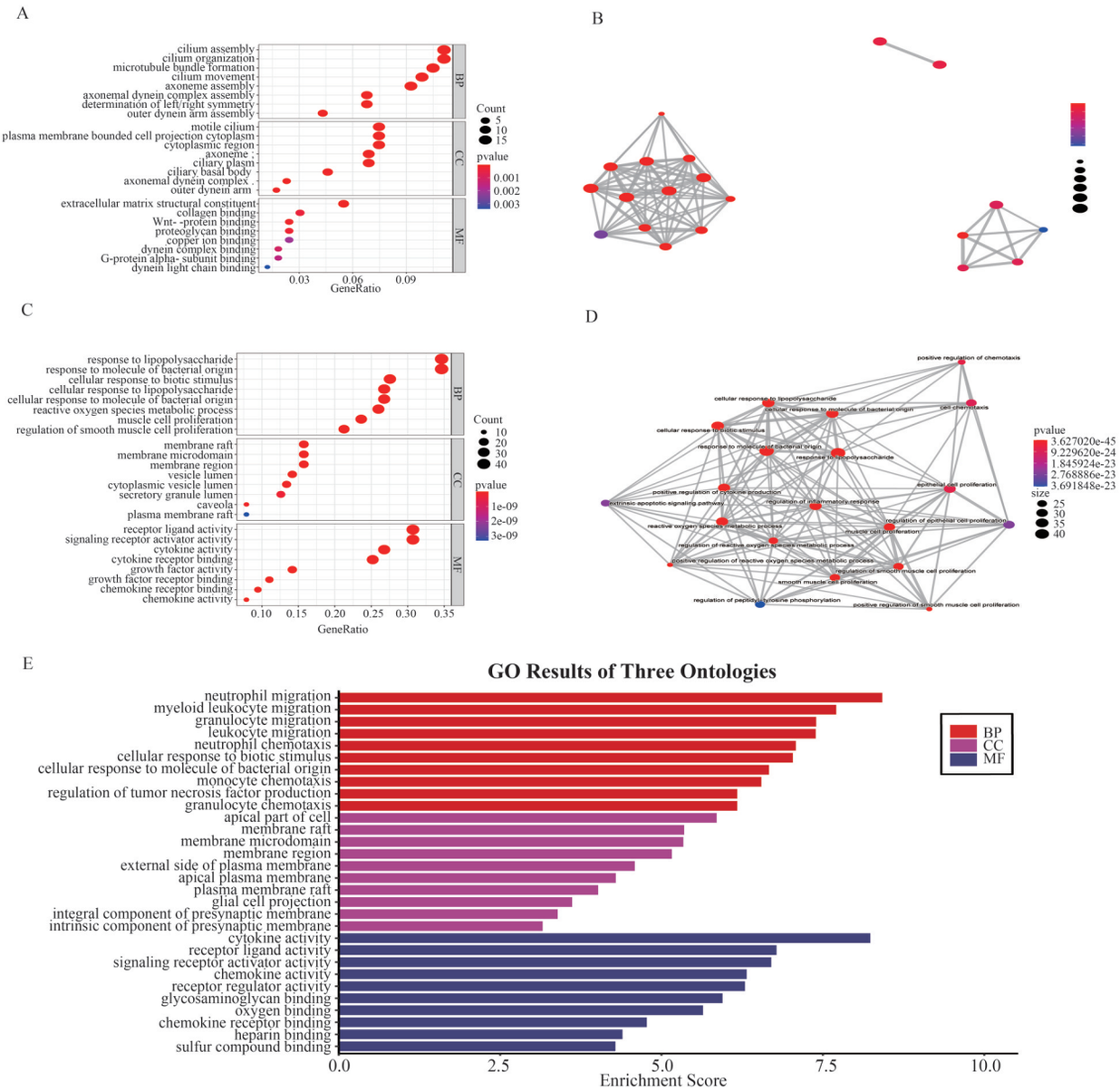
由高到低进行排列，分数较高的靶基因大多与MAPK信号通路有关，且这些靶点大多与炎症过程有关，说明IL-17信号通路中可能起关键作用的是MAPK信号通路，从而促使炎症因子高表达促进矽肺的发展。见图4。

2.5　分子对接结果

将IL-17信号通路的关键蛋白与小分子化合物粉防己碱进行分子对接，确定两者结合位置即活性口袋大小，并显示出小分子和关键蛋白之间氢键作用位置。对接亲和力分数通过薛定谔软件(Schrödinger)计算得出。分子对接结果表明，粉防己碱与MAPK通路中的关键靶点RAF、ERK之间有良好的结合力。以上结果间接证明，粉防己碱可能通过调控MAPK信号通路中的RAF/MEK/ERK通路发挥关键作用，从而对早期矽肺产生影响。见图5。

2.6　细胞实验

2.6.1　粉防己碱对巨噬细胞和上皮细胞凋亡率的影响　在巨噬细胞系THP-1中，随着药物浓度增加，粉防己碱抑制巨噬细胞增殖的能力逐渐增强，当药物浓度为5 μmol/L时，细胞的凋亡率为20%，当药物浓度为10 μmol/L时，细胞的凋亡率为83%，数据显示当加药浓度大于5 μmol/L，细胞凋亡率明显增加，不适合用于细胞实验，在巨噬细胞中加药浓度设置为5 μmol/L是最适浓度。在上皮细胞系BEAS-2B中，随着药物浓度的增强，上皮细胞的凋亡率呈线性增长趋势，在5 μmol/L时，细胞的凋亡率为5%，在10 μmol/L时，细胞的凋亡率为16%。



A、B矽肺患者差异基因GO分析;C、D网络数据库筛选基因GO分析;E二氧化硅滴注小鼠差异基因GO分析

图3　差异基因GO富集分析

Fig 3　GO enrichment analysis of differential gene

根据对不同加药浓度时细胞凋亡率的计算,当加药浓度为20 μmol/L时,是效果最佳的浓度。见表1。

2.6.2　粉防己碱对巨噬细胞和上皮细胞中TNF-α、TGF-β、IL-1β、IL-1α水平的影响　TNF-α主要由巨噬细胞和活化T细胞释放,不但可以刺激其他促纤维因子,还可以刺激TGF-β促进胶原的形成。IL-1β、IL-1α可诱导吸附炎症细胞,调节其他炎症因子,促进成纤维细胞的增殖。利用PCR检测加硅组和加药组中炎症因子的表达。与正常组相比,巨噬细胞加硅组的TNF-α、TGF-β、IL-1β、IL-1α的表达均升高($P<0.05$),其中TNF-α和TGF-β的表达显著上升($P<0.01$),与加硅组相比,粉防己碱组的TNF-α、TGF-β、IL-1β、IL-1α的表达明显下降($P<0.05$),其中TNF-α的表达量下降最为显著$P<0.001$)。与正常组相比,上皮细胞加硅组的TNF-α、TGF-β、IL-1β、IL-1α的表达均升高($P<0.05$),其中TNF-α的表达显著上升($P<0.001$),与加硅组相比,加药组的TNF-α、TGF-β、IL-1β、IL-1α的表达明显下降($P<0.05$)。见表2。

2.6.3　粉防己碱对上皮细胞中E-Cadherin、N-Cadherin和Vimentin水平的影响　上皮间质转化在矽肺进展中起到重要作用,上皮细胞损伤可以导致转

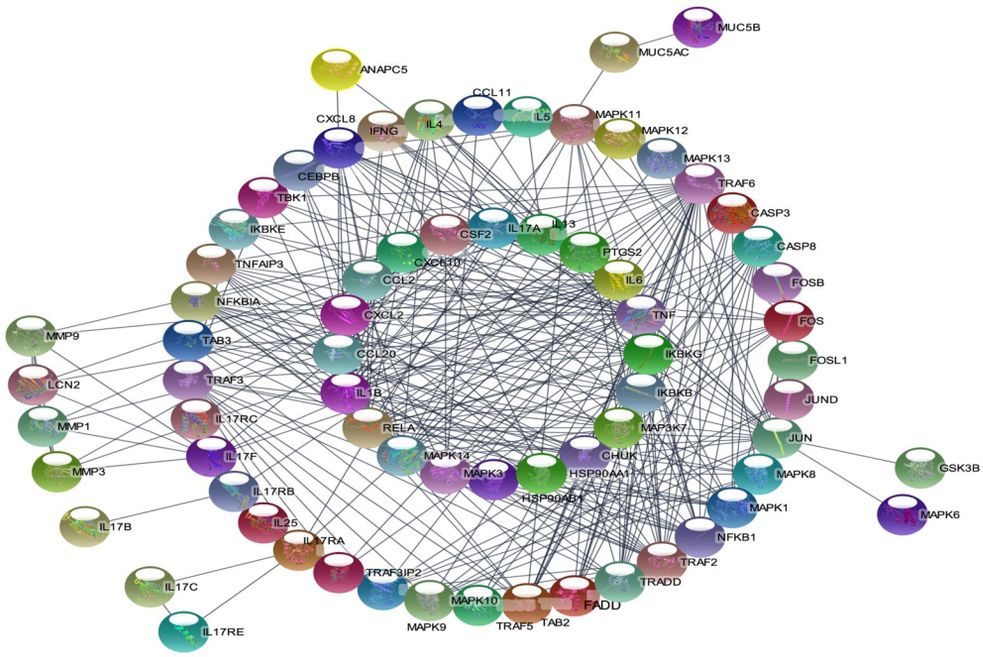
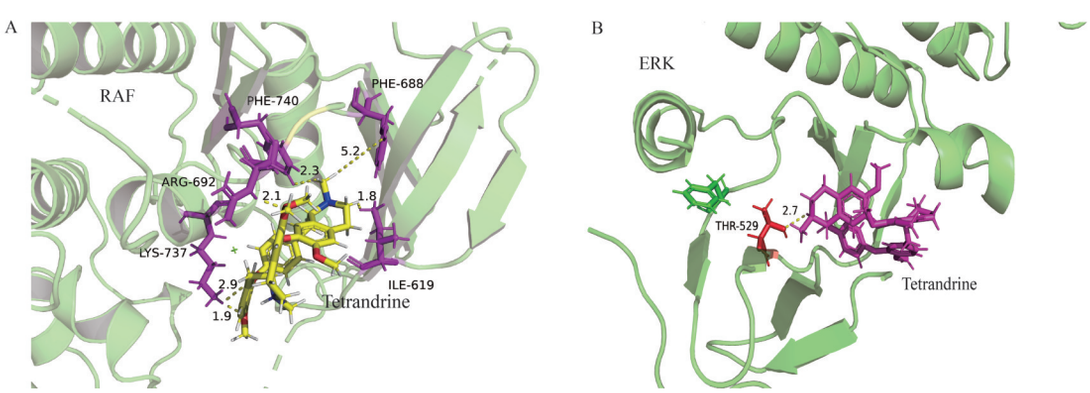


图4　IL-17信号通路蛋白互作图

Fig 4　IL-17 signaling pathway protein interaction



A:粉防己碱与RAF蛋白虚拟对接;B:粉防己碱与ERK蛋白虚拟对接

图5　粉防己碱与通路蛋白对接模式图

Fig 5　Docking of tetrandrine and pathway protein pattern diagram

表1　粉防己碱对巨噬细胞和上皮细胞凋亡的影响($n=3,\bar{x}\pm s$)

Tab 1　Effect of tetrandrine on apoptosis of macrophages and epithelial cells($n=3,\bar{x}\pm s$)

细胞	分组(μmol/L)	凋亡率(%)	F	P
巨噬细胞	5	22.01±1.53	358.30	<0.000 1
	10	82.98±3.80		
	50	87.05±1.20		
	100	83.27±0.88		
上皮细胞	5	4.50±0.82	433.70	<0.000 1
	10	15.68±0.64		
	50	72.51±2.60		
	100	78.18±0.80		

化从而诱发肺纤维化,在转变的过程中,上皮细胞标志物E-cadherin的表达降低,而间充质细胞标志物N-cadherin和vimentin逐渐升高,使上皮细胞向成纤维细胞转化。利用WB检测上皮间质转化相关蛋白的表达,正常组相比,加硅组的E-Cadherin表达显著下降($P<0.01$)、N-Cadherin表达显著上升($P<0.000\ 1$)、Vimentin表达升高但并不显著。相较于加硅组,加药组的E-Cadherin表达显著上升($P<0.01$)、N-Cadherin表达显著下降($P<0.000\ 1$)、Vimentin表达下降但没有统计学意义。结果证明粉防己碱起到抑制上皮细胞进行上皮间质转化的作用。见图6及表3。

表2　各组巨噬细胞和上皮细胞TNF-α、TGF-β、IL-1β、IL-1α炎症因子的表达情况（$n=3,\bar{x}\pm s$）

Tab 2　Expression of TNF-α, TGF-β, IL-1β, IL-1α in macrophages and epithelial cells ($n=3,\bar{x}\pm s$)

细胞	指标	分组	表达量	F	P
巨噬细胞	TGF-α	Control	1	27.78	<0.001
		Silicon	2.92±0.38		
		Tet	1.19±0.47		
	TNF-β	Control	1	65.94	<0.000 1
		Silicon	2.49±0.30		
		Tet	1.47±0.25		
	IL-1α	Control	1	19.45	<0.01
		Silicon	1.41±0.26		
		Tet	0.35±0.25		
	IL-1β	Control	1	27.83	<0.01
		Silicon	1.37±0.25		
		Tet	0.49±0.06		
上皮细胞	TGF-α	Control	1	35.02	<0.001
		Silicon	2.47±0.21		
		Tet	0.78±0.41		
	TNF-β	Control	1	24.91	<0.01
		Silicon	4.43±1.25		
		Tet	0.49±0.29		
	IL-1α	Control	1	46.10	<0.001
		Silicon	2.333±0.43		
		Tet	0.39±0.06		
	IL-1β	Control	1	31.97	<0.001
		Silicon	2.74±0.59		
		Tet	0.52±0.19		

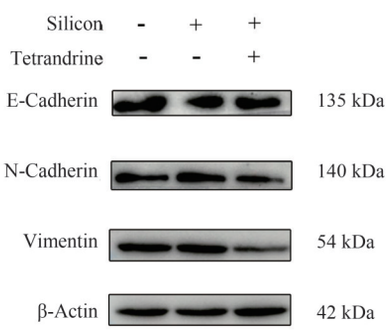


图6　各组BEAS-2B上皮细胞E-Cadherin、N-Cadherin、Vimentin蛋白的表达情况

Fig 6　Expression of E-Cadherin、N-Cadherin、Vimentin protein in BEAS-2B epithelial cells in each group

2.6.4　粉防己碱对巨噬细胞中磷酸化后的RAF及ERK蛋白水平的影响　RAF蛋白是由RAF基因编码的蛋白激酶，在MAPK信号通路中起着重要作用，RAF蛋白可以调节下游的MEK蛋白和ERK蛋白活性，从而调控细胞的增殖，凋亡，炎症反应等功能。利用WB检测MAPK相关蛋白的表达，与正常组相比，加硅组的RAF蛋白和ERK蛋白的磷酸化水平明显升高（$P<0.01$）。与加硅组相比，粉防己碱组的RAF蛋白和ERK蛋白的磷酸化水平明显降低（$P<0.000\ 1$），证明粉防己碱可以抑制RAF蛋白和ERK的磷酸化水平，从而参与细胞的功能调节。见图7及表4。

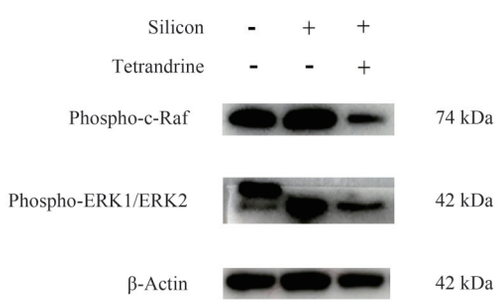


图7　各组THP-1巨噬细胞Phospho-c-Raf、Phospho-ERK1/2蛋白的表达情况（$n=3,\bar{x}\pm s$）

Fig 7　Expression of Phospho-c-Raf、Phospho-ERK1/2 in THP-1 macrophage cells in each group（$n=3,\bar{x}\pm s$）

表3 各组BEAS-2B上皮细胞E-Cadherin、N-Cadherin、Vimentin蛋白的表达情况（$n=3,\bar{x}\pm s$）

Tab 3 Expression of E-Cadherin、N-Cadherin、Vimentin protein in BEAS-2B epithelial cells in each group($n=3,\bar{x}\pm s$)

指标	分组	表达量	F	P
E-Cadherin	Control	1.000 0±0.000 0		
	Silicon	0.490 0±0.105 3	27.500	＜0.001
	Tet	1.070 0±0.147 3		
N-Cadherin	Control	1.000 0±0.000 0		
	Silicon	1.350 0±0.053 4	651.200	＜0.000 1
	Tet	0.366 6±0.030 5		
Vimentin	Control	1.000 0±0.000 0		
	Silicon	1.100 0±0.245 8	4.875	NS
	Tet	0.700 0±0.185 9		

表4 各组THP-1巨噬细胞Phospho-c-Raf、Phospho-ERK1/2蛋白的表达情况（$n=3,\bar{x}\pm s$）

Tab 4 Expression of Phospho-c-Raf、Phospho-ERK1/2 in THP-1 macrophage cells in each group($n=3,\bar{x}\pm s$)

指标	分组	表达量	F	P
Phospho-c-Raf	Control	1.000 0±0.000 0		
	Silicon	1.330 0±0.111 7	64.04	＜0.000 1
	Tet	0.700 0±0.035 9		
Phospho-ERK1/ERK2	Control	1.000 0±0.000 0		
	Silicon	1.556 0±0.088 8	147.7	＜0.000 1
	Tet	0.831 2±0.029 6		

3 讨论

矽肺是一种常见的职业病，主要是肺部炎症和纤维化，严重时会导致心脏衰竭，具有不可逆性。大多矽肺患者就诊时已是晚期，严重影响患者生活质量，且预后较差，当前矽肺治疗并不乐观[24,25]。近年来，矽肺的治疗手段和发病机制逐渐成为了热点话题，相关文章对矽肺发病机制进行了集中讨论，甚至有小部分方法在矽肺模型中成功开展[3]，但对矽肺发展机制的相关研究仍然不足。粉防己碱是从中药汉防己植物中提取出的药物，是一种用于治疗矽肺的临床药物[26]，因治疗癌症和肿瘤的效果被人所熟知[27,28]。研究报道，粉防己碱在抑制炎症反应、调节氧化应激有着显著作用[10]。因此本研究从生物信息学和网络药理学的角度出发，进一步探讨粉防己碱治疗早期矽肺的作用机制，为之后的临床研究提供理论基础。

生物信息学和网络药理学已经成为了研究疾病通路和关键蛋白的重要手段，本研究首次将矽肺患者、二氧化硅滴注大鼠的RNA测序数据和网络数据库中与矽肺相关的靶点进行同步分析，从不同物种，不同来源的数据中分析影响早期矽肺的信号通路。研究表明矽肺的发展与多种信号通路都有着密切的关系。Zhang等[29]通过使用自噬抑制剂3-甲基腺嘌呤（3-MA）抑制了NF-κB信号通路介导的矽肺早期肺部炎症发生。Abd Elhameed[5]发现阿司匹林和磷虾油可以使二氧化硅小鼠肺组织中的NF-κB和炎症因子TGF-β1下调，从而降低二氧化硅诱导的肺损伤。Yan等[30]证明了PI3K/Akt通路在二氧化硅诱导的肺纤维化中起到了关键作用。Helal等[31]通过使用β受体阻滞剂卡维地洛降低小鼠肺组织内病P-AKT和mTOR含量从而减轻了二氧化硅诱导的肺纤维化。Wu等[32]发现大黄蛰虫丸（DHZCP）可以通过调整p38 MAPK/TGF-β1/Smad通路，减少炎症因子的刺激从而抑制矽肺进展。Yan等[33]利用p38 MAPK特异性抑制剂SB203580发现P38 MAPK通路是大鼠矽肺纤维化和EMT的关键。有文章提及炎症因子IL-6通过JAK2/STAT3诱导胃癌细胞的EMT，同时IL-6也可以通过STAT3信号诱导FMT的发生[34]。Cheng等[35]发现二甲双胍通过抑制TGF-β1信号减轻成纤维细胞的活化，抑制巨噬细胞的炎症反应。报道表明影响矽肺发展的通路不止一条，但哪条通路才是影响矽肺最为关键的通路还没有定论。从GO和KEGG富集分析中发现三种不同数据集都存在IL-17信号通路[36]，说明IL-17信号通路在早期矽肺发展中有着极其重要的作用。相关文献证实，IL-17是白介素家族重要的炎性细胞因子，高水平的IL-

17导致肺部疾病恶化、包括肺炎、哮喘等疾病，吡非尼酮可以通过抑制IL-17A的分泌来改善二氧化硅诱导小鼠的肺部炎症，其观点与本研究所得出的结论一致，证实IL-17信号通路在矽肺的发展中有着重要作用。

PPI网络图表示了不同靶点之间的相互作用，其结果证实MAPK通路在IL-17信号通路中起着重要作用，IL-6、TNF-α、CCL2等靶点在PPI网络图有着较高的影响分数，Tripathi等[37]证明IL-6的表达与二氧化硅诱导的肺纤维化有着密切关系，Cheng等[35]证明TNF-α表达减少可以减少成纤维细胞的活化。CCL2是一种介导炎症的趋化因子，可以促使巨噬细胞释放炎症因子从而促进矽肺早期的进展，以上靶点都说明筛选出的IL-17信号通路在早期矽肺中起到重要的作用。

粉防己碱被药监局批准是治疗矽肺的新药，从本草粉防己提炼而出，在抗炎、抗纤维化、免疫应答、抗氧化方面都有着重要作用，但其抗纤维化的治疗效果仍存在争议，且粉防己碱在矽肺进展中影响的机制还未被确定[38]。本研究通过实验发现粉防己碱可以抑制关键通路RAF和ERK蛋白的磷酸化水平和EMT的发生，其中上皮细胞标志物E-Cadherin上调、间充质细胞标志物N-Cadherin和Vimentin表达下调。PCR实验发现，粉防己碱明显抑制巨噬细胞和上皮细胞中IL-6、TNF-α、TGF-β炎症因子的表达。

综上所述，粉防己碱对早期矽肺的发展有明显抑制作用，预测其机制是降低RAF/MEK/ERK通路磷酸化，抑制早期矽肺组织中上皮细胞向间质细胞的转化，降低巨噬和上皮细胞炎症因子的释放水平，从而影响早期矽肺的进展。研究为矽肺治疗提供了理论依据和实验基础，为矽肺药物的研发和后续进一步的发展奠定了基础。本研究在数据采用方面仍有局限性，大部分数据来自数据库，可能存在数据不全的情况，关键通路验证只停留在细胞水平，未能在动物体内进行验证，粉防己碱治疗早期矽肺的机制还需更加深入研究。

作者贡献度说明：

梁超：文章构思，实验设计，生物信息学和网络药理学分析，细胞实验操作；周家伟、刘亚峰：生物信息学分析的指导和调整；郭健强、王清森：实验操作帮助。苏忆欣、胡春晓：实验数据分析；谢军、邢应如、胡东、吴静：论文撰写与修改。

所有作者声明不存在利益冲突关系。

参考文献

1 Leung CC, YU IT, Chen W. Silicosis [J]. Lancet, 2012, 379(9830): 2008-2018.

2 Tan SY, Chen S. Macrophage autophagy and silicosis: Current perspective and latest insights [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(1):453.

3 Adamcakova J, Mokra D. New insights into pathomechanisms and treatment possibilities for lung silicosis [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(8):820-841.

4 Tan SY, Chen S. The mechanism and effect of autophagy, apoptosis, and pyroptosis on the progression of silicosis [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(15):8110.

5 Abd Elhameed AG. Krill oil and low-dose aspirin combination mitigates experimentally induced silicosis in rats: Role of NF-kappaB/TGF-beta1/MMP-9 pathway [J]. Environ Sci Pollut Res Int, 2021, 28(15): 19272-19284.

6 Li T, Yang X, Xu H, et al. Early identification, accurate diagnosis, and treatment of silicosis [J]. Can Respir J, 2022, 2022: 3769134.

7 薛紫鲸，常鑫鑫，张丹，郭龙，郑玉光，詹志来.经典名方中防己的本草考证[J/OL].中国实验方剂学杂志：1-15[2022-12-06].DOI:10.13422/j.cnki.syfjx.20220654.

8 刘姝.汉防己甲素治疗尘肺病的临床效果观察[J].北方药学，2021，18(10)：59-61.

9 罗福玲，赵恒光，李洪忠，等.粉防己碱对脂多糖诱导下RAW264.7细胞炎症模型细胞因子的作用[J].中草药，2011，42(3)：542-5.

10 商璐，董彦，刘斌，等.粉防己碱治疗肺纤维化作用机制及应用进展[J].天津中医药大学学报，2018，37(3)：256-60.

11 Pang J, Luo Y, Wei D, et al. Comparative transcriptome analyses reveal a transcriptional landscape of human silicosis lungs and provide potential strategies for silicosis treatment [J]. Front Genet, 2021, 12: 652901.

12 Barrett T, Wilhite SE, Ledoux P, et al. NCBI GEO: archive for functional genomics data sets-update [J]. Nucleic Acids Res, 2013, 41(D1): D991-D995.

13 RitchieI ME, Phipson B, Wu D, et al. Limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies [J]. Nucleic Acids Res, 2015, 43(7): e47.

14 Amberger JS, Bocchini CA, Schiettecatte F, et al. OMIM. org: online mendelian inheritance in man (OMIM (R)), an online catalog of human genes and genetic disorders [J]. Nucleic Acids Res, 2015, 43(D1): D789-D798.

15 Davis AP, Grondin CJ, Johnson RJ, et al. Comparative

toxicogenomics database (CTD): Update 2021 [J]. Nucleic Acids Res, 2021, 49(D1): D1138-D1143.

16 Safran M, Dalah I, Alexander J, et al. Genecards version 3: The human gene integrator [J]. Database-Oxford, 2010.

17 Lex A, Gehlenborg N, Strobelt H, et al. Upset: Visualization of intersecting sets [J]. Ieee T Vis Comput Gr, 2014, 20(12): 1983-92.

18 黄帅阳, 候丹, 黄贵锐, 等. 基于网络药理学探讨哮喘宁颗粒治疗支气管哮喘的作用机制及PI3K/Akt信号通路验证 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(9): 150-157.

19 Szklarczyk D, Gable AL, Nastou KC, et al. The STRING database in 2021: Customizable protein-protein networks, and functional characterization of user-uploaded gene/measurement sets [J]. Nucleic Acids Res, 2021, 49(D1): D605-D612.

20 黄俊鑫, 王碧霞, 邹汉斌, 等. 基于网络药理学和分子对接探究防己茯苓汤治疗缺血再灌注急性肾损伤的作用机制 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(08): 175-182.

21 Berman H M, Westbrook J, Feng Z, et al. The protein data bank [J]. Nucleic Acids Res, 2000, 28(1): 235-242.

22 Kim S, Chen J, Cheng T, et al. PubChem in 2021: New data content and improved web interfaces [J]. Nucleic Acids Res, 2021, 49(D1): D1388-D1395.

23 赵博, 屈新亮, 王祁, 等. 网络药理学预测四逆汤抗心肌缺血再灌注损伤机制及实验验证 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(9): 168-175.

24 Cavalin C, Lescoat A, Ballerie A, et al. Beyond silicosis, is the world failing on silica hazards? [J]. Lancet Respir Med, 2019, 7(8): 649-650.

25 Barnes H, Goh NSL, Leong TL, et al. Silica-associated lung disease: An old-world exposure in modern industries [J]. Respirology, 2019, 24(12): 1165-1175.

26 Liu T, Liu X, Li W. Tetrandrine, a Chinese plant-derived alkaloid, is a potential candidate for cancer chemotherapy [J]. Oncotarget, 2016, 7(26): 40800-40815.

27 Bhagya N, Chandrashekar KR. Tetrandrine and cancer - an overview on the molecular approach [J]. Biomed Pharmacother, 2018, 97: 624-632.

28 Guo Y, Chen B, Pei X, et al. Radix stephaniae tetrandrine: an emerging role for management of breast cancer [J]. Curr Pharm Des, 2020, 26(1): 25-36.

29 Zhang Y, Huang S, Tan S, et al. 3-methyadenine inhibits lipopolysaccharides-induced pulmonary inflammation at the early stage of silicosis *via* blocking NF-kappaB signaling pathway [J]. Toxicol Ind Health, 2021, 37(11): 662-673.

30 Yan W, Wu Q, Yao W, et al. MiR-503 modulates epithelial-mesenchymal transition in silica-induced pulmonary fibrosis by targeting PI3K p85 and is sponged by lncRNA MALAT1 [J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 11313.

31 Helal MG, Said E. Carvedilol attenuates experimentally induced silicosis in rats *via* modulation of P-AKT/mTOR/TGFbeta1 signaling [J]. Int Immunopharmacol, 2019, 70: 47-55.

32 Wu LJ, He XY, Wang WX, et al. Dahuang zhechong pills suppress silicosis fibrosis progression *via* p38 MAPK/TGF-beta1/Smad pathway *in vitro* [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2021, 2021: 6662261.

33 Yan W, Xiao L, Guo LA, et al. SB203580 inhibits epithelial-mesenchymal transition and pulmonary fibrosis in a rat silicosis model [J]. Toxicol Lett, 2016, 259: 28-34.

34 Montero P, Milara J, Roger I, et al. Role of JAK/STAT in interstitial lung diseases; Molecular and cellular mechanisms [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(12):6211.

35 Cheng D, Xu Q, Wang Y, et al. Metformin attenuates silica-induced pulmonary fibrosis *via* AMPK signaling [J]. J Transl Med, 2021, 19(1): 349.

36 毕瑜婷, 花东明, 林佳成, 等. 淫羊藿苷通过Akt/GSK3β/CDK通路抑制CLC5肝癌细胞增殖 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(12): 96-102.

37 Tripathi SS, Mishra V, Shukla M, et al. IL-6 receptor-mediated lung Th2 cytokine networking in silica-induced pulmonary fibrosis [J]. Arch Toxicol, 2010, 84(12): 947-955.

38 Song MY, Wang JX, Sun YL, et al. Tetrandrine alleviates silicosis by inhibiting canonical and non-canonical NLRP3 inflammasome activation in lung macrophages [J]. Acta Pharmacol Sin, 2022, 43(5): 1274-1284.

[**本文编辑**] 邹 洲 宋睿璞 朱 昊