

# MCP 治疗类风湿关节炎合并肺纤维化的转录组学分析\*

王冠<sup>1 2 3 4</sup> 耿立霞<sup>1 2</sup> 白力<sup>3 4</sup> 霍银萍<sup>1 2 3 4</sup> 刘静<sup>1 2 3 4</sup> 马雯<sup>1 2 3 4</sup>

(1. 内蒙古科技大学包头医学院, 内蒙古 包头 014040; 2. 内蒙古科技大学包头医学院第一附属医院重症医学科; 3. 包头医学院风湿免疫研究所; 4. 内蒙古自治区自体免疫学重点实验室)

**[摘要]** 目的: 探讨改性柑橘果胶(MCP)在治疗类风湿关节炎合并间质性肺病(RA-ILD)的治疗效果和潜在机制。方法: 建立RA-ILD小鼠模型,分为对照组、模型组和MCP治疗组。取肺组织做病理切片。另外一部分肺组织进行转录组测序,并进行后续生物信息学分析。结果: MCP可以改善RA-ILD小鼠肺纤维化的病理变化。筛选出药物干预的核心基因23个,其中9个人类中的同源基因的表达是符合在小鼠中的表达趋势的,分别是LCK、THY1、GZMA、CXCR3、LR10RA、CCL5、CTLA4、CD19、CD5,分析富集功能和通路发现T细胞活化调节、细胞黏附调节、免疫受体活性、Th17细胞分化、Th1和Th2细胞分化等通路在MCP治疗纤维化中扮演重要角色。结论:(1)MCP对RA-ILD小鼠治疗效果确切,明显改善肺部纤维化的严重程度和肺组织炎性细胞浸润程度;(2)有23个核心基因在治疗疾病的过程中发挥了关键作用,其中有9个人类同源基因;(3)核心基因通过T细胞活化调节、细胞黏附调节、免疫受体活性、Th17细胞分化、Th1和Th2细胞分化等来发挥作用。

**[关键词]** 改性柑橘果胶; 类风湿关节炎; 肺纤维化; 生物信息学; Gal-3; T细胞活化

DOI: 10.16833/j.cnki.jbmc.2024.09.006

## Transcriptome analysis of MCP in the treatment of rheumatoid arthritis with pulmonary fibrosis

WANG Guan<sup>1 2 3 4</sup> , GENG Lixia<sup>1 2</sup> , BAI Li<sup>3 4</sup> , HUO Yinying<sup>1 2 3 4</sup> , LIU Jing<sup>1 2 3 4</sup> , MA Wen<sup>1 2 3 4</sup>

(1. Baotou Medical College of Inner Mongolia University of Science and Technology, Baotou 014040, China; 2. Department of Critical Care Medicine, First Affiliated Hospital of Baotou Medical College, Inner Mongolia University of Science and Technology; 3. Institute of Rheumatology and Immunology, Baotou Medical College; 4. Key Laboratory of Autologous Immunology, Inner Mongolia Autonomous Region)

**ABSTRACT Objective:** To investigate the therapeutic effect and potential mechanism of modified citrus pectin (MCP) in the treatment of rheumatoid arthritis with interstitial lung disease (RA-ILD). **Methods:** The RA-ILD mouse model was established and divided into control group, model group and MCP treatment group. Lung tissue was taken for pathological section. The other part of lung tissue was subjected to transcriptome sequencing and subsequent

\* 基金项目: 国家自然科学基金(82160309); 内蒙古自治区研究生科研创新资助项目(201-2022403)

通讯作者: 耿立霞

bioinformatics analysis. **Results:** MCP could improve the pathological changes of pulmonary fibrosis in RA - ILD mice. A total of 23 core genes for drug intervention were screened , of which the expression of 9 homologous genes in humans was consistent with the expression trend in mice , which were LCK , THY1 , GZMA , CXCR3 , LR10RA , CCL5 , CTLA4 , CD19 , and CD5. The enrichment functions and pathways revealed that pathways such as T cell activation regulation , cell adhesion regulation , immune receptor activity , Th17 cell differentiation , and Th1 and Th2 cell differentiation played an important role in MCP treatment of fibrosis. **Conclusion:** ( 1 ) MCP has a definite therapeutic effect on RA - ILD mice , which can significantly improve the severity of pulmonary fibrosis and the degree of inflammatory cell infiltration in lung tissue; ( 2 ) There are 23 core genes that play a key role in the treatment of diseases , including 9 human homologous genes; ( 3 ) Core genes play a role through T cell activation regulation , cell adhesion regulation , immune receptor activity , Th17 cell differentiation , Th1 and Th2 cell differentiation.

**KEY WORDS** Modified citrus pectin; Rheumatoid arthritis; Pulmonary fibrosis; Bioinformatics; Gal - 3; T cell activation

类风湿关节炎合并肺间质病变( Rheumatoid arthritis - associated interstitial lung disease , RA - ILD) 是一种累及到周围关节的多系统炎症性自身免疫疾病 ,患者在早期无明显特征 ,到了后期会出现肺纤维化而使得预后不佳 ,错过最佳治疗期 ,还会因为呼吸衰竭而导致患者死亡。RA - ILD 病理机制为肺泡伤口愈合异常 ,造成细胞外基质( Extracellular matrix , ECM) 沉积 ,最终 ECM 替代肺实质引起肺纤维化<sup>[1]</sup>。患者表现为呼吸道症状的持续恶化和肺功能的下降 ,预后不良。改性柑橘果胶( Modified Citrus Pectin , MCP) 是一种从柑橘类水果的果皮和果肉中提取的复合水溶性膳食纤维 ,具有抗炎、抗癌和抗纤维化特性<sup>[2]</sup>。研究表明 MCP 与半乳糖凝集素 -3( Gal - 3) 相互拮抗 ,Gal - 3 能够促进 ECM 形成交联晶格 ,在纤维化疾病的进展中起重要作用<sup>[3]</sup>。MCP 对心脏、肝脏和肾脏等具有明显的抗纤维化作用<sup>[4-6]</sup>。然而 MCP 是否具有抗肺纤维化作用及其分子机制尚未可知。本研究旨在探讨 MCP 在类风湿关节炎合并的肺纤维化中的分子机制 ,为其临床应用提供基础研究依据。

## 1 材料和方法

**1.1 试验药物** 博来霉素( Bleomycin ,BLM ,日本化药株式会社 ,批号: H20090885) ; 改性柑橘果胶( MCP ,浙江果源康品生物科技有限公司 ,批号: 200302 - 0) ; 冰乙酸( 17 mol/L ,天津市化学试剂三

厂 ,批号: 190079 - 201501) ; 牛 II 型胶原( 10 mg/瓶 ,美国 Chondrex 公司 ,批号: 130435) ; 完全弗氏佐剂( CFA 4mg/mL ,美国 Sigma 公司 ,批号: SLCF1289) 。

**1.2 实验动物** SPF 级 C57BL/6 雄性小鼠 ,体质量( 75 ± 6) g ,由斯贝福( 北京) 生物技术有限公司提供 ,许可证号: SCXK( 京) 019 - 0010。

### 1.3 方法

**1.3.1 动物分组** 为在图表中直观方便地体现各组间区别 ,将正常小鼠命名为 control 组共有小鼠 3 只 ,将造模未治疗小鼠命名为 model 组共有小鼠 3 只 ,将 MCP 治疗组命名为 treat 组共有小鼠 3 只。

**1.3.2 动物模型建立和治疗** ( 1) RA 模型: 第一步 ,稀释冰乙酸 ,得到 0.1 mol/L 冰乙酸稀释液; 第二步 ,溶解胶原 ,通过 0.1 mol/L 冰乙酸溶解牛 CII 获得 2 mg/mL 牛 CII 胶原溶液 ,在 4 °C 冰箱中过夜储存; 第三步 ,乳化 ,在溶解完全的牛 CII 中添加相同体积的 CFA ,混合时需要保证处于冰浴环境中 ,直至乳化完全 ,形成不散的乳白色液滴; 第四步 ,初次免疫 ,在 DBA/1 小鼠距离尾根部约 1 ~ 2 cm 处皮下注射乳化完全的牛 CII 胶原 100 μL ,即为初次免疫 ,并将实验时间记为 0 d; 于实验第 21 天对小鼠进行强化免疫 ,剂量及方法同前<sup>[7]</sup>。正常对照组小鼠注射等体积 PBS。( 2) RA - ILD 模型: 取博来霉素 0.5 g 溶于无菌生理盐水 ,配成 50 mg/mL 的水溶液 ,置于 4 °C 冷藏保存。腹腔注射 5% ( 0.1 mL/10 g) 的水合氯醛麻醉小鼠 ,3 ~ 5 min 待小鼠深度麻醉后 ,将小鼠置于手术平台并进行仰卧式固定 ,75% 医用

酒精消毒;备皮后剪开颈部皮肤,分离肌肉等组织,暴露出气管的位置。随后利用 1 mL 注射器吸取博来霉素的水溶液在气管环间位置入针,插入气管注入 100  $\mu$ L BLM(5 mg/kg) 轻柔操作,避免气管的破损。完成以上操作后,将小鼠直立旋转,让药物充分进入病灶部位。随后进行伤口的缝合。将小鼠放回饲养笼并进行保温处理,待小鼠苏醒后给予正常的饲养<sup>[8]</sup>。

**1.3.3 给药及处理** 各组灌胃生理盐水或等体积药物,每日 1 次。给药后第 14 天小鼠左肺进行剥离处理,并将剥离组织一部分用于病理片染色,另一部分进行转录组测序<sup>[9]</sup>。

**1.3.4 RNA-Seq 测序** 分别将 MCP 治疗组、模型对照组、正常对照组小鼠肺组织于冰上切成小块,迅速投入放入 RNAlater 的 RNase-Free EP 管中,放入液氮中冷冻保存,委托华大公司进行 RNA 提取和 RNA-Seq 测序。

**1.4 数据分析** (1) 药物干预基因筛选;(2) 药物干预核心基因筛选和功能预测;(3) 药物干预核心基因在外部数据集验证。

## 2 结果

**2.1 MCP 治疗 RA-ILD 小鼠的效果** (1) 肺外观图:治疗组颜色介于模型组和对照组之间,稍有白色结节和瘀斑出现,较模型组有明显改善。(2) 肺组织 HE 染色及其 Ashcroft 评分:模型组肺结构严重变形,大面积地纤维化,出现“蜂窝肺”;治疗组虽仍有胶原纤维沉积,但较模型组明显缓解纤维化的表现,炎性细胞减少,肺泡壁结构基本正常。(3) Masson 染色检测 MCP 治疗对小鼠肺组织纤维化的病理影响,并利用半定量法测量胶原纤维阳性面积:对照组小鼠肺组织结构正常,没有纤维化征象。模型组小鼠肺组织出现大量胶原沉积,纤维化程度严重。治疗组大鼠胶原沉积降低,纤维化程度减轻。见图 1~图 3。

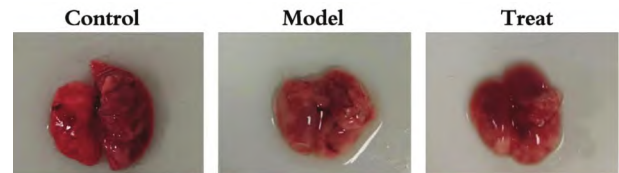


图 1 小鼠肺组织外观图

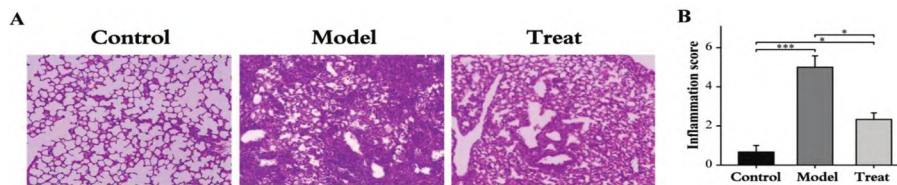


图 2 小鼠肺组织 HE 染色(100 $\times$ ) (A) 及其 Ashcroft 评分(B)

注:与 control 组比较,\*  $P < 0.05$ 、\*\*\*  $P < 0.001$

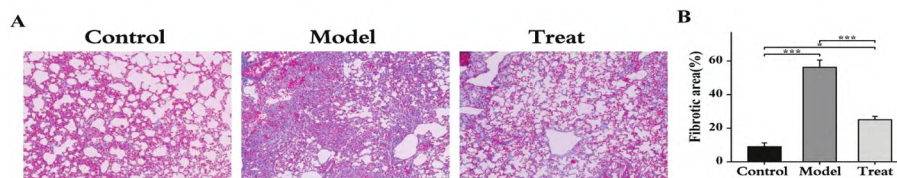


图 3 小鼠肺组织 masson 染色(100 $\times$ ) (A) 及其胶原纤维阳性面积统计(B)

注:与 control 组比较,\*\*\*  $P < 0.001$

## 2.2 MCP 治疗 RA-ILD 生物信息学分析

**2.2.1 药物干预基因筛选** (1) model vs Control 的差异表达基因的筛选:使用 normalizeBetweenArrays 函数对 TPM 的表达数据进行数据校正(使用 boxplot 确认表达数据在不同分组中的数据分布)并将数据使用  $\log_2(x+1)$  进行处理,使得数据更集中,然后利

用 R 语言包“limma”对数据集中的模型样本和对照样本进行差异分析。差异基因的筛选条件为  $P < 0.05$ ,  $|\log_2FC| > 1$ 。结果表明,共有 1 020 个差异表达基因,其中上调基因有 721 个,下调基因有 299 个。为了使结果更加直观,绘制差异基因火山图和热图。热图显示基因在 control 样本和 model 样

本中的表达水平差异显著。(2) treat vs model 的差异表达基因的筛选: 利用 R 语言包“limma”对数据集中的治疗样本和模型样本进行差异分析。差异基因的筛选条件为  $P < 0.05$ ,  $|\logFC| > 1$ 。结果表明, 共有 2 296 个差异表达基因, 其中上调基因有 1 147 个, 下调基因有 1 149 个。为了使结果更加直观, 绘制差异基因火山图和热图。热图显示基因在 treat 样本和 model 样本中的表达是有明显差异的<sup>[10]</sup>。(3) 利用线上 Venn 工具筛选药物干预基因: 为了筛选出和治疗有关的基因, 首先筛选出在模型组中上调, 且在治疗后下调的基因共 244 个; 随后筛选出在模型组中下调, 但在采取相应治疗措施后, 表达水平上调的基因, 一共发现 75 个。将两种模式的基因合并起来共 319 个基因, 定义为关键基因(药物干预基因)。见图 4、图 5。

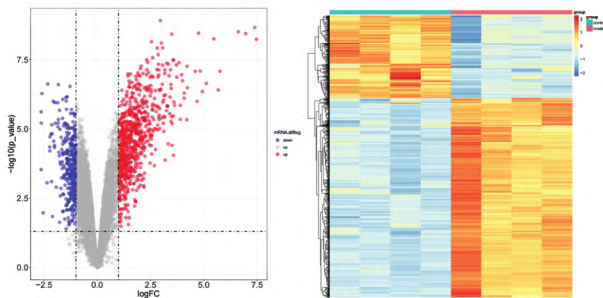


图 4 model vs control 差异表达基因火山图(左)和热图(右)

注: 左图中每一个点代表一个差异表达基因, 其中红色实心圆点代表上调基因, 蓝色实心圆点代表下调基因, 灰色实心圆点代表不存在显著差异的基因。右图中每个小方格表示一个基因数据的表达, 其颜色代表表达量的高低, 表达量越高颜色越深(红色为高表达, 蓝色为低表达), 位于顶部的方格蓝色表示 control 样本, 红色表示 model 样本。

**2.2.2 药物干预核心基因筛选和功能** (1) 药物干预核心基因筛选: ①首先将药物干预基因导入 string 数据库进行蛋白质相互作用( protein - protein interaction network, PPI) 网络构建( 仅保留有连接的 node), 共有 314 个药物干预基因有连接。②然后将 PPI 网络的交互文件导入 Cytoscape 中, 使用 Cytoscape 中的 CytoHubba 插件筛选核心基因, 其中 CytoHubba 插件是对每一个基因( node) 都赋予值并根据不同的算法计算后进行排序筛选 hub - node, 使用的计算方法是 Maximal Clique Centrality( MCC) 并保留了 Top 30 评分的基因作为核心基因。然后将 PPI 网络的交互文件导入 Cytoscape 中, 使用

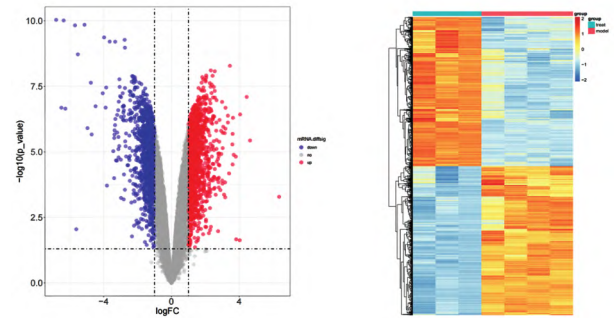


图 5 Treat vs model 差异表达基因火山图(左)和热图(右)

注: 左图中每一个点代表一个差异表达基因, 其中红色实心圆点代表上调基因, 蓝色实心圆点代表下调基因, 灰色实心圆点代表不存在显著差异的基因。右图中每个小方格表示一个基因数据的表达, 其颜色代表表达量的高低, 表达量越高颜色越深(红色为高表达, 蓝色为低表达), 位于顶部的方格蓝色表示 treat 样本, 红色表示 model 样本。

Cytoscape 中的 MCODE 插件筛选核心基因, 选取 MCODE 计算出的 K - score 值最大的基因模块( 共 27 个基因) 作为核心基因。对 CytoHubba 插件和 MCODE 插件得出的结果用 Venn 工具取交集得到药物干预的核心基因 23 个。所筛选出的核心基因分别为 Lck、Ccr6、Cxcl9、Thy1、Gzma、Il2rb、Cxcr6、Cxcr3、Il10ra、Cd83、Stat1、Ccl5、H2 - Ab1、Il1b、Il2rg、Cila4、Spn、H2 - K1、Cd274、Itgax、Cd19、Tbx21、Cd5。

③为了验证筛选出的药物干预核心基因的有效性, 使用箱图进行可视化 hubgene 的表达量。从图中可以看到筛选出的 23 个药物干预核心基因在模型组和治疗组中都是有明显表达差异的, 证明筛选出的核心基因是和药物干预有强相关性的, 同时通过箱图可以知道筛选出的 hub genes 都是在模型中上调, 治疗后下调的。(2) 探索药物干预核心基因的功能: 为了探究筛选出的药物干预核心基因的相关的功能和相关通路, 使用 R 中的 clusterprofile 包进行功能富集分析( KEGG, GO), 找到药物干预的基因可能参与的生物学功能及其通路。发现目标基因富集的生物过程( BP) 有 717 个, 其中 TOP 5 的是: 白细胞黏附调节、T 细胞活化调节、白细胞黏附、细胞黏附调节和 T 细胞活化正调节。目标基因主要作用的细胞成分( CC) 有 43 个, 其中 TOP 5 是: MHC 蛋白复合体、内吞囊泡、参与细胞黏附的蛋白复合体、早期内体、早期内体膜。目标基因主要的分子功能( MF) 有 67 个, 其中 TOP 5 是: 细胞因子受体活

性、免疫受体活性、细胞因子结合 C - C 趋化因子受体活性、G 蛋白偶联趋化剂受体活性。计算得到的 P 值通过 FDR 校正之后,以校正 P 值 < 0.05 的 KEGG 富集结果中药物干预基因显著富集的 pathway 一共包含 40 个,其中富集程度最高的为病毒蛋白与细胞因子和细胞因子受体的相互作用,居于第 2 名到第 5 名的依次为 Th17 细胞分化,细胞因子 - 细胞因子受体相互作用, Th1 和 Th2 细胞分化以及炎症性肠病<sup>[11-16]</sup>。见图 6 ~ 图 10。

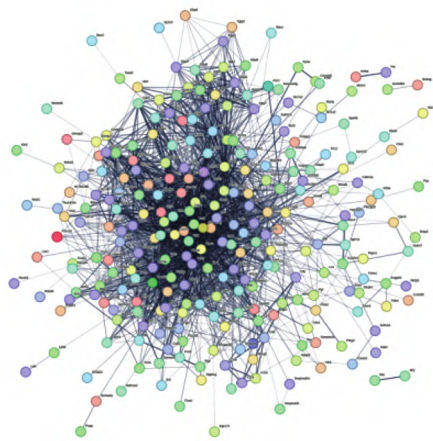


图 6 药物干预基因的蛋白质相互作用 (PPI) 网络

注: 每一个圆形代表一个基因 (node), 每一条连线代表一组蛋白之间的相互作用, 而连线的粗细是根据 string 数据库对这个相互作用的置信度表示的 (仅显示置信度 > 0.4 的相互作用)

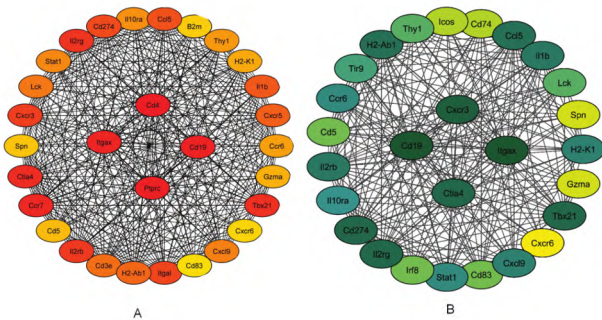


图 7 CytoHubba 插件预测核心基因图 (A) 与 MCODE 插件预测核心基因 (B)

注: 每一个圆形代表一个基因 (node), 每一条连线代表一组蛋白之间的相互作用, 点的颜色越深代表与这个点产生相互作用的点越多

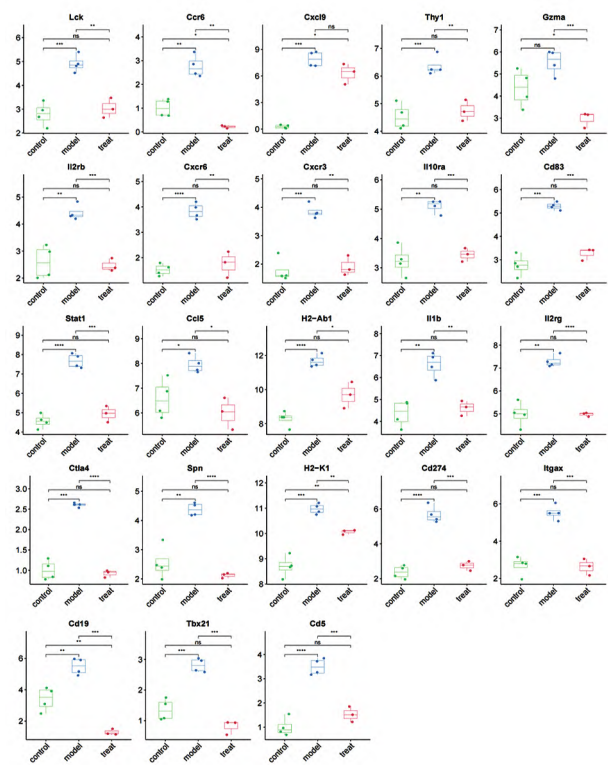


图 8 药物干预核心基因表达箱图

注: 横坐标为基因表达的组织分类 (control 绿和 model 蓝和 treat 红) 纵坐标为 Hub-genes 的表达值, 在顶部的 "\*" 则是将位于由 control 组和 model 组以及 treat 组中基因通过 wilcox.test 算法得出在两组中的差异 P 值并通过 "\*" 展示, "\*\*\*\*", "\*\*\*", "\*\*", "ns" 对应 P 值分别为 0.001, 0.01, 0.05, 1

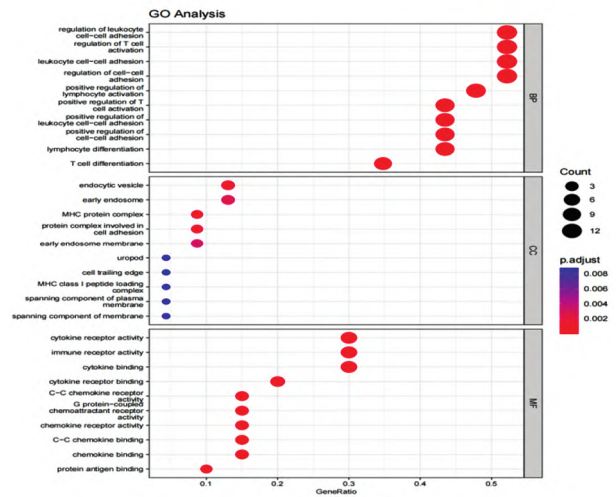


图 9 药物调控核心基因的 GO 富集分析气泡图

注: GO 富集分析结果中 P 值最小的前 10 个功能。通过气泡图, 展示了富集分析结果中的各个关键统计量。其中 Y 轴对应功能, X 轴表示特定功能中的差异基因和功能中所有基因的比值, 气泡的大小表示该功能中差异基因的多少, 气泡颜色由蓝 - 紫 - 红变化, 其富集 P Value 值越小, 显著程度越大

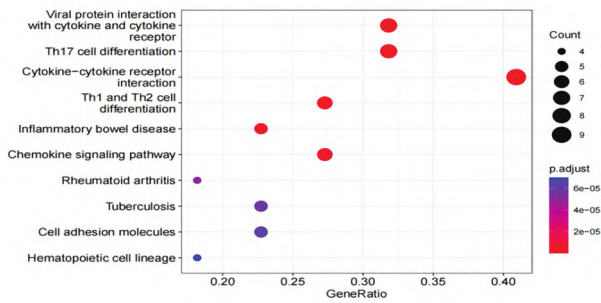


图 10 药物调控核心基因的 KEGG 富集分析气泡图

注: KEGG 富集分析结果中  $P$  值最小的前 10 个通路。通过气泡图展示了富集分析结果中的各个关键统计量。其中  $Y$  轴对应着通路,  $X$  轴表示特定通路中的差异基因和通路中所有基因的比值, 气泡的大小表示该通路中差异基因的多少, 气泡颜色由蓝-紫-红变化, 其富集  $P$  Value 值越小, 显著程度越大

**2.2.3 药物干预核心基因在外部数据集验证** 首先从 GEO 数据库下载肺纤维化数据集 GSE213001, 含正常样本 41 个, 疾病样本 98 个。由于下载的数据集是人类的, 所以使用了 R 包中对同源基因转换的 homologene 包, 将小鼠的 hub 基因转换成人类中的同源基因, 在这个过程中损失了一个基因 (Cxc19), 然后绘制药物干预的关键基因在正常和疾病样本中的表达箱图。从图中可知 22 个小鼠中药物干预的核心基因在人类中的同源基因的表达有 9 个是符合在小鼠中的表达趋势的。这 9 个基因是 LCK, THY1, GZMA, CXCR3, IL10RA, CCL5, CTLA4, CD19, CD5。证明所筛选出的核心基因是有意义的。见图 11。

### 3 讨论

在目前的研究报道中, RA 是使用较为广泛的 RA 动物模型, 虽然在该模型中可以出现不同程度的肺受累情况, 但这种受累却并不明显而且不可控, 不能很好地反映出 RA 病人伴随肺间质病的情况。而本次实验所采用的 RA-ILD 模型很好地解决了这一弊端<sup>[17]</sup>。首先使用牛 II 型胶原等构建 RA 模型, 再在 RA 模型的基础上, 使用气管注射博来霉素构建 RA-ILD 模型, 较为完善地还原了疾病, 为后续的实验奠定了良好的基础。然后通过治疗组病理片的结果确定了 MCP 对肺纤维化有治疗作用。

本实验对肺组织进行了转录组测序, 得到均一

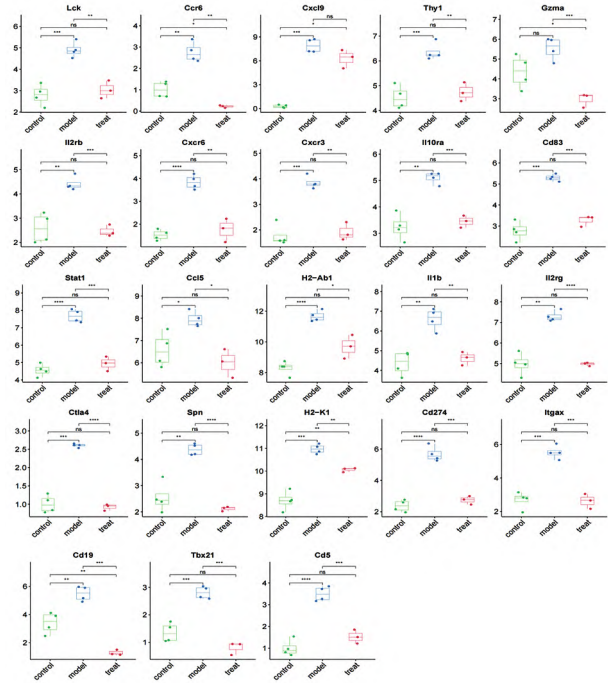


图 11 药物干预核心基因表达箱图

注: 横坐标为基因表达的组织分类 (Normal 绿和 Disease 蓝), 纵坐标为 Hub-genes 的表达值。在顶部的“\*”则是将位于由 Normal 组和 Disease 中基因通过 wilcox.test 算法得出在两组中的差异  $P$  值并通过“\*”展示, “\*\*\*”, “\*\*”, “\*”, “ns” 对应  $P$  值分别为 0.001, 0.01, 0.05, 1

化的数据后, 先进行差异分析, 筛选出在模型组中上调且在治疗后下调的 244 个基因, 然后筛选出在模型组中下调且在治疗后上调的 75 个基因, 将两种模式的获取基因合并起来共 319 个, 并将这一簇基因定义为关键基因。将这 319 个基因导入 string 数据库, 预测药物干预基因的蛋白质互作网络, 然后将蛋白互作数据利用 CytoHubba 插件和 MCODE 插件筛选各自核心基因, 并将筛选得到的结果用 Venn 工具取交集得到药物干预的核心基因 23 个。使用箱图进行可视化 hubgene 的表达量, 从图中可以看到筛选出的 23 个药物干预核心基因在模型组和治疗组中都是有明显表达差异的, 证明筛选出的核心基因是和药物干预有强相关性的, 同时通过箱图可以知道筛选出的核心基因都是在模型中上调, 治疗后下调的。所筛选出的核心基因分别为 Lck、Ccr6、Cxcl9、Thy1、Gzma、Il2rb、Cxcr6、Cxcr3、Il10ra、Cd83、Stat1、Ccl5、H2-Ab1、Il1b、Il2rg、Ccl4、Spn、H2-K1、Cd274、Itgax、Cd19、Tbx21、Cd5。

本实验使用外部肺纤维化数据集 GSE213001 对筛选出的药物干预核心基因做验证。将先前在小鼠中筛选出的药物干预核心基因利用 homologenes 包转换成人类同源基因,然后再利用数据集 GSE213001 的表达数据绘制核心基因表达箱图,结果显示有 9 个基因符合趋势,这 9 个基因分别是 Lck、Thy1、Gzma、Cxcr3、Il10ra、Ccl5、Ctla4、Cd19、Cd5,这一结果证明筛选出来的药物干预核心基因是有效的。然后进行 KEGG 和 GO 富集分析。白细胞黏附调节、T 细胞活化调节、白细胞黏附、细胞黏附调节和 T 细胞活化正调节是 GO 分析中最高富集的生物过程。通过 GO 分析发现其富集最高的分子功能有 5 种,分别为 G 蛋白偶联趋化剂受体活性、细胞因子受体活性、细胞因子结合 C-C 趋化因子受体活性、免疫受体活性、G 蛋白偶联趋化剂受体活性。KEGG 富集程度最高的为病毒蛋白与细胞因子和细胞因子受体的相互作用,其次 Th17 细胞分化、细胞因子-细胞因子受体相互作用、Th1 和 Th2 细胞分化、炎症性肠病的富集程度也相对较高,居于第 2 到第 5 名。综合核心基因与 KEGG 和 GO 富集的结果来看,MCP 在治疗 RA-ILD 的过程与 T 细胞及相关亚群活化相关。研究表明 Th1 细胞浸润会在激活心脏成纤维细胞之后,借助整合素  $\alpha 4$  的作用发生转化生成肌成纤维细胞。此外,Th1 细胞还会对成纤维细胞起到诱导作用,促使其表达 TGF- $\beta$ ,其在心肌中形成纤维状 ECM<sup>[18]</sup>。Th2 细胞与嗜酸性粒细胞,嗜碱性粒细胞,巨噬细胞和 2 型先天淋巴样细胞(ILC2)一起有助于 2 型免疫诱导的纤维化病理过程<sup>[19]</sup>。同时有研究表明 Gal-3 通过与 EGFR 和 TGF- $\beta$  受体等相关联来调节细胞-细胞黏附和其他关键的稳态特性<sup>[20-22]</sup>。所以我们认为 MCP 治疗 RA-ILD 的核心基因通过 T 细胞活化调节、细胞黏附调节、免疫受体活性、Th17 细胞分化、Th1 和 Th2 细胞分化等来发挥作用。

RA-ILD 的发病机制非常复杂。本课题组下一步将深入研究 mRNA、miRNA 和 lncRNA 之间的关系,从更深层次解读疾病;并将在后续的实验中进行一步推进 MCP 给药干预缓解 RA-ILD 疾病进展的

体外细胞功能实验,从而明确 MCP 缓解 RA-ILD 的分子生物学机制。

### 参考文献

- [1] Wildhagen KC, Lutgens E, Loubele ST, et al. The structure-function relationship of activated protein C. Lessons from natural and engineered mutations [J]. *Thromb Haemost* 2011, 6: 1034-1045.
- [2] Griffin JH, Zlokovic BV, Mosnier LO. Activated protein C: biased for translation [J]. *Blood*, 2015, 125(19): 2898-2907.
- [3] Bernard GR, Vincent JL, Laterre PF, et al. Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis [J]. *N Engl J Med* 2001, 344(10): 699-709.
- [4] Martí-Carvajal AJ, Solà I, Gluud C, et al. Human recombinant protein C for severe sepsis and septic shock in adult and paediatric patients [J]. *Cochrane Database Syst Rev* 2012, 12(12): CD004388.
- [5] 邓晓玲,许飞. 特发性肺纤维化发病机制研究进展 [J]. *实用临床医学* 2020, 21(10): 102-106.
- [6] 中华医学会呼吸病学分会间质性肺病学组,中国医师协会呼吸医师分会间质性肺疾病工作委员会. 特发性肺纤维化急性加重诊断和治疗中国专家共识 [J]. *中华医学杂志* 2019, 99(26): 2014-2023.
- [7] 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.
- [8] Bellaye P S, Yanagihara T, Granton E, et al. Macitentan reduces progression of TGF- $\beta 1$ -induced pulmonary fibrosis and pulmonary hypertension [J]. *Eur Respir J*, 2018, 52(2): 1701857.
- [9] Habermann AC, Gutierrez AJ, Bui L T, et al. Single-cell RNA sequencing reveals profibrotic roles of distinct epithelial and mesenchymal lineages in pulmonary fibrosis [J]. *Sci Adv* 2020, 6(28): eaba1972.
- [10] Mehrzadi S, Hosseini P, Mehrabani M, et al. Attenuation of bleomycin-induced pulmonary fibrosis in wistar rats by combination treatment of two natural phenolic compounds: quercetin and Gallic acid [J]. *Nutr Cancer*, 2021, 73(10): 2039-2049.
- [11] Yamakawa H, Ogura T, Kameda H, et al. Decision-making strategy for the treatment of rheumatoid arthritis-associated interstitial lung disease (RA-ILD) [J]. *J Clin Med* 2021, 10(17): 3806.
- [12] Dai YJ, Wang WN, Yu YK, et al. Rheumatoid arthritis-associated interstitial lung disease: an overview of epidemiology, pathogenesis and management [J]. *Clin Rheumatol* 2021, 40(4): 1211-1220.

(下转第 51 页)

升高,符合临床卵巢早衰患者内分泌变化,卵巢病理切片证明,CTX 组闭锁卵泡增加,间质纤维化,与其它研究结果一致,卵巢早衰模型建立成功<sup>[5]</sup>。经暖宫七味丸治疗后的小鼠的一般情况较 CTX 组均有明显改善,动情周期明显恢复的中、高剂量组小鼠证明其恢复正常的排卵功能。3 种剂量的暖宫七味丸治疗 14 d 后均可以使小鼠体质量增长,但组间并无明显差异。与 CTX 组相比,高剂量组小鼠的血清 E2 水平上升明显,AMH 和 FSH 水平无明显差异,卵巢组织及结构有一定程度恢复,考虑药物治疗时间较短,尚未达到暖宫七味丸药物效应最佳时间。

实验结果表明,暖宫七味丸具有修复化疗型卵巢早衰小鼠的卵巢功能,促进排卵及恢复正常动情周期,对卵巢组织有一定修复作用,其中高剂量组疗效较明显。下一步需要延长治疗时间以进一步明确治疗效果。暖宫七味丸抑制 CTX 所致的小鼠卵巢早衰的机制需日后进一步研究明确。

#### 参考文献

[1] Lee SJ, Schover LR, Partridge AH, et al. American Society of Clinical Oncology recommendations on fertility preservation in cancer patients [J]. *J Clin Oncol*, 2006, 24(18): 2917-2931.

#### (上接第 35 页)

[13] Arrieta V, Sádaba J R, Álvarez V, et al. Galectin-3 as a novel biotarget in cardiovascular alterations associated to development of severe aortic stenosis [J]. *An Sist Sanit Navar* 2019, 42(2): 199-208.

[14] Calvier L, Miana M, Rebol P, et al. Galectin-3 mediates aldosterone-induced vascular fibrosis [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2013, 33(1): 67-75.

[15] Arrieta V, Martínez-Martínez E, Barrola J, et al. A role for galectin-3 in the development of early molecular alterations in short-term aortic stenosis [J]. *Clin Sci*, 2017, 131(10): 935-949.

[16] Calvier L, Martínez-Martínez E, Miana M, et al. The impact of galectin-3 inhibition on aldosterone-induced cardiac and renal injuries [J]. *JACC Heart Fail*, 2015, 3(1): 59-67.

[17] Kim JI, Jang HS, Jeong JH, et al. Defect in Runx2 gene accelerates ureteral obstruction-induced kidney fibrosis via increased TGF- $\beta$  signaling pathway [J]. *Biochim Biophys Acta* 2013, 1832(10): 1520-1527.

[18] Xu GR, Zhang C, Yang HX, et al. Modified citrus pectin ameliorates myocardial fibrosis and inflammation via

[2] Spears N, Lopes F, Stefansdottir A, et al. Ovarian damage from chemotherapy and current approaches to its protection [J]. *Hum Reprod Update*, 2019, 25(6): 673-693.

[3] Takahashi A, Yousif A, Hong L, et al. Premature ovarian insufficiency: pathogenesis and therapeutic potential of mesenchymal stem cell [J]. *J Mol Med (Berl)*, 2021, 99(5): 637-650.

[4] Karska P, Matonog A, Sieradzka P, et al. Fresh insight into premature ovarian insufficiency [J]. *Ginekol Pol*, 2021, 92(7): 518-524.

[5] 张玉林. 人羊膜上皮细胞修复大鼠卵巢功能不全的实验研究 [D]. 重庆: 重庆医科大学, 2020.

[6] Mclean AC, Valenzuela N, Fai S, et al. Performing vaginal lavage, crystal violet staining, and vaginal cytological evaluation for mouse estrous cycle staging identification [J]. *J Vis Exp* 2012, (67): e4389.

[7] Zonta YR, Martínez M, Camargo IC, et al. Melatonin reduces angiogenesis in serous papillary ovarian carcinoma of ethanol-preferring rats [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(4): 763.

[8] Pascuali N, Scotti L, Di Pietro M, et al. Ceramide-1-phosphate has protective properties against cyclophosphamide-induced ovarian damage in a mice model of premature ovarian failure [J]. *Hum Reprod*, 2018, 33(5): 844-859.

[9] 春莲, 吴伟乐斯, 其勒木格, 等. 苏格木勒-7 对 CTX 致卵巢功能低下大鼠的卵巢功能保护作用研究 [J]. *中国实验诊断学*, 2021, 25(9): 1390-1394.

(收稿日期: 2023-05-22)

suppressing galectin-3 and TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B signaling pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 126: 110071.

[19] Mo D, Tian W, Zhang H N, et al. Cardioprotective effects of galectin-3 inhibition against ischemia/reperfusion injury [J]. *Eur J Pharmacol*, 2019, 863: 172701.

[20] Boscher C, Nabi IR. Galectin-3 and phospho-caveolin-1-dependent outside-in integrin signaling mediates the EGF mitogenic response in mammary cancer cells [J]. *Mol Biol Cell* 2013, 24(13): 2134-2145.

[21] Boscher C, Zheng YZ, Lakshminarayan R, et al. Galectin-3 protein regulates mobility of N-cadherin and GM1 ganglioside at cell-cell junctions of mammary carcinoma cells [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(39): 32940-32952.

[22] Blanda V, Bracale UM, Di Taranto MD, et al. Galectin-3 in cardiovascular diseases [J]. *Int J Mol Sci* 2020, 21(23): 9232.

(收稿日期: 2023-07-03)