

[文章编号] 1671-587X(2026)01-0093-12

DOI:10.13481/j.1671-587X.20260110

特发性肺纤维化组织中脂肪酸代谢相关基因的生物信息学分析及实验验证

林 潇¹, 周 梦², 林 帆¹, 姚秀娟³

(1. 福州大学附属省立医院老年医学科, 福建 福州 350001; 2. 福州大学附属省立医院风湿免疫科, 福建 福州 350001; 3. 福州大学附属省立医院呼吸与危重症医学科, 福建 福州 350001)

[摘要] **目的:** 采用生物信息学方法鉴定特发性肺纤维化 (IPF) 组织中的核心脂肪酸代谢相关基因 (FAMRGs), 并通过实验验证上述基因是否在 IPF 组织和正常肺组织中呈显著差异表达。**方法:** 从基因表达综合数据库 (GEO) 下载 2 个 IPF 基因芯片数据集, 包括 GSE47460 数据集和 GSE150910 数据集, 人类基因综合数据库 (GeneCards) 中筛选 FAMRGs, GEO2R 工具筛选出 GSE47460 数据集中 IPF 组织和正常肺组织的差异表达基因 (DEGs), 通过对 DEGs 与 FAMRGs 绘制韦恩图, 获得差异表达的 FAMRGs。采用仙桃学术工具对上述基因进行富集分析, STRING 数据库分析并导入 Cytoscape 软件建立蛋白-蛋白相互作用 (PPI) 网络图并筛选出关键 FAMRGs, 通过 GSE150910 数据集对上述基因的表达水平进行验证, 并绘制受试者工作特征 (ROC) 曲线, 筛选出核心 FAMRGs。采用 CIBERSORT 网站分析在 IPF 组织中核心 FAMRGs 表达水平与免疫细胞浸润的关系。选取 18 只健康雄性 SD 大鼠, 随机分为对照组、IPF 组和吡非尼酮组, 每组 6 只。IPF 组和吡非尼酮组大鼠气管内注射博来霉素以制备肺纤维化模型, 对照组大鼠气管内注射等量生理盐水。造模成功后, 对照组和 IPF 组大鼠以 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 生理盐水灌胃, 吡非尼酮组大鼠以 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 吡非尼酮混悬液灌胃, 药物干预 14 d 后处死, 取出肺组织。采用 Masson 染色观察 3 组大鼠肺组织纤维化程度, Western blotting 法检测 3 组大鼠肺组织中的 FAMRGs 蛋白表达情况。**结果:** 共筛选出 182 个差异表达的 FAMRGs。基因本体论 (GO), 上述 FAMRGs 主要涉及激素调节、对肽类物质的反应、信号受体激动剂活性和细胞因子活性等功能。京都基因与基因组百科全书 (KEGG), 上述 FAMRGs 主要富集于白细胞介素 17 (IL-17) 信号通路、晚期糖基化终末产物-晚期糖基化终末产物受体 (AGE-RAGE) 信号通路和缺氧诱导因子-1 (HIF-1) 信号通路等。从 PPI 网络中鉴定出前 10 位关键 FAMRGs, 通过 GSE150910 数据集的验证, 确定基质金属蛋白酶 3 (MMP3)、分泌型磷蛋白 1 (SPP1) 和胰岛素样生长因子 1 (IGF1) 为 IPF 组织中核心 FAMRGs, 与正常肺组织比较呈明显高表达 ($P < 0.001$)。免疫浸润分析, 在 IPF 组织中浆细胞、调节性 T 细胞、M0 型巨噬细胞和静息肥大细胞的表达明显上调 ($P < 0.05$), 静息 CD4 记忆 T 细胞、静息自然杀伤 (NK) 细胞、单核细胞、嗜酸性粒细胞和中性粒细胞的表达则明显下调 ($P < 0.05$), Spearman 相关性, 在 IPF 组织中 SPP1 与 M0 型巨噬细胞表达水平呈正相关关系 ($P < 0.001$), 与单核细胞表达水平呈负相关关系 ($P < 0.001$)。Masson 染色, 与对照组比较, IPF 组大鼠肺组织中胶原纤维沉积明显增多; 与 IPF 组比较, 吡非尼酮组大鼠肺组织中胶原纤维沉积明显减少。Western blotting 法, 与对照组比较, IPF 组大鼠肺组织中的 MMP3、SPP1 和 IGF1 蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.05$); 与 IPF 组比较, 吡非尼酮组大鼠肺组织中的 MMP3、SPP1 和 IGF1 蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.05$)。**结论:** MMP3、SPP1 和 IGF1 为 IPF 组织中的核心 FAMRGs, 可作为未来 IPF 治疗的潜在靶点。

[收稿日期] 2025-04-08 [录用日期] 2025-05-31

[基金项目] 福建省科技厅科技创新联合基金项目 (2024Y9024); 福建省科技厅自然科学基金 (青年创新) 项目 (2023J05229)

[作者简介] 林 潇 (1987-), 男, 福建省福州市人, 副主任医师, 医学硕士, 主要从事肺纤维化的基础方面的研究。

[通信作者] 姚秀娟, 主任医师, 硕士研究生导师 (E-mail: yxj@fjmu.edu.cn)

©《吉林大学学报(医学版)》编辑部, 开放获取遵循 CC BY-NC-ND 协议。

© Editorial Board of Journal of Jilin University (Medicine Edition). Open access under CC BY-NC-ND license.

[关键词] 特发性肺纤维化; 脂肪酸代谢; 生物信息学; 免疫浸润; 吡非尼酮
[中图分类号] R563 [文献标志码] A

Bioinformatics analysis and experimental validation of fatty acid metabolism-related genes in idiopathic pulmonary fibrosis tissue

LIN Xiao¹, ZHOU Meng², LIN Fan¹, YAO Xiujuan³

(1. Department of Geriatric Medicine, Affiliated Provincial Hospital, Fuzhou University, Fuzhou 350001, China; 2. Department of Rheumatology and Immunology, Affiliated Provincial Hospital, Fuzhou University, Fuzhou 350001, China; 3. Department of Respiratory and Critical Care Medicine, Affiliated Provincial Hospital, Fuzhou University, Fuzhou 350001, China)

ABSTRACT Objective: To identify the core fatty acid metabolism-related genes (FAMRGs) in idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) tissue using bioinformatics methods, and to experimentally verify whether these genes are significantly differentially expressed in IPF tissue and normal lung tissue. **Methods:** Two IPF gene chip datasets, including the GSE47460 dataset and the GSE150910 dataset, were downloaded from the Gene Expression Omnibus (GEO) database; FAMRGs were screened from the Human Gene Comprehensive Database (GeneCards) database; the GEO2R tool was used to screen the differentially expressed genes (DEGs) between IPF tissue and normal lung tissue in GSE47460 dataset; Venn diagram was drawn between the DEGs and FAMRGs to obtain the differentially expressed FAMRGs. Xiantao Academic Tool was used to perform functional enrichment analysis on the above genes; the STRING database was used for analysis and Cytoscape software was used to establish a protein-protein interaction (PPI) network and screen the key FAMRGs; the GSE150910 dataset was used to verify the expression levels of the above genes, and receiver operating characteristic (ROC) curves were plotted to screen the core FAMRGs. The CIBERSORT database was used to analyze the relationship between the core FAMRGs and immune cell infiltration in IPF tissue. Eighteen healthy male SD rats were selected and randomly divided into control group, IPF group, and pirfenidone group, with 6 rats in each group. The rats in IPF group and pirfenidone group were intratracheally injected with bleomycin to establish the pulmonary fibrosis model, and the rats in control group were intratracheally injected with an equal volume of normal saline. After successful modeling, the rats in control group and IPF group were given $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ normal saline by gavage, and the rats in pirfenidone group were given $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ pirfenidone suspension by gavage; after 14 d of drug intervention, the rats were sacrificed and lung tissue was taken. Masson staining was used to observe the degree of fibrosis in lung tissue of the rats in the three groups; Western blotting method was used to detect the expression of FAMRGs proteins in lung tissue of the rats in three groups. **Results:** A total of 182 differentially expressed FAMRGs were screened. The Gene Ontology (GO) analysis results showed that the above FAMRGs were mainly involved in functions such as hormone regulation, response to peptide substances, signaling receptor agonist activity, and cytokine activity. The Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) analysis results showed that the above FAMRGs were mainly enriched in signaling pathways such as interleukin-17 (IL-17) signaling pathway, advanced glycation end products-receptor for advanced glycation end products (AGE-RAGE) signaling pathway, and hypoxia-inducible factor-1 (*HIF-1*) signaling pathway. Ten key FAMRGs were identified from the PPI network. Through validation with the GSE150910 dataset, matrix metalloproteinase 3 (*MMP3*), secreted phosphoprotein 1 (*SPP1*), and insulin-like growth factor 1 (*IGF1*) were determined as the core FAMRGs

in IPF tissue, and their expressions were significantly higher compared with normal lung tissue ($P < 0.001$). The immune infiltration analysis results showed that in IPF tissue, the expressions of plasma cells, regulatory T cells, M0 macrophages, and resting mast cells were significantly up-regulated ($P < 0.05$), while the expressions of resting CD4 memory T cells, resting natural killer (NK) cells, monocytes, eosinophils, and neutrophils were significantly down-regulated ($P < 0.05$); the Spearman correlation analysis results showed that in IPF tissue, the expression level of SPP1 was positively correlated with the expression level of M0 macrophages ($P < 0.001$), and negatively correlated with the expression level of monocytes ($P < 0.001$). The Masson staining results showed that compared with control group, the collagen fiber deposition in lung tissue of the rats in IPF group was significantly increased; compared with IPF group, collagen fiber deposition in lung tissue of the rats in pirfenidone group was significantly decreased. The Western blotting results showed that compared with control group, the expression levels of MMP3, SPP1, and IGF1 proteins in lung tissue of the rats in IPF group were significantly increased ($P < 0.05$); compared with IPF group, the expression levels of MMP3, SPP1, and IGF1 proteins in lung tissue of the rats in pirfenidone group were significantly decreased ($P < 0.05$). **Conclusion:** MMP3, SPP1, and IGF1 are the FAMRGs in IPF tissue and can serve as potential targets for future IPF treatment.

KEYWORDS Idiopathic pulmonary fibrosis; Fatty acid metabolism; Bioinformatics; Immune infiltration; Pirfenidone

特发性肺纤维化 (idiopathic pulmonary fibrosis, IPF) 是一种病因不明的慢性、进行性纤维化的间质性肺病, 伴随呼吸道症状的持续恶化及肺功能的降低, 最终导致死亡^[1]。IPF 预后差, 诊断后的中位生存期为 3~5 年^[2]。吡非尼酮和尼达尼布是目前美国食品药品监督管理局 (Food and Drug Administration, FDA) 批准用于治疗 IPF 的药物, 然而上述药物只能延缓疾病的进展, 不能逆转或预防 IPF^[3]。因此, 探索 IPF 可能的发病机制并识别特定的关键基因是实现精准医疗并改善患者预后的有效策略。脂质代谢与 IPF 的发展之间存在一定的关联, 如前列腺素 E2 作为脂质代谢中花生四烯酸环氧合酶的代谢产物, 在 IPF 小鼠模型中可抑制成纤维细胞的增殖及其向肌成纤维细胞的转化, 具有保护作用^[4]。研究^[5]显示: 抑制 IPF 小鼠模型中脂肪酸合酶的表达可降低转化生长因子 β (transforming growth factor- β , TGF- β) 诱导的肺纤维化程度。他汀类药物广泛应用于高脂血症的治疗, 可降低 IPF 急性加重患者的住院次数和死亡率^[6], 间接提示脂肪酸代谢可能参与了肺纤维化的发病过程。目前脂肪酸代谢与 IPF 关系的研究报道较少, 故有必要寻找新的脂肪酸代谢相关基因 (fatty acid metabolism-related genes, FAMRGs) 或分子通路以了解 IPF 的发病机制。本研究首先通过生物信息学方法确定 IPF 组织中的核心 FAMRGs, 然后通过外部实验验证上述基因在 IPF 大鼠肺组织模型中的表达, 旨在

为 IPF 患者探索新的治疗靶点提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 公共数据来源 在基因表达综合数据库 (Gene Expression Omnibus, GEO) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>) 中以“interstitial lung disease”和“pulmonary fibrosis”为关键词进行检索, 筛选条件需满足样本量 > 20 , 同时包含 IPF 患者和健康对照者的肺组织样本, 最终下载 2 个基因芯片数据集 (GSE47460 和 GSE150910) 作为分析对象。GSE47460 数据集有 2 个平台 (GPL6480 和 GPL14550), 本研究选择 GPL14550 平台下的 GSE47460 数据集作为训练集, 其中包含 122 例 IPF 患者和 91 名健康对照者的肺组织。GSE150910 数据集作为验证集, 其中包含 103 例 IPF 患者和 103 名健康对照者的肺组织。本研究从人类基因综合数据库 (GeneCards) (<https://www.genecards.org/>) 中筛选 FAMRGs, 以“fatty acid metabolism”为关键词检索相关基因, 根据既往文献 [7-8], 按照数据库检索出的基因相关性评分 > 7 分作为筛选条件, 共得到 3 754 个 FAMRGs。

1.2 实验动物、主要试剂和仪器 18 只 8 周龄 SPF 级健康雄性 SD 大鼠购自北京斯贝福生物科技股份有限公司, 动物生产许可证号: SCXK (京) 2024-0001, 体质量 (200 ± 20) g。将大鼠安置于动物房饲养, 通风好, 室温 $20^\circ\text{C} \sim 26^\circ\text{C}$, 湿度 $40\% \sim 70\%$, 每日光照时间 12 h, 定时喂食、喂水及更换饲料,

适应性饲养7 d后进行研究。博来霉素购自北京索莱宝科技有限公司(规格:每瓶125 mg),用生理盐水配置成 $6\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的溶液;吡非尼酮胶囊购自北京康蒂尼药业股份有限公司(规格:每粒100 mg),溶于生理盐水中配置成 $10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 混悬液;Masson三色染色液、羊抗鼠辣根过氧化物酶标记抗体和羊抗兔辣根过氧化物酶标记抗体均购自武汉赛维尔生物科技有限公司;兔抗基质金属蛋白酶3(matrix metalloproteinase 3, MMP3)单克隆抗体和兔抗分泌型磷蛋白1(secreted phosphoprotein 1, SPP1)单克隆抗体均购自美国ImmunoWay公司;兔抗胰岛素样生长因子1(insulin-like growth factor 1, IGF1)单克隆抗体购自北京博奥森生物技术有限公司;鼠抗甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)单克隆抗体购自北京全氏金生物技术有限公司;聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜购自美国Millipore公司;放射免疫沉淀(radioimmunoprecipitation, RIPA)细胞裂解液购自北京普利莱基因技术有限公司;增强化学发光(enhanced chemiluminescence, ECL)液购自美国赛默飞公司;BCA蛋白定量试剂盒购自武汉伊莱瑞特生物科技有限公司。组织脱水机购自金华市科迪仪器设备有限公司,石蜡包埋机、切片机和摊片机均购自德国Leica公司,光学显微镜(型号:BX43)购自日本奥林巴斯公司,全自动化学发光成像系统(型号:Tanon-5200)购自上海天能科技有限公司,低温高速离心机(型号:5424R)购自德国Eppendorf公司,全自动酶标仪(型号:SuPerMax 3100)购自上海闪谱生物科技有限公司,蛋白垂直电泳仪(型号:DYY-6C)购自北京六一仪器厂。

1.3 差异表达FAMRGs的筛选 GEO2R在线工具(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/geo2r>)筛选GSE47460数据集中IPF组织和正常肺组织的差异表达基因(differentially expressed genes, DEGs),筛选条件为 $|\log_2\text{FC}|>1$ 且校正后 $P<0.05$ 。仙桃学术工具(<https://www.xiantaozi.com>)绘制DEGs的火山图和热图以及DEGs与FAMRGs的韦恩图,从而获得差异表达的FAMRGs。

1.4 基因本体论(Gene Ontology, GO)功能富集分析和京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)信号通路富集分析 仙桃学术工具对差异表达FAMRGs进行GO功能

富集分析和KEGG信号通路富集分析。以 $P<0.05$ 作为筛选条件,选取GO功能富集分析和KEGG信号通路富集分析排名前5位的条目(表1),并绘制GO气泡图和KEGG弦图。

1.5 差异表达FAMRGs编码的蛋白-蛋白相互作用(protein-protein interaction, PPI)分析及关键基因筛选 STRING数据库(<http://string-db.org>)对差异表达FAMRGs进行PPI分析,并导入Cytoscape 3.7.1软件以进一步绘制PPI网络图。采用CytoHubba插件下的MCC算法,计算出得分前10位的关键FAMRGs。

1.6 关键FAMRGs表达水平的验证 GSE150910数据集用于验证关键FAMRGs在IPF组织和正常肺组织的表达差异,同时绘制上述基因在训练集和验证集中的受试者工作特征(receiver operating characteristic, ROC)曲线,以确定核心FAMRGs。

1.7 IPF免疫浸润分析和核心FAMRGs与免疫细胞浸润的关系 通过在线CIBERSORT网站(<https://cibersort.stanford.edu/>)评估GSE47460和GSE150910数据集中IPF组织和正常肺组织的各型免疫细胞表达,筛选出上述2个数据集中IPF组织和正常肺组织呈差异表达的免疫细胞类型。进一步分析在IPF组织中核心FAMRGs表达水平与差异表达免疫细胞浸润之间的相关性。

1.8 实验动物模型制备和给药 将18只大鼠随机分为对照组、IPF组和吡非尼酮组,每组6只。麻醉大鼠,仰卧位固定于手术台,常规备皮、消毒后,于颈部正中行纵向切口,逐层分开并分离组织,暴露气管,从气管软骨环间隙进针,IPF组和吡非尼酮组大鼠气管内注射配置好的 $6\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 博来霉素溶液,对照组向大鼠气管内注射同等体积的生理盐水。注射完毕后将大鼠直立、旋转10次,再缝合切口。造模1 d后,对照组和IPF组大鼠分别以 $10\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 生理盐水灌胃,吡非尼酮组大鼠给予配置好的吡非尼酮混悬液以 $10\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 灌胃。上述药物干预后,于第14天处死大鼠并取材。

1.9 Masson染色评估各组大鼠肺纤维化程度 处死大鼠后,摘取肺组织。对肺组织进行切片、烤片、脱蜡和水化后,进行Masson染色,依次经重铬酸钾染液染色3 min、苏木素染色3 min,酸性乙醇分化液分化后,丽春红酸性品红染色液染色10 min,磷钼酸处理10 min后,甲苯胺蓝染色5 min,切片脱水后用二甲苯透明切片,封片,光

学显微镜观察各组大鼠肺间质、支气管壁及血管壁蓝色胶原纤维沉积情况以评估肺组织纤维化程度。

1.10 Western blotting 法检测各组大鼠肺组织中 MMP3、SPP1 和 IGF1 蛋白表达情况 取出大鼠肺组织, 加入 RIPA 裂解液, 用组织研磨仪进行研磨, 提取组织总蛋白, $12\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 采用 BCA 蛋白定量试剂盒测定各组大鼠肺组织上清液总蛋白浓度。将蛋白质加热变性后, 行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate polycrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 1.5 h, 后用 300 mA 恒流转膜 1 h。PVDF 膜用脱脂奶粉封闭后, MMP3 抗体、SPP1 抗体和 IGF1 抗体及 GAPDH 抗体 $4\ ^\circ\text{C}$ 孵育过夜, 次日 PVDF 膜室温孵育二抗 2 h, 用 ECL 液浸湿 PVDF 膜, 置于化学发光成像系统中显影, 并采用 Image-Pro 软件分析蛋白条带灰度值, 以 GAPDH 为内参, 计算目的蛋白表达水平。目的蛋白表达水平=目的蛋白条带灰度值/内参蛋白条带灰度值。

1.11 统计学分析 采用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析。生物信息学部分采用 Wilcoxon 检验分析 IPF 组和健康对照组基因表达水平及免疫细胞浸润的差异, 采用 Spearman 相关性分析检测 IPF 组织中核心 FAMRGs 表达水平与差异表达免疫细胞浸润之间的相关性。实验部分中各组大鼠肺组织中 MMP3、SPP1 和 IGF1 蛋白表达水平均符合正态分布, 以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 多组间样本均数比较采用单因素方差分析, 组间样本均数两两比较采用 LSD-*t* 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 IPF 组织中差异表达 FAMRGs 的筛选

针对 GSE47460 数据集进行差异表达分析, 如图 1A 火山图所示, 共鉴定出 870 个 DEGs, 包括 578 个上调基因和 292 个下调基因。图 1B 和 C 分别显示了前 50 个上调基因和前 50 个下调基因的热图。将 FAMRGs 与鉴定出来的 DEGs 进行交叉分析, 最终筛选出 182 个差异表达 FAMRGs (图 1D)。

2.2 IPF 组织中差异表达 FAMRGs 的富集分析

对 182 个差异表达 FAMRGs 进行 GO 功能富集分析和 KEGG 信号通路富集分析。GO 功能富集分析结果显示: 生物过程 (biological process, BP) 方面, 上述基因主要富集于激素调节水平、对肽类物质的反应和对外源性刺激的反应等 (图 2A); 细胞组成 (cellular component, CC) 方面, 主要富集于含胶原蛋白的细胞外基质、内质网腔和分泌颗粒腔等 (图 2B); 分子功能 (molecular function, MF) 涉及信号受体激动剂活性、受体配体活性和细胞因子活性等 (图 2C)。KEGG 信号通路富集分析结果显示: 上述基因主要与白细胞介素 17 (interleukin-17, IL-17) 信号通路、晚期糖基化终末产物-晚期糖基化终末产物受体 (advanced glycation end product-receptor of advanced glycation end product, AGE-RAGE) 信号通路和缺氧诱导因子-1 (hypoxia inducible factor-1, HIF-1) 信号通路等有关 (图 2D 和表 1)。

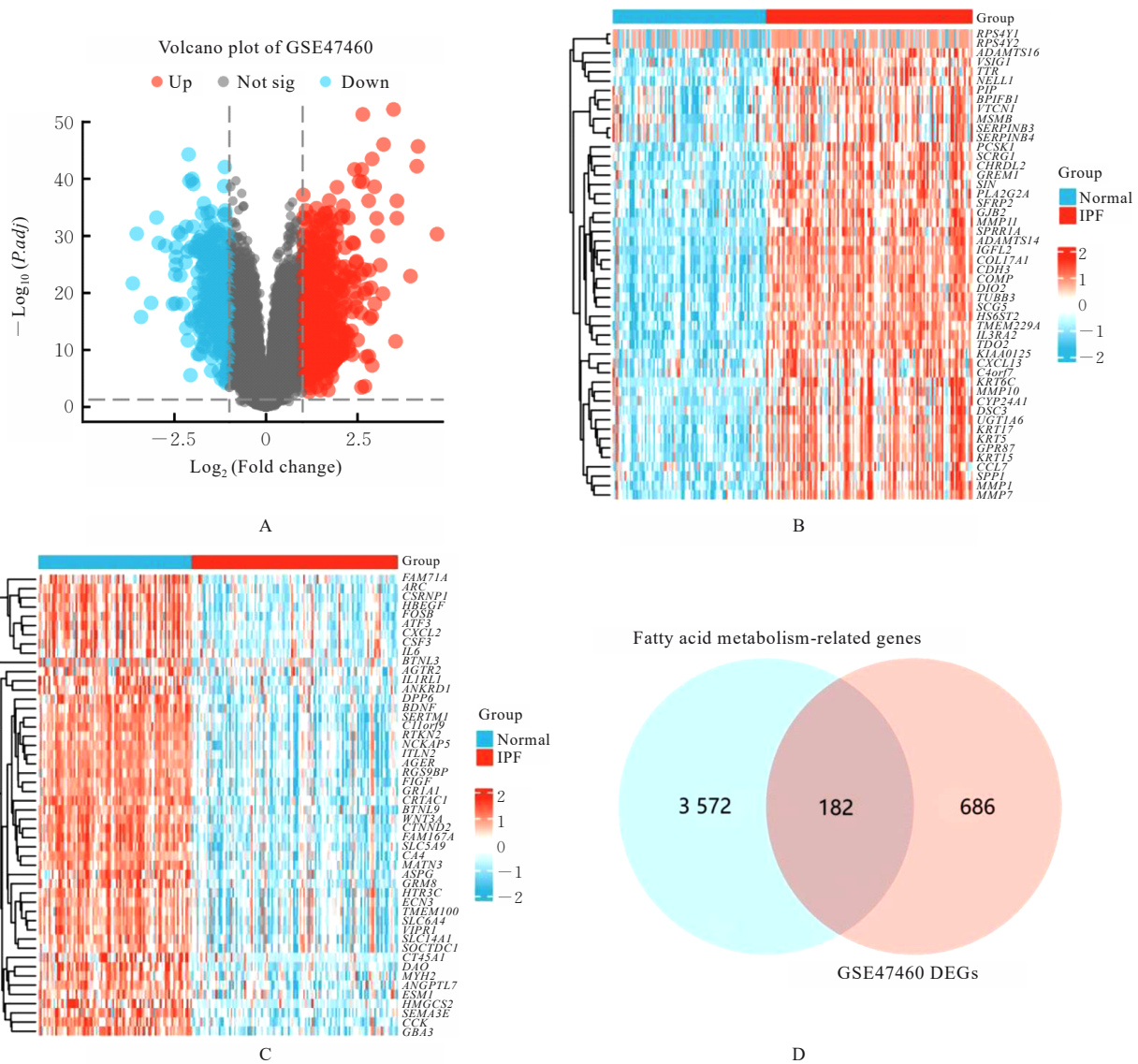
2.3 PPI 网络构建及 IPF 组织中关键 FAMRGs 的鉴定

将差异表达 FAMRGs 导入到 STRING 在线数据库进行 PPI 分析, 然后采用 Cytoscape 软件获得 1 个由 181 个节点和 947 条连线构成的 PPI 网络图 (图 3A)。采用 CytoHubba 插件下的 MCC 算法获得前 10 位关键 FAMRGs, 并构建 PPI 网络图 (图 3B), 上述 10 个基因分别为白细胞介素 6

表 1 IPF 组织中差异表达 FAMRGs 的 KEGG 信号通路富集分析

Tab. 1 KEGG signaling pathway enrichment analysis on differentially expressed FAMRGs in IPF tissue

ID	Term	Count	P	Gene
hsa04657	IL-17 signaling pathway	11	8.51E-07	<i>MMP1, CCL11, MMP3, CCL7, IL-6, FOS, LCN2, MUC5B, PTGS2, IL-13, CSF3</i>
hsa00980	Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450	9	9.86E-06	<i>CYP2F1, GSTA2, CYP3A5, ADH4, UGT1A6, CYP2A7, CYP1B1, ADH7, ALDH3A1</i>
hsa04933	AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications	10	1.14E-05	<i>EDN1, AGER, VEGFA, COL4A3, EGR1, IL-6, COL3A1, TGFB3, IL-1α, SERPINE1</i>
hsa04066	HIF-1 signaling pathway	10	2.45E-05	<i>EDN1, NOS2, TEK, TF, VEGFA, IL-6, IGF1, PFKFB3, SERPINE1, PDK1</i>
hsa00982	Drug metabolism - cytochrome P450	8	4.13E-05	<i>GSTA2, CYP3A5, ADH4, UGT1A6, CYP2A7, ADH7, FMO1, ALDH3A1</i>



A: DEGs volcano plot of GSE47460 dataset; B: Top 50 up-regulated DEGs heatmap of GSE47460 dataset; C: Top 50 down-regulated DEGs heatmap of GSE47460 dataset; D: Venn diagram for DEGs in the GSE47460 dataset and FAMRGs.

图1 IPF组织中差异表达FAMRGs的鉴定

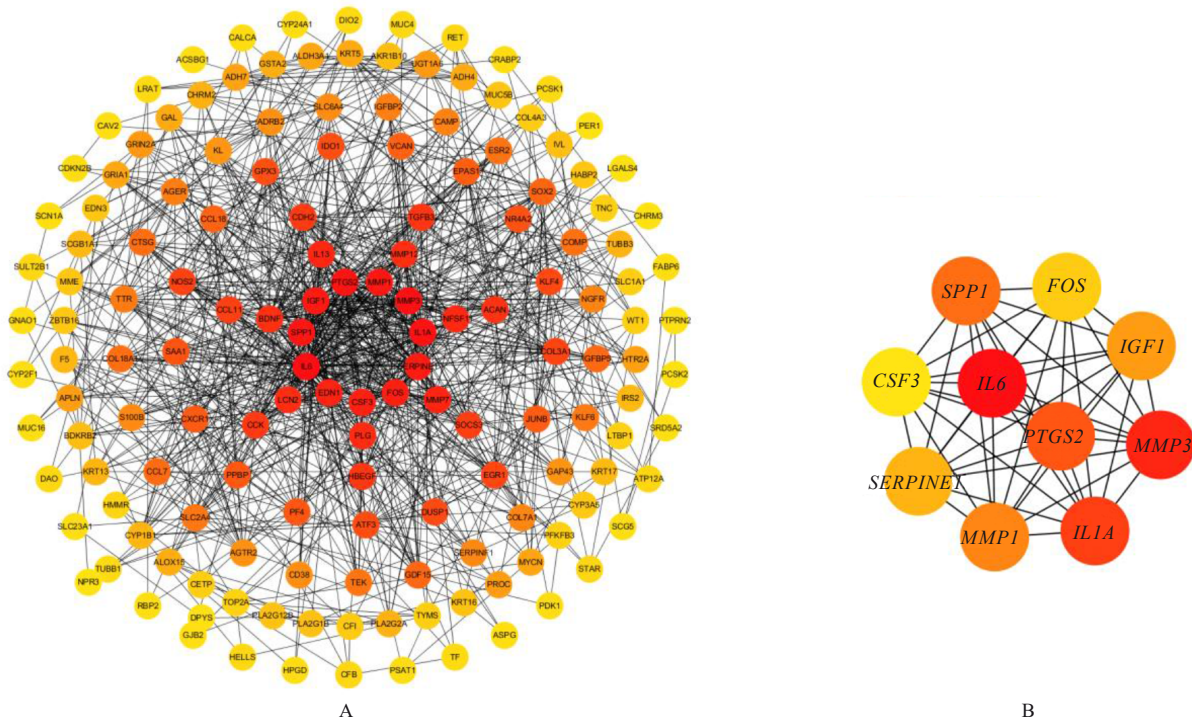
Fig. 1 Identification of differentially expressed FAMRGs in IPF tissue

(interleukin-6, *IL-6*)、*MMP3*、白细胞介素 1 α (interleukin-1 α , *IL-1 α*)、前列腺素内过氧化物合酶 2 (prostaglandin-endoperoxide synthase 2, *PTGS2*)、*SPP1*、基质金属蛋白酶 1 (matrix metalloproteinase 1, *MMP1*)、*IGF1*、丝氨酸蛋白酶抑制剂家族 E 成员 1 (serpin family E member 1, *SERPINE1*)、Fos 原癌基因 (Fos proto-oncogene, *FOS*) 和集落刺激因子 3 (colony stimulating factor 3, *CSF3*)。

2.4 关键 FAMRGs 在 GSE150910 数据集中的验证

通过在 GSE150910 数据集中验证上述 10 个关键 FAMRGs 在 IPF 组织和正常肺组织中的表达

差异, 结果显示: *MMP3*、*SPP1* 和 *IGF1* 基因在 GSE150910 和 GSE47460 数据集中均呈现显著差异表达, 与正常肺组织比较, 上述 3 个基因在 IPF 组织中明显高表达 ($P < 0.001$) (图 4A)。进一步绘制上述 3 个 FAMRGs 在这 2 个数据集中的诊断 ROC 曲线 (图 4B), 结果显示: 在 GSE150910 数据集中, *MMP3*、*SPP1* 和 *IGF1* 基因的 ROC 曲线下面积 (area under the curve, AUC) 分别为 0.729 [95% 置信区间 (confidence interval, CI): 0.659~0.799, $P < 0.001$]、0.852 (95% CI: 0.799~0.905, $P < 0.001$) 和 0.896 (95% CI: 0.852~0.939, $P <$



A: PPI network of differentially expressed FAMRGs in IPF tissue; B: PPI network of ten key FAMRGs.

图3 IPF组织中关键FAMRGs的鉴定

Fig. 3 Identification of key FAMRGs in IPF tissue

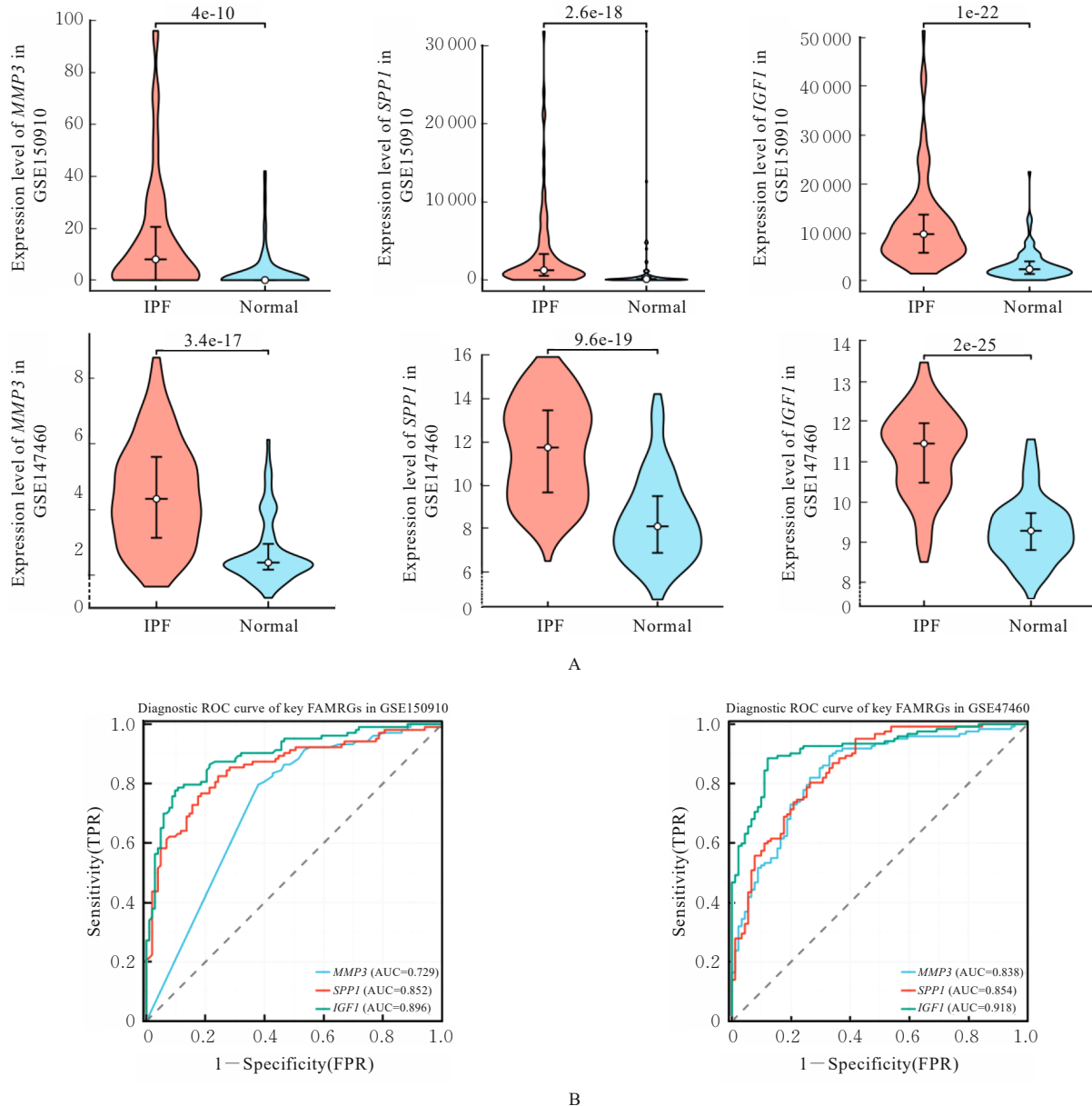
0.001; GSE150910; $r = -0.453$, $P < 0.001$).

2.6 3组大鼠肺组织纤维化程度和肺组织中MMP3、SPP1和IGF1蛋白表达水平 3组大鼠肺组织进行Masson染色,结果如图6所示,对照组大鼠肺组织仅见支气管壁周围少量纤维化,IPF组大鼠肺组织可见肺间质、支气管壁及血管壁大量蓝色胶原纤维沉积;与IPF组比较,吡非尼酮组大鼠肺组织可见胶原纤维沉积明显减少。Western blotting法检测结果显示:与对照组比较,IPF组大鼠肺组织中MMP3、SPP1和IGF1蛋白表达水平明显升高($P < 0.05$);与IPF组比较,吡非尼酮组大鼠肺组织中MMP3、SPP1和IGF1蛋白表达水平明显降低($P < 0.05$)。见图7。通过外部实验,最终验证了MMP3、SPP1和IGF1为IPF组织中的核心FAMRGs。

3 讨论

本研究共筛选出182个差异表达的FAMRGs,GO功能富集分析提示上述基因主要涉及激素调节、对肽类物质的反应、信号受体激动剂活性和细胞因子活性等功能,CC主要涉及细胞外基质和内质网腔等。研究^[9]显示:脂肪酸的合成和代谢与甲状腺激素的调节具有密切联系,甲状腺激素可能

通过调节核受体亚家族2F组成员2(nuclear receptor subfamily 2 group F member 2, NR2F2)基因抑制成纤维细胞活化和细胞外基质产生,改善小鼠肺纤维化^[10],但目前脂肪酸代谢紊乱是否涉及甲状腺激素信号传导参与IPF发病尚未见相关报道,有待进一步探索。瘦素和脂联素是由脂肪组织产生的肽类物质,在调控脂肪酸代谢中发挥重要作用,目前这2种物质如何参与IPF发病存在争议,ENOMOTO等^[11]发现血清瘦素和脂联素水平在IPF急性加重期患者中明显升高,但WANG等^[12]发现脂联素通过抑制核因子 κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)信号通路降低肺组织中肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、IL-6和白细胞介素1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)等细胞因子水平,发挥抗纤维化作用。本研究中KEGG信号通路主要富集于IL-17信号通路、AGE-RAGE信号通路和缺氧诱导因子-1信号通路等,IL-17作为一种促炎细胞因子,其通过调节脂肪酸代谢中的关键基因促进肝脂肪变性^[13],而IL-17与肺纤维化的发病和进展密切相关。IL-17A通过产生TGF- β 诱导肺泡上皮细胞的上皮-间质转化,并抑制自噬,达到促纤维化效应^[14]。AGEs是由蛋白质和脂质在衰老



A: Expression levels of three key FAMRGs in IPF tissue and normal lung tissue in GSE150910 and GSE47460 datasets; B: Diagnostic ROC curve of three key FAMRGs in GSE150910 and GSE47460 dataset.

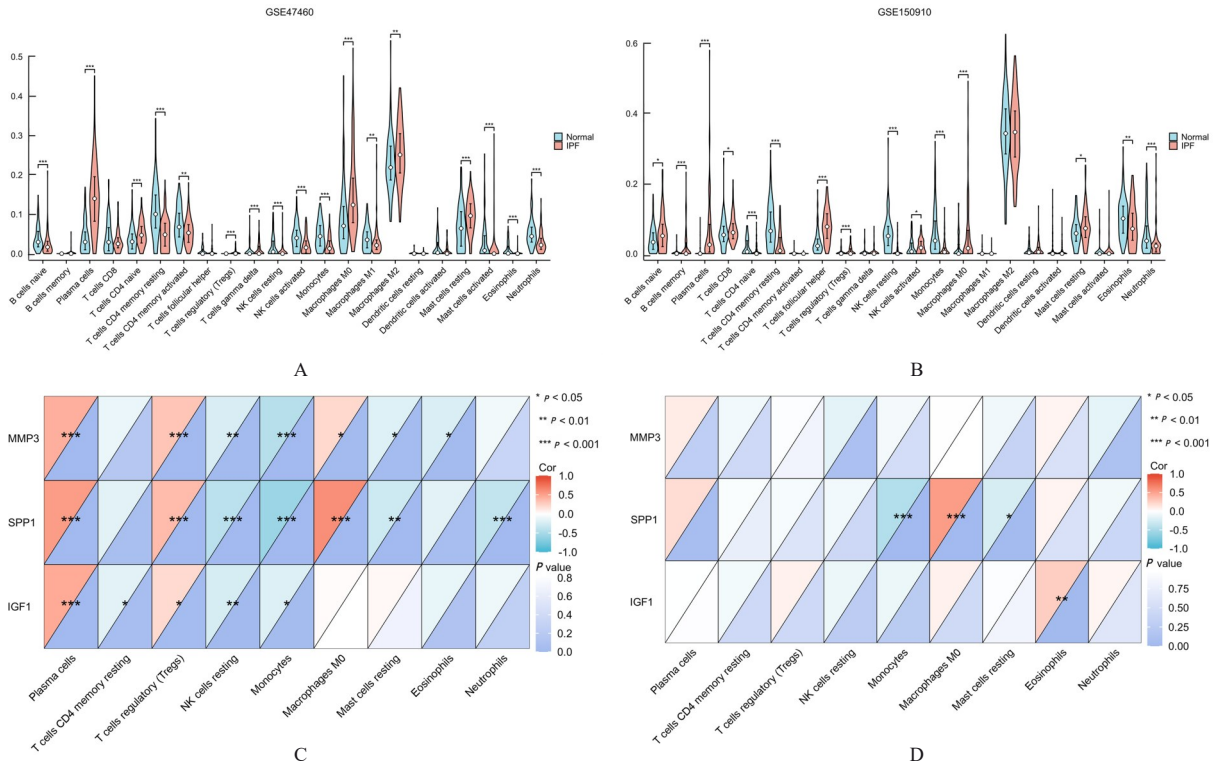
图4 在 GSE150910 和 GSE47460 数据集中关键 FAMRGs 的表达水平及诊断 ROC 曲线

Fig. 4 Expression levels and diagnostic ROC curves of key FAMRGs in GSE150910 and GSE47460 datasets

过程中与各种氧化剂的非酶促反应中获得, RAGE 与肺泡稳态和肺纤维化有关, 而内源性分泌 RAGE 可抑制 RAGE 与配体相互作用影响 IPF 发病进程^[15]。

本研究结果显示: *MMP3*、*SPP1* 和 *IGF1* 基因在 IPF 组织中上调的 FAMRGs。*MMP3* 作为 MMP 家族中的一员, 其与脂肪酸代谢调节存在密切关联。DENG 等^[16] 发现: 棕榈酸可上调 *MMP3* mRNA 的表达, 促进软骨细胞炎症反应, 而二十碳五烯酸可抑制 *MMP3* 和 *MMP13* 表达, 从而抑制

棕榈酸对软骨细胞的炎症作用。多数 MMP 均具有促进肺纤维化的作用, 其中 *MMP3* 可通过多种途径促进 IPF, 包括激活肺上皮细胞中的 β -连环蛋白 (β -catenin) 信号转导促进上皮-间质转化以及抑制肺泡上皮细胞修复, 促进其凋亡等^[17]。*SPP1* 与骨骼矿化和重塑、细胞黏附和炎症反应等功能有关, 敲除小鼠肝细胞中 *SPP1* 表达可促进脂肪酸氧化并改善酒精相关性肝病^[18], 而 *SPP1* 已被发现具有普遍的促纤维化作用, MORSE 等^[19] 发现 *SPP1* 在



A: Expression levels of each immune cell in IPF tissue and normal lung tissue in GSE47460 dataset; B: Expression levels of each immune cell in IPF tissue and normal lung tissue in GSE150910 dataset; C: Correlation heatmap of expression between core FAMRGs and differentially expressed immune cells in IPF tissue in GSE47460 dataset; D: Correlation heatmap of expression between core FAMRGs and differentially expressed immune cells in IPF tissue in GSE150910 dataset. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

图5 IPF的免疫浸润分析及核心FAMRGs与免疫细胞浸润的相关性

Fig. 5 Immunoinfiltration analysis on IPF and correlation between core FAMRGs and immune cell infiltration

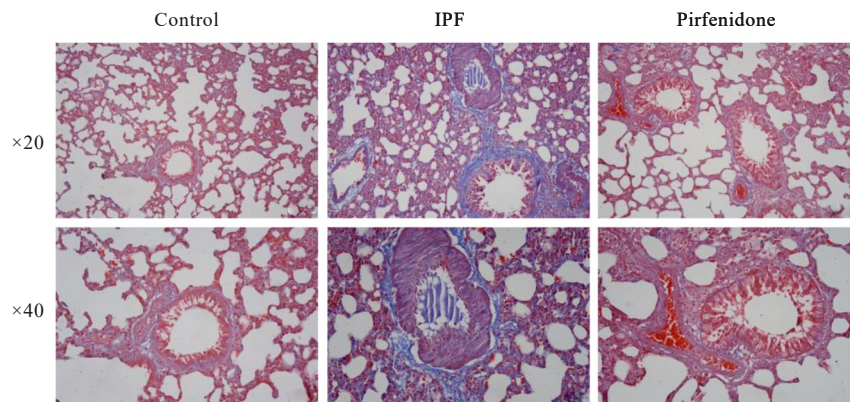
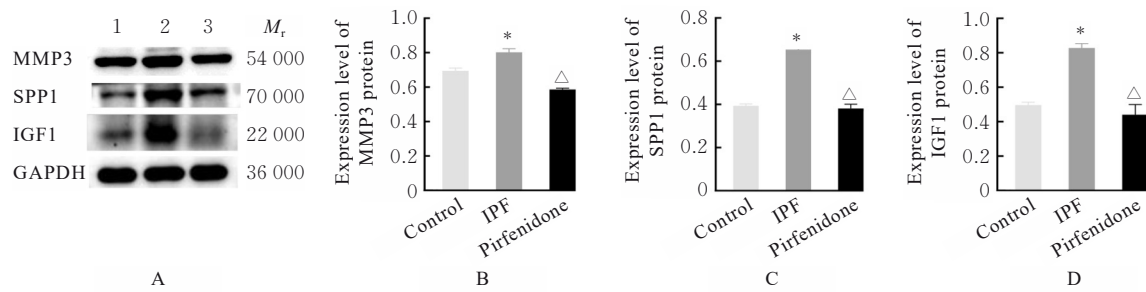


图6 各组大鼠肺组织中胶原纤维沉积情况(Masson染色)

Fig.6 Collagen fiber deposition in lung tissue of rats in various groups (Masson staining)

IPF的巨噬细胞亚群中表达水平升高, YUE等^[20]研究表明: *SPP1*过表达通过磷脂酰肌醇3-激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)/蛋白激酶B(protein kinase B, AKT)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)信号通路促进IPF成纤维细胞增殖。*IGF1*具有促进生

长、调节代谢和免疫等作用, 也参与脂肪酸代谢调节。游离脂肪酸可诱导内质网应激并抑制软骨细胞中*IGF1*介导的信号转导, 促进骨关节炎的发展^[21]。*IGF-1*及其信号通路也被证实广泛参与肺纤维化的发展, ZHANG等^[22]发现*IGF1*通过ROS介导的AKT/糖原合成酶激酶3 β (glycogen synthase



Lane 1: Control group; Lane 2: IPF group; Lane 3: Pirfenidone group. * $P < 0.05$ compared with control group; $\Delta P < 0.05$ compared with IPF group.

图7 各组大鼠肺组织中MMP3、SPP1和IGF1的蛋白表达电泳图(A)及直条图(B~D)

Fig. 7 Electrophoregram (A) and histograms (B-D) of expressions of MMP3, SPP1, and IGF1 proteins in lung tissue of rats in various groups

kinase-3 β , GSK3 β) 信号驱动 NF- κ B/NOD 样受体家族 3 (NOD-like receptor protein 3, NLRP3) 通路, 刺激煤尘颗粒诱导肺纤维化。DING 等^[23]发现中药红景天可抑制 IGF1 信号通路从而改善肺泡上皮细胞衰老, 抑制 IPF 发展。

免疫细胞浸润和免疫微环境失调参与 IPF 进展。本研究对 GSE47460 和 GSE150910 数据集进行免疫浸润分析, 结果显示: 与正常肺组织比较, IPF 组织中浆细胞、调节性 T 细胞、M0 型巨噬细胞和静息肥大细胞的表达水平明显升高, 与 WU 等^[24]研究结果一致。在 IPF 组织中, SPP1 表达水平与 M0 型巨噬细胞表达水平呈正相关关系, 与单核细胞表达水平呈负相关关系。肺泡损伤会促进单核细胞衍生的巨噬细胞募集以及巨噬细胞的极化, 通过释放促纤维化介质激活成纤维细胞分化、积累, 促进 IPF 发生^[25]。YANG 等^[26]研究表明: SPP1 基因在 IPF 患者肺组织中呈现高表达, 并与巨噬细胞活性呈正相关关系, 敲低 SPP1 基因抑制巨噬细胞纤维化相关因子的分泌以及上皮细胞与成纤维细胞的上皮-间质转化。基于这一发现, 以 SPP1 基因及其下游免疫信号通路作为靶点有望为新型靶向治疗的研发提供线索。

综上所述, 本研究最终确定了 MMP3、SPP1 和 IGF1 基因为 IPF 组织中的 FAMRGs, 并探讨了上述基因与 IPF 免疫微环境之间的关系, 这一发现对于突破 IPF 治疗瓶颈, 开发新型靶向治疗药物提供了策略。未来需进一步深入探索上述基因如何介导脂肪酸代谢相关分子通路参与 IPF 的发病机制。

利益冲突声明:

所有作者声明不存在利益冲突。

作者贡献声明:

林潇参与实验设计和论文撰写, 周梦和林帆参与实验过程及统计学分析, 姚秀娟参与论文修改及审校。

[参考文献]

- [1] 张明悦, 侯 艳. 脂联素在特发性肺纤维化中的作用机制及应用研究进展[J/OL]. 解放军医学杂志, 1-12 [2025-11-1]. <https://link.cnki.net/urlid/11.1056.R.20251022.1142.004>.
- [2] MARTINEZ F J, COLLARD H R, PARDO A, et al. Idiopathic pulmonary fibrosis[J]. Nat Rev Dis Primers, 2017, 3: 17074.
- [3] LI X H, WANG Y H, LIANG J J, et al. Bergenin attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice via inhibiting TGF- β 1 signaling pathway[J]. Phytother Res, 2021, 35(10): 5808-5822.
- [4] BERHAN A, HARRIS T, JAFFAR J, et al. Cellular microenvironment stiffness regulates eicosanoid production and signaling pathways[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2020, 63(6): 819-830.
- [5] JUNG M Y, KANG J H, HERNANDEZ D M, et al. Fatty acid synthase is required for profibrotic TGF- β signaling[J]. FASEB J, 2018, 32(7): 3803-3815.
- [6] KREUTER M, BONELLA F, MAHER T M, et al. Effect of statins on disease-related outcomes in patients with idiopathic pulmonary fibrosis[J]. Thorax, 2017, 72(2): 148-153.
- [7] XU M M, ZHOU H, HU P, et al. Identification and validation of immune and oxidative stress-related diagnostic markers for diabetic nephropathy by WGCNA and machine learning[J]. Front Immunol, 2023, 14: 1084531.
- [8] XU S, LI X Z, ZHANG S H, et al. Oxidative stress gene expression, DNA methylation, and gut microbiota

- interaction trigger Crohn's disease: a multi-omics Mendelian randomization study [J]. *BMC Med*, 2023, 21(1): 179.
- [9] SINHA R A, SINGH B K, YEN P M. Direct effects of thyroid hormones on hepatic lipid metabolism [J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2018, 14(5): 259-269.
- [10] WANG L, LI Z Z, WAN R Y, et al. Single-cell RNA sequencing provides new insights into therapeutic roles of thyroid hormone in idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2023, 69(4): 456-469.
- [11] ENOMOTO N, OYAMA Y, YASUI H, et al. Analysis of serum adiponectin and leptin in patients with acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 10484.
- [12] WANG X, YANG J, WU L Q, et al. Adiponectin inhibits the activation of lung fibroblasts and pulmonary fibrosis by regulating the nuclear factor kappa B (NF- κ B) pathway [J]. *Bioengineered*, 2022, 13(4): 10098-10110.
- [13] SHI W D, ZHU Q, GU J, et al. Anti-IL-17 antibody improves hepatic steatosis by suppressing interleukin-17-related fatty acid synthesis and metabolism [J]. *Clin Dev Immunol*, 2013, 2013: 253046.
- [14] SENOO S, HIGO H, TANIGUCHI A, et al. Pulmonary fibrosis and type-17 immunity [J]. *Respir Investig*, 2023, 61(5): 553-562.
- [15] YAMAGUCHI K, IWAMOTO H, MAZUR W, et al. Reduced endogenous secretory RAGE in blood and bronchoalveolar lavage fluid is associated with poor prognosis in idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Respir Res*, 2020, 21(1): 145.
- [16] DENG C H, PRESLE N, PIZARD A, et al. Beneficial impact of eicosapentaenoic acid on the adverse effects induced by palmitate and hyperglycemia on healthy rat chondrocyte [J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(3): 1810.
- [17] CRAIG V J, ZHANG L, HAGOOD J S, et al. Matrix metalloproteinases as therapeutic targets for idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2015, 53(5): 585-600.
- [18] DAS S, SUBRAMANIAM N, ALÉN R, et al. Ablation of secreted phosphoprotein-1 in hepatocytes increases fatty acid oxidation and ameliorates alcohol-associated liver disease [J]. *Alcohol Clin Exp Res (Hoboken)*, 2024, 48(5): 781-794.
- [19] MORSE C, TABIB T, SEMBRAT J, et al. Proliferating SPP1/MERTK-expressing macrophages in idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Eur Respir J*, 2019, 54(2): 1802441.
- [20] YUE B Q, XIONG D, CHEN J, et al. SPP1 induces idiopathic pulmonary fibrosis and NSCLC progression via the PI3K/Akt/mTOR pathway [J]. *Respir Res*, 2024, 25(1): 362.
- [21] NAZLI S A, LOESER R F, CHUBINSKAYA S, et al. High fat-diet and saturated fatty acid palmitate inhibits IGF-1 function in chondrocytes [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2017, 25(9): 1516-1521.
- [22] ZHANG Y C, LIANG J J, CAO N D, et al. Coal dust nanoparticles induced pulmonary fibrosis by promoting inflammation and epithelial-mesenchymal transition via the NF- κ B/NLRP3 pathway driven by IGF1/ROS-mediated AKT/GSK3 β signals [J]. *Cell Death Discov*, 2022, 8(1): 500.
- [23] DING C C, GUO Z Z, LIAO Q, et al. Network pharmacology and machine learning reveal salidroside's mechanisms in idiopathic pulmonary fibrosis treatment [J]. *J Inflamm Res*, 2024, 17: 9453-9467.
- [24] WU Z N, CHEN H, KE S W, et al. Identifying potential biomarkers of idiopathic pulmonary fibrosis through machine learning analysis [J]. *Sci Rep*, 2023, 13(1): 16559.
- [25] PERROT C Y, KARAMPITSAKOS T, HERAZO-MAYA J D. Monocytes and macrophages: emerging mechanisms and novel therapeutic targets in pulmonary fibrosis [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2023, 325(4): C1046-C1057.
- [26] YANG X L, LIU Z Q, ZHOU J W, et al. SPP1 promotes the polarization of M2 macrophages through the Jak2/Stat3 signaling pathway and accelerates the progression of idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Int J Mol Med*, 2024, 54(4): 89.