

作用,可能通过海绵作用调节miR-23a的表达,以hsa-circ-0001862-miR-23a-3p/靶基因轴的方式发挥作用,hsa-circ-0001862能够抑制舌鳞癌细胞的恶性表型,从而抑制舌鳞癌发生发展,起到抑癌基因的作用,可能成为新的舌鳞癌临床标志分子或新的肿瘤治疗靶点。

参考文献

- [1] Meng X, Lou QY, Yang WY, et al. The role of non-coding RNAs in drug resistance of oral squamous cell carcinoma and therapeutic potential[J]. Cancer Commun (Lond), 2021, 41(10): 981-1006.
- [2] Kim YJ, Kim JH. Increasing incidence and improving survival of oral tongue squamous cell carcinoma[J]. Sci Rep, 2020, 10(1): 7877.
- [3] Zanoni DK, Montero PH, Migliacci JC, et al. Survival outcomes after treatment of cancer of the oral cavity (1985-2015)[J]. Oral Oncol, 2019, 90: 115-121.
- [4] Kristensen LS, Andersen MS, Stagsted L, et al. The biogenesis, biology and characterization of circular RNAs[J]. Nat Rev Genet, 2019, 20(11): 675-691.
- [5] Guo Y, Yang J, Huang Q, et al. Circular RNAs and their roles in head and neck cancers[J]. Mol Cancer, 2019, 18(1): 44.
- [6] Kristensen LS, Jakobsen T, Hager H, et al. The emerging roles of circRNAs in cancer and oncology[J]. Nat Rev Clin Oncol, 2022, 19(3): 188-206.
- [7] Lei M, Zheng G, Ning Q, et al. Translation and functional roles of circular RNAs in human cancer[J]. Mol Cancer, 2020, 19(1): 30.
- [8] Huang G, Liang M, Liu H, et al. CircRNA hsa_circRNA_104348 promotes hepatocellular carcinoma progression through modulating miR-187-3p/RTKN2 axis and activating Wnt/beta-catenin pathway[J]. Cell Death Dis, 2020, 11(12): 1065.
- [9] Yuan G, Ding W, Sun B, et al. Upregulated circRNA_102231 promotes gastric cancer progression and its clinical significance[J]. Bioengineered, 2021, 12(1): 4936-4945.
- [10] Cao L, Wang M, Dong Y, et al. Circular RNA circRNF20 promotes breast cancer tumorigenesis and Warburg effect through miR-487a/HIF-1alpha/HK2[J]. Cell Death Dis, 2020, 11(2): 145.
- [11] Peng QS, Cheng YN, Zhang WB, et al. circRNA_0000140 suppresses oral squamous cell carcinoma growth and metastasis by targeting miR-31 to inhibit Hippo signaling pathway[J]. Cell Death Dis, 2020, 11(2): 112.
- [12] Qian C, Chen S, Li S, et al. Circ_0000003 regulates glutamine metabolism and tumor progression of tongue squamous cell carcinoma via the miR3303p/GLS axis[J]. Oncol Rep, 2021, 45(4): 45.
- [13] Zhang X, Wu N, Wang J, et al. LncRNA MEG3 inhibits cell proliferation and induces apoptosis in laryngeal cancer via miR-23a/APAF-1 axis[J]. J Cell Mol Med, 2019, 23(10): 6708-6719.
- [14] Liu J, Jiang X, Zou A, et al. circIGHG-Induced Epithelial-to-Mesenchymal Transition Promotes Oral Squamous Cell Carcinoma Progression via miR-142-5p/IGF2BP3 Signaling[J]. Cancer Res, 2021, 81(2): 344-355.
- [15] Yao Y, Bi L, Zhang C. Circular RNA_0001742 has potential to predict advanced tumor stage and poor survival profiles in tongue squamous cell carcinoma management[J]. J Clin Lab Anal, 2020, 34(8): e23330.

(收稿日期:2023-09-02)

基于网络药理学验证褪黑素对急性肺损伤的抑制作用

王碧红¹,李卓越²,李秦汉²,孙燕玲²,吕建国³,林 丽^{2*}

(1.湖北科技学院医学部药学院,湖北咸宁 437100;2.湖北科技学院医学部基础医学院;3.湖北科技学院医学部临床医学院)

摘要: **目的** 本文旨在研究褪黑素(MT)对急性肺损伤(ALI)可能的干预靶点和其抑制作用。**方法** 通过数据库筛选获取MT的主要靶点及ALI的疾病作用靶点。经过Venn图的解析MT和ALI的共同靶点。利用Cytoscape 3.8.2工具构建“药物-疾病”的网络模型。借助STRING工具对蛋白质之间的相互作用进行分析,并构造PPI网络。使用R工具进行GO和KEGG的富集分析。同时,构建ALI动物模型并进行MT治疗干预,观察肺组织病理学的变化,气管切开插管检测各组肺功能Ri-area、Re-area和Cldyn-area水平。**结果** 经筛选后获得196个MT靶点、3948个ALI靶点及118个药物-疾病共同靶点。EGFR、HIF1A和ERBB2等均为MT靶向ALI疾病的关键核心点。在GO

资助项目:湖北省大学生创新训练项目(S202110927022);湖北省大学生创新训练项目(S202210927035)

*通讯作者

富集分析中,生物过程共涉及到1690种,细胞组分涉及到90种,而分子功能则涉及到176种。至于KEGG路径富集筛选中,共发现与此相关的157条生物通路。体内实验结果显示MT治疗干预对ALI有明显抑制作用。**结论** MT可能通过多靶点抑制ALI的发病和进展。

关键词: 褪黑素;急性肺损伤;网络药理学

中图分类号: R563

文献标志码: A

文章编号: 1004-6879(2024)03-0189-06

Validation of the Inhibitory Effect of Melatonin on Acute Lung Injury based on Network Pharmacology

WANG Bi-hong¹, LI Zhuo-yue², LI Qin-han², SUN Yan-ling², LV Jian-guo³, LIN Li^{2*}

(1. School of Pharmacy, Xianning Medical College, Hubei University of Science and Technology, Xianning, Hubei, 437100, China; 2. School of Basic Medical Sciences, Xianning Medical College, Hubei University of Science and Technology; 3. School of Clinical Medical Sciences, Xianning Medical College, Hubei University of Science and Technology)

Abstract: **Objective** The purpose of this study was to investigate the possible intervention targets and inhibitory effects of melatonin (MT) on Acute lung injury (ALI). **Methods** The main targets of MT and the disease targets of ALI were obtained through database screening. The common targets of MT and ALI were analyzed by Venn diagram. The network model of “drug-disease” was built by Cytoscape 3.8.2. Protein interactions were analyzed by STRING and PPI networks were constructed. At the same time, an animal model of ALI was established and MT treatment was performed. The changes of lung histopathology were observed. The pulmonary function levels of Ri-area, Re-area and Cldyn-area in each group were detected by tracheotomy and intubation. **Results** 196 MT targets, 3948 ALI targets and 118 drug-disease co-targets were obtained. EGFR, HIF1A and ERBB2 were the key core sites of MT targeting ALI disease. In the GO enrichment analysis, a total of 1690 biological processes, 90 cellular components and 176 molecular functions were involved. As for KEGG pathway enrichment screening, a total of 157 biological pathways related to this were found. The results of in vivo experiments showed that MT therapeutic intervention had obvious inhibitory effect on ALI. **Conclusion** MT may inhibit the onset and progression of ALI through multiple targets.

Key words: melatonin; acute lung injury; network pharmacology

急性肺损伤(acute lung injury, ALI)是一种严重的肺部疾病,给患者和社会带来了巨大的负担^[1]。ALI的病因多样,包括感染、创伤、手术、药物等,如果不及及时诊治,可能发展成为急性呼吸衰竭^[2,3],严重者可致死亡。褪黑素(melatonin, MT)是一种具有抗氧化和抗炎特性的松果体激素^[4],其调节肺组织损伤的作用日益受到关注,有研究表明,MT可通过化氧应激与炎症的途径来减轻肺损伤^[5,6],但其作用于ALI的机制及相关靶点尚未完全明确。

随着生物信息学的发展,网络药理学可以将药物—成分—靶点—疾病—生物过程—通路等信息绘制成网络,使得具有多组分和多靶点特点的药物防治疾病的作用机制在分子水平上得以预测。本研究基于网络药理学构建了一个网络模型,探索MT对ALI的干预效应以及预测其关键靶点,并通过体内实验验证MT对ALI动物模型

的作用效果,为ALI的治疗提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 选用30只由辽宁长生生物技术股份有限公司提供的Wistar大鼠,5~6周龄,饲养1周后开始相关实验,维持环境温度在24~28℃内,相对湿度在50%~70%之间,昼夜节律12 h。

1.1.2 实验试剂与主要仪器 甲醛溶液(≥37%分析纯)购自武汉中天化工公司;褪黑素、苏木素伊红染色试剂盒购自上海碧云天试剂公司;吸入暴露系统IES-NI购自上海瑞曼信息科技有限公司;AniRes2005动物肺功能分析系统购自北京贝兰博科技公司。

1.2 方法

1.2.1 药物-疾病靶点结果预测 通过PubChem(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)

pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/)数据库查询MT的结构及Canonical SMILES,将Canonical SMILES分别导入SwissTargetPrediction (<http://swisstargetprediction.ch/>)和SuperPred(https://prediction.charite.de/subpages/target_prediction.ph)预测靶点。在GeneCards(<https://www.genecards.org/>)和OMIM(<https://omim.org/>)中搜索关键词“Acute Lung Injury”,收集与该疾病相关的靶点信息,使用Uniprot(<https://www.uniprot.org/>)数据库对收集到的靶点信息进行校正。将获得的药物靶点和疾病靶点进行相互映射,并制作Venn图以找到它们的交集基因,再使用Cytoscape3.8.2软件构建“药物-疾病”的作用靶点网络。

1.2.2 靶蛋白相互作用网络构建 将药物和交集基因上传到数据库String(<https://string-db.org/>)。构建蛋白质相互作用网络(protein proteinInteractio,PPI)时,选择“Homo sapiens”作为物种,其他参数则沿用默认设置,分析结果被保存为TSV格式,并导入到Cytoscape 3.8.2中进行网络结构评估。选出关键的靶点来构建蛋白质互作网络图。

1.2.3 GO富集分析和KEGG通路分析 将交叉基因组导入Drug_Disease.txt中,随后采用Rstudio的org.Hs.eg.db工具,将上述基因组的symbol转译至Entrez IDs,借由clusterProfiler软件包处理目标基因并完成GO富集分析以及KEGG通路分析。将物种设为人,筛选出 P 值小于0.05的数据作为富集筛选要求,选出前十名进行分析。借助Rstudio的“ggplot2”插件绘制图表。为了进一步研究MT在治疗ALI的过程中的机制,我们对功能基因的可能靶蛋白在生物过程(biological process,BP)、细胞组分(cellular component,CC)和分子功能(molecular function,MF)三个方面进行了研究。同时,阐明MT治疗ALI的靶点在信号通路中进行KEGG通路富集分析。

1.2.4 动物模型及分组 经过1周适应期后,采用随机数字表方法把30只雌性Wistar大鼠分为3组,每组10只。对照组不进行操作,模型组和模型组+褪黑素组的大鼠,每天4 h吸入3 mg/m³的甲醛以建立ALI模型,21 d后,模型组+褪黑素组的大鼠通过腹腔注射MT进行治疗,剂量为20 mg/kg,持续14 d,治疗期间继续甲醛暴露。

1.2.5 肺功能测定^[7] 使用AniRes 2005动物肺功能分析系统检测肺功能。大鼠腹腔注射1%戊巴比妥钠进行麻醉,固定大鼠的头部和四肢,解剖颈部以暴露气管,实施

气管插管和颈静脉扎针,并固定于体锚箱,将50 μ L乙酰胆碱(0.025 mg/kg)通过体锚箱经颈静脉通道注入大鼠颈静脉,再注入400 μ L生理盐水使药物充分进入体内,并记录大鼠吸气阻力、呼气阻力和肺顺应性的变化。

1.2.6 肺组织HE染色 取大鼠右肺,依次进行固定组织、石蜡包埋、切片制备、切片脱蜡、苏木精和伊红染色、中性树脂封片,并观察肺组织的病理学形态。再以间质炎症、中性粒细胞浸润、充血和水肿程度评分^[8]。

1.3 统计学方法

应用SPSS 26.0软件进行统计分析,组间比较使用单因素方差分析,同一浓度下组间比较显著性小于0.05的再进行bonferroni事后检验进行组间比较, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MT与ALI疾病共同靶点筛选

将Canonical SMILES导入SwissTargetPrediction,以“probability>0”为筛选条件,得到101个靶点,将Canonical SMILES导入SuperPred得到106个靶点,将两个数据库的靶点合并,得到196个靶点。通过GeneCards、OMIM数据库分别获得ALI靶点3680个靶点、372个靶点,将两个数据库的靶点合并去重获得3948个交集基因。

通过取MT靶点和ALI疾病靶点集合的交集,得到了118个共同靶点(图1A)。利用药物-疾病-靶点数据,构建“network.xlsx”文件以及“type.xlsx”文件,将文件导入Cytoscape3.8.2进行作图,共有118个节点,119条边(图1B)。

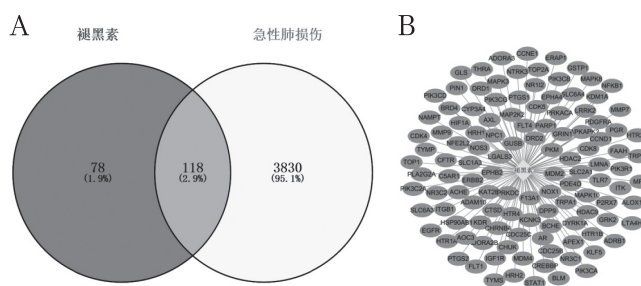


图1 MT-ALI靶点图

A. MT-ALI共同靶点韦恩图;B. 药物-疾病的作用靶点图

2.2 核心靶点及网络相互作用

通过韦恩图得到的118个药物和疾病共有的靶点输入到String数据库中,并以人类Homo Sapiens作为研究对象,进行蛋白质相互作用的预测。把这些网络数据以

TSV格式进行存储,并依赖Cytoscape 3.8.2软件进行可视化呈现,对网络进行拓扑分析。使用degree值用于描述靶点的大小和颜色,此外,边的宽度则由combined score值来表示,从而创建蛋白质互作网络,该网络总共包括了115个节点和948个边,表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor,EGFR)、缺氧诱导因子1A(hypoxia inducible factor 1-alpha,HIF1A)、编码人表皮生长因子受体2(epidermal growth factor receptor 2,ERBB2)等是关键靶点(图2)。

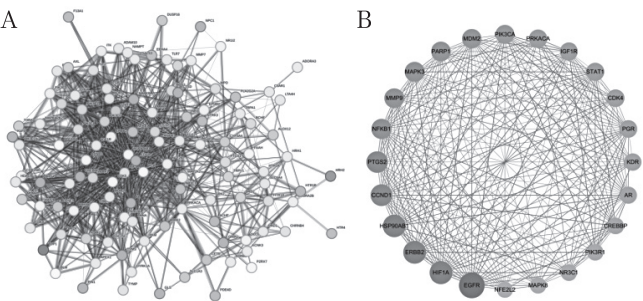


图2 MT-ALI共同靶点PPI图

A. String数据库构建蛋白与ALI共同靶点图; B. Cytoscape软件构建MT与ALI共同靶点图

2.3 GO富集分析

借助clusterProfiler软件包,进行了富集分析,共筛出1956个GO条目,这些条目包括1690个和BP有关的条目、90个与CC有关的条目以及176个和MF有关的条目。分别选出每个类别中的前10个GO项目(图3)。

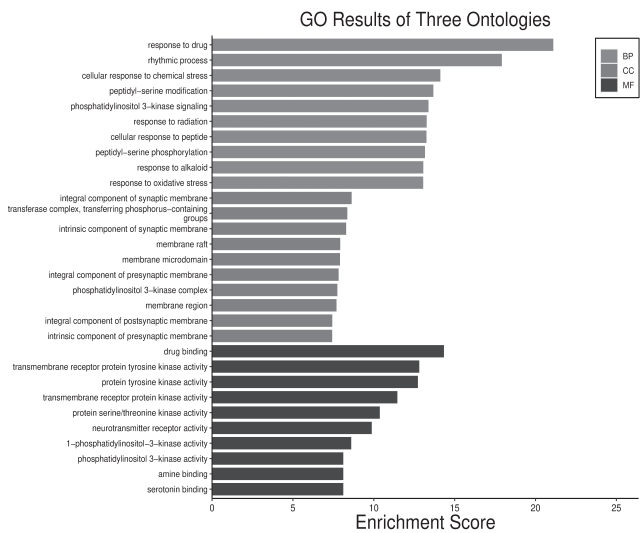


图3 MT-ALI共同靶点GO图

2.4 KEGG通路富集分析

通过KEGG Pathway分析辨识了157个涉及ALI治疗的MT通路,并把排名前十的通路进行了图示,主要包括甲状腺激素的信号通路、HIF-1信号通路、cAMP信号通路等。结果提示药物可以通过调节这些通路来对疾病进行干预(图4)。

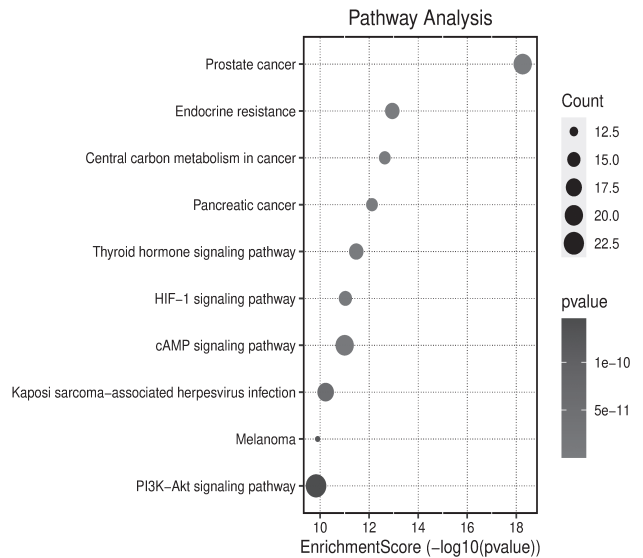


图4 MT-ALI共同靶点KEGG

2.5 各组大鼠肺功能指标的变化

与对照组相比,模型组大鼠吸气阻力和呼吸阻力显著增大,肺顺应性显著减退,差异均有统计学意义($P<0.05$);与模型组相比,模型+褪黑素组大鼠吸气阻力和呼吸阻力明显降低,肺的顺应性明显升高,差异均有统计学意义($P<0.05$)(图5)。

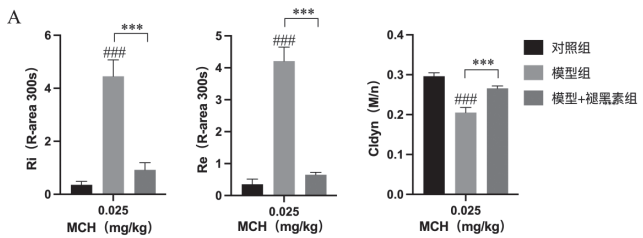


图5 肺功能检测结果

与对照组相比,### $P<0.001$;与模型组相比,** $P<0.01$,*** $P<0.001$

2.6 各组大鼠肺组织病理学的变化

与对照组相比,模型组肺组织损伤明显,肺泡结构不完整,肺泡腔内可见到渗出物,肺间质有水肿和炎症细胞浸润;与模型组相比,模型+褪黑素肺组织损失好转,肺泡结构清晰、排列有序,肺间质形态正常,水肿和炎症细胞浸润明显减轻(图6)。

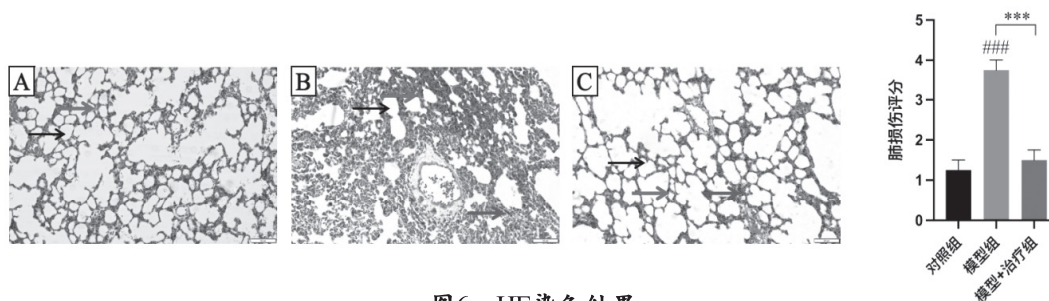


图6 HE染色结果

A.对照组;B.模型组;C.模型+褪黑素组;与对照组相比,*** $P<0.001$;与模型组相比,### $P<0.001$;

黑色箭头:肺泡腔;红色箭头:肺泡间隔;蓝色箭头:炎性细胞浸润

3 讨论

目前研究发现^[9],褪黑素在多种生理过程中发挥着至关重要的作用,其中包括抗炎、抗氧化和免疫调节。急性肺损伤是一种严重的肺部炎症性疾病,可能导致呼吸衰竭和死亡。在现有的研究中,褪黑素可以抑制炎症反应和氧化应激反应,减轻肺部损伤程度,促进肺部修复和愈合^[10,11]。然而,褪黑素治疗急性肺损伤的作用机制和关键靶点还需进一步的探索。

本研究通过药物与疾病靶点集合的交集,筛选到118个MT治疗ALI潜在靶点,这说明MT可能参与调节多个靶点发挥治疗作用。构建的PPI主要目标网络涵盖了115个结点及948条边,包括EGFR、HIF1A、ERBB2等核心目标。EGFR属于ErbB酪氨酸激酶受体系列的一员,EGFR和其所在的家族在肺癌发展中占据重要地位^[12,13],近期研究发现EGFR在肺纤维化的进展和发展中起关键作用^[14],提示EGFR在肺组织疾病中发挥重要作用。HIF1A属于缺氧诱导因子,HIF1A调节许多肿瘤促进生长因子和趋化因子的表达,MT可通过调节生长因子和趋化因子的表达,参与组织的损伤修复以及参与炎症的过程^[15]。ERBB2是一种重要的受体酪氨酸激酶,有研究表明^[16],ERBB2在增殖和分化等各种细胞反应中发挥着重要作用。这些结果揭示了网络药理学方法通过预测和筛选关键靶点,可为MT治疗急性肺损伤提供科学依据。同时,体内实验结果进一步证实了MT可以改善肺功能,减少急性肺损伤大鼠的吸气阻力和呼吸阻力,提升肺顺应性。本研究数据表明,MT可能通过调控EGFR、HIF1A、ERBB2等关键靶点,以及影响相关的细胞反应和组织修复过程,从而发挥治疗急性肺损伤的作用。

在GO功能和KEGG通路富集分析中,MT治疗ALI的主要通路有甲状腺激素信号通路、HIF-1信号通路、循环

单磷酸腺苷(cyclic adenosine monophosphate,cAMP)信号通路等。甲状腺激素信号路径具有影响细胞生长、胚胎发育、分化、代谢和增殖等生理过程的能力^[17]。HIF-1是缺氧诱导因子,研究发现^[18,19],HIF激活途径可以通过抑制NF- κ B通路来减少过度强烈的炎症反应,这对于减轻炎症反应和组织损伤具有重要意义。cAMP在细胞信号传导中起着关键作用,研究发现,提高cAMP水平会广泛抑制炎症过程,包括减少炎症介质的产生和抑制巨噬细胞、淋巴细胞、嗜酸性粒细胞和中性粒细胞功能。HE染色结果显示,MT治疗后急性肺损伤大鼠肺组织出现好转,肺泡和肺间质清晰,水肿和炎症细胞浸润明显减轻,这表明MT治疗干预对急性肺损伤具有明显的抑制作用。这种改善可能与MT对甲状腺激素信号通路、HIF-1信号通路和cAMP信号通路的调控有关。这些通路在细胞的生长、分化、代谢、炎症反应等方面起着重要作用。因此,MT可能通过调控这些关键通路来影响急性肺损伤的发生和发展过程。

综上所述,MT可能通过调节多个靶点抑制急性肺组织损伤的发生及其进一步的发展,但其作用机制及相关调控通路仍需更多的实验进行验证。

参考文献

- [1] Li Y, Huang J, Foley NM, et al. B7H3 ameliorates LPS-induced acute lung injury via attenuation of neutrophil migration and infiltration[J]. Scientific Reports, 2016, 6(1): 31284.
- [2] Hughes KT, Beasley MB. Pulmonary manifestations of acute lung injury: more than just diffuse alveolar damage[J]. Archives of Pathology Laboratory Medicine, 2017, 141(7): 916-922.
- [3] 王海婧,赵志伟. 慢性阻塞性肺疾病合并骨质疏松症的炎症机制研究进展[J]. 承德医学院学报, 2023, 40(6): 509-512.
- [4] Chitimus DM, Popescu MR, Voiculescu SE, et al. Melatonin's

- (收稿日期:2024-01-12)
(基础医学栏目编辑:张明溪)

血浆CD89、PRDX1和AOPP水平在过敏性紫癜非肾型和肾型患者中的临床意义

*通讯作者