

新型酪氨酸激酶抑制剂改善二氧化硅粉尘诱导的小鼠肺组织炎性与纤维化的作用与机制研究

张泽昊¹, 管堂飞¹, 谭雪梅¹, 张倩茹², 陈小新², 姚于勤¹, 刘卓伟²

1. 四川大学华西公共卫生学院/华西第四医院, 四川 成都 610041; 2. 广东众生睿创生物科技有限公司

摘要: **目的** 本研究旨在探究自主研发的新型酪氨酸激酶小分子抑制剂 ZSP1603 对矽肺小鼠肺组织损伤的改善作用及潜在机制, 为矽肺临床治疗研究提供参考。 **方法** 基于矽尘引起的分子毒理作用网络和 ZSP1603 潜在作用靶点的分子对接预测 ZSP1603 干预矽尘引起的呼吸系统毒性的潜在作用与机制。构建二氧化硅诱导的矽肺小鼠模型, 结合病理染色、免疫组化和多组学检测, 综合评价 ZSP1603 改善矽尘引起的小鼠矽肺样病变的作用与潜在机制。 **结果** ZSP1603 的预测药理靶点与矽尘引起的毒作用基因有 50 个潜在交集基因, 多富集于炎症、氧化应激及纤维化相关通路。在实验给药剂量下 (60 mg/kg), ZSP1603 长期给药可显著缓解矽尘引起的肺炎、肺组织损伤及胶原沉积 (12 周时 ZSP1603 组 Szapiel 评分和 Ashcroft 评分较模型组显著降低约, $P < 0.01$), 下调矽尘毒作用相关蛋白表达 (12 周时 ZSP1603 组 Collagen I、Collagen III、 α -SMA、FN、TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 的表达显著低于模型组, $P < 0.001$); 同时检测到 ZSP1603 具有改善矽肺模型小鼠肠道菌群失衡的作用; 此外, 在实验给药剂量下, 未观察到一般体内毒性。 **结论** 新型酪氨酸激酶抑制剂 ZSP1603 在矽肺小鼠模型中可改善矽肺样炎症和纤维化、为矽肺三二级预防所需的临床治疗药物研究提供参考。

关键词: 矽肺; 酪氨酸激酶抑制剂; 网络药理学; 转录组学; 肠道菌群

中图分类号: R965.1 文献标志码: A 文章编号: 1003-8507(2026)14-2563-10

DOI: 10.20043/j.cnki.MPM.202603432

Effect and mechanism of a novel tyrosine kinase inhibitor in alleviating silica dust – induced pulmonary inflammation and fibrosis in mice

ZHANG Ze – hao*, GUAN Tang – fei, TAN Xue – mei, ZHANG Qian – ru,

CHEN Xiao – xin, YAO Yu – qin, LIU Zhuo – wei

* West China School of Public Health and West China Fourth Hospital, Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610041, China

Abstract: **Objective** To investigate the therapeutic efficacy and underlying mechanism of ZSP1603, a novel independently developed small – molecule tyrosine kinase inhibitor, against lung tissue injury in silicotic mice, so as to provide an experimental basis for clinical research on the treatment of silicosis. **Methods** Based on the molecular toxicological network induced by silica dust, molecular docking was performed to predict the potential targets and mechanisms of ZSP1603 in alleviating silica dust – mediated respiratory toxicities. A silica – induced mouse silicosis model was established. Pathological staining, immunohistochemistry and multi – omics analyses were comprehensively applied to evaluate the protective effects and molecular mechanisms of ZSP1603 on silica – associated silicosis – like lesions in mice. **Results** A total of 50 intersecting genes were identified between the pharmacological targets of ZSP1603 and the toxicity – related genes triggered by silica dust, which were mainly enriched in signaling pathways associated with inflammation, oxidative stress and fibrosis. Long – term administration of ZSP1603 at the experimental dose (60 mg/kg) significantly ameliorated silica – induced pulmonary inflammation, lung tissue damage and collagen deposition (at 12 weeks, the Szapiel and Ashcroft scores in the ZSP1603 group were significantly lower than those in the model group, $P < 0.01$), and downregulated the expression of proteins related to silica toxicity (the expression levels of Collagen I, Collagen III, α – SMA, FN, TNF – α , IL – 6, and IL – 1 β were significantly downregulated compared to the model group, $P < 0.001$). Moreover, ZSP1603 effectively corrected the gut microbiota dysbiosis

基金项目: 国家自然科学基金 (82373548); 四川省科技厅自然科学基金项目 (2026NSFSC0586, 2026NSFSC0587)

作者简介: 张泽昊 (2000—), 男, 硕士在读, 研究方向: 卫生毒理学

通信作者: 刘卓伟和姚于勤为共同通信作者。刘卓伟, liu_zhuowei@raynovent.com; 姚于勤, yuqin_yao@163.com

in silicotic mice. In addition, no obvious systemic in vivo toxicity was observed following treatment with the experimental dose of ZSP1603. **Conclusion** The novel tyrosine kinase inhibitor ZSP1603 alleviates silicosis – related inflammation and fibrosis in a mouse silicosis model. These findings provide a reference for the research and development of therapeutic agents for the secondary and tertiary prevention and clinical intervention of silicosis.

Keywords: Silicosis; Tyrosine kinase inhibitor; Network pharmacology; Transcriptomics; Gut microbiota

矽肺(silicosis)是生产中长期吸入游离二氧化硅粉尘引发的、以肺部弥漫性纤维化为主要特征的疾病^[1]。作为矽尘引起的慢性进行性疾病,矽肺病程中呼吸系统损伤持续加重^[2-3]。目前矽肺发病机制尚未完全阐明,主流假说认为,肺泡巨噬细胞吞噬二氧化硅粉尘后溶酶体受损,激活炎症小体 NLRP3 (NOD – like receptor family pyrin domain containing 3) 并引发炎症级联反应,进而诱发肺部纤维化^[4],且病情进展会导致患者肺功能损害逐步加重^[5]。全球范围内,重症不可逆矽肺患者数量持续增加,给职业人群、家庭和社会带来沉重负担^[6]。现阶段矽肺尚无根治方法,临床以对症处理、防治并发症为原则,旨在缓解症状和延缓病情进展^[7]。早期干预病情进展、控制矽肺肺组织炎症与纤维化矽肺样症状,成为矽肺病临床治疗领域研究重点。

通过分子毒理作用网络分析,针对酪氨酸激酶抑制剂可通过抑制成纤维细胞增殖分化发挥抗纤维化作用,疗效已得到证实^[8-9];尼达尼布作为多靶点酪氨酸激酶抑制剂,在系统性硬化病相关间质性肺病和特发性肺纤维化中表现出抗纤维化活性,也被推荐用于快进型矽肺治疗^[10]。大量研究证实,抑制酪氨酸激酶可改善矽肺病程中的肺部炎症与纤维化^[11]。

ZSP1603 是我国自主研发新型酪氨酸激酶抑制剂,目前处于临床 II 期,主要靶向血小板衍生生长因子受体、成纤维细胞生长因子受体和血管内皮生长因子受体^[12]。文献报道,ZSP1603 可显著下调转化生长因子 – $\beta 1$ (transforming growth factor – $\beta 1$, TGF – $\beta 1$) 刺激后成纤维细胞中 TGF – $\beta 1$ 、金属蛋白酶组织抑制剂 – 1 (tissue inhibitor of metalloproteinase – 1, TIMP – 1)、I 型胶原 $\alpha 1$ 链 (collagen type I alpha 1 chain, COL1A1) 和 α – 平滑肌肌动蛋白 (α – smooth muscle actin, α – SMA) 的表达,抑制成纤维细胞向肌成纤维细胞分化。同等剂量下,ZSP1603 的作用可能优于尼达尼布,尤其在抑制肺损伤和炎症方面效果更优,且耐受性与安全性更高^[12],展现出调控炎症与纤维化通路的潜力,但目前尚无其干预二氧化硅诱导肺组织损伤的效果及机制研究。

本研究基于网络药理毒理学与分子对接预测 ZSP1603 对二氧化硅所致肺组织损伤的潜在作用,通过体内实验验证其改善效果,并结合转录组学、肠道菌群分析初步探究其作用机制,为 ZSP1603 后续用于

矽肺防治提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 ZSP1603 与矽肺网络药理学研究 于 PubMed 及 SwissADME 数据库检索 ZSP1603,获取其分子结构图与 SMILES 标识符,依托该标识符在 PubChem 数据库提取 2D 分子结构;再借助 SwissTargetPrediction、PharmMapper、SEA 三大数据库,基于上述分子信息预测药物作用靶点,对所得靶点基因合并去重,构建 ZSP1603 靶点基因集。同时,从 OMIM、GeneCards^[13]、DISGENET^[14]、CTD 数据库挖掘矽肺疾病相关靶点,合并后去除重复基因,得到矽肺疾病靶点基因集。利用 Venny 2. 1. 0 在线工具,比对 ZSP1603 潜在靶点与矽肺疾病基因,取交集并绘制韦恩图;将共靶点导入 STRING 12. 0 数据库构建蛋白质 – 蛋白质相互作用 (protein – protein interaction, PPI) 网络,借助 Cytoscape 3. 10. 3 软件完成网络可视化处理。将共靶点基因导入 DAVID 数据库完成 GO 和 KEGG 富集分析,再将所得结果上传至微生信在线平台,实现富集结果的可视化呈现。将共靶点再次导入 STRING 12. 0 平台,下载 TSV 格式文件后导入 Cytoscape 3. 10. 3,按节点度数降序筛选排名前 15 的核心靶点;通过 UniProt 数据库获取靶点基因 ID,依托 PDB 数据库下载对应蛋白结构,经 PyMOL 2. 6. 0 预处理、AutoDockTools 1. 5. 7 加氢优化后,采用 vina 1. 2. 6 完成分子对接;以结合能 < -5.0 kcal/mol 判定为有效结合,最终通过 PyMOL 2. 6. 0 完成对接结果可视化分析。

1.2 实验动物模型建立与分组 选用 36 只 8 周龄 SPF 级 C57BL/6J 雄性小鼠 (20 ~ 22 g),由四川维通利华提供,饲养于四川大学华西第四医院动物实验中心 (SYXK (川) 2023 – 0011),实验经伦理委员会批准 (Gw112025007)。适应性饲养 1 周后, SiO_2 颗粒经研磨、200 °C 灭菌 4 h,配制成 40 mg/ml 悬浊液并超声 30 min。小鼠经 1. 5% 戊巴比妥钠麻醉,按 50 mg/kg 气管滴注 100 μl SiO_2 混悬液复制模型,对照组给予等体积生理盐水。小鼠分为 6 组 ($n = 6$),包括 1 周和 12 周空白对照、模型及 ZSP1603 组,分别给药 7 天和 84 天;模型与对照组灌胃等体积的 0. 5% 甲基纤维素/0. 2% 吐温溶液 (10 ml/kg),ZSP1603 组 (60 mg/kg,溶于 0. 5% 羧甲基纤维素钠溶液) 每日灌胃 1 次 (图 2A)。于 1、12 周取材,液氮速冻后 -80 °C 保存

备用。

1.3 H&E 染色和 Masson 染色及评分 小鼠牺牲后,记录脏器重量并计算脏器系数。肺经 H&E 和 Masson 染色后镜检病理改变,并采用 Szapiel 评分评估肺炎,改良 Ashcroft 评分评估肺纤维化,染色步骤以及评分参照相应文献^[15-16],每张切片于 200 × 镜下随机选取 3 个视野进行评分。其余脏器(心、肝、脾和肾)经 H&E 染色后镜检病理改变。

1.4 免疫组织化学染色 石蜡切片脱蜡至水后,按指标选择抗原修复:I 型胶原(collagen type I, Collagen I)、III 型胶原(collagen type III, Collagen III)、白细胞介素 - 6(interleukin - 6, IL - 6)、白细胞介素 - 1 β (interleukin - 1 β , IL - 1 β)、肿瘤坏死因子 - α (tumor necrosis factor - α , TNF - α) 采用乙二胺四乙酸(ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA)高压修复 1.5 min; α - SMA 采用柠檬酸高压修复 2 min;纤维连接蛋白(fibronectin, FN)采用柠檬酸微波修复 3 次,每次 3 min。冷却后以含吐温 - 20 的三羟甲基氨基甲烷缓冲盐溶液(tris - buffered saline with tween - 20, TBST)或蒸馏水浸洗,3% H₂O₂ 室温避光封闭内源性过氧化物酶 30 min。10% 血清封闭,滴加一抗 4 ℃ 孵育过夜;复温后 TBST 洗涤,滴加二抗 37 ℃ 孵育 45 min, TBST 再次洗涤。二氨基联苯胺(3, 3' - diaminobenzidine, DAB)显色,苏木素染核、分化和返蓝,脱水干燥后封片。采用成像系统扫描切片,ImageJ 1.54p 计算累计光密度(integrated optical density, IOD)用于统计分析。

1.5 肺组织有参转录组测序 采用 TRIzol 提取总 RNA,经 NanoDrop ND - 1000 质控浓度与纯度, Bioanalyzer 2100 和琼脂糖电泳验证完整性(浓度 > 50 ng/ μ l、RIN > 7.0、OD_{260/280} > 1.8 和总量 > 1 μ g)。oligo (dT) 磁珠捕获 mRNA,镁离子试剂盒 94 ℃ 片段化 5 ~ 7 min,经逆转录合成 cDNA、二链合成及末端修复加 A 后连接接头,UDG 酶消化二链并 PCR 扩增构建 300 bp $\pm$ 50 bp 文库。Illumina Novaseq™ 6000 PE150 测序,原始数据经 cutadapt 去接头并过滤低质量/重复序列获 CleanData; HISAT2 比对基因组, StringTie 组装转录本, gffcompare 整合注释, StringTie 计算 FPKM 定量; edgeR/DESeq2 筛选差异基因(FC > 2 或 P < 0.05),并进行 GO 和 KEGG 富集分析。

1.6 16S rDNA 测序 采用 CTAB 法提取各分组小鼠粪便样本中微生物总 DNA,琼脂糖凝胶电泳检测质量、紫外分光光度计定量。PCR 三轮扩增产物经 2% 琼脂糖凝胶验证,以超纯水为阴性对照。产物经 AMPureXTbeads 纯化和 Qubit 定量后构建文库, Agilent2100 评估文库大小, Illumina 试剂盒定量,

NovaSeq6000 平台 2 × 250bp 双端测序。原始序列去接头引物、FLASH 拼接和 fqtrim 过滤获 clean 标签, Vsearch 去嵌合序列, DADA2 降噪得到特征表/序列。归一化后计算多样性, SILVA 数据库(release 138)注释物种。Alpha 和 Beta 多样性均由 QIIME2 计算, R 包(v 3.5.2)绘图。

1.7 统计分析 数据统计分析及图像绘制均采用 GraphPad Prism 10 软件完成,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 检验水准 $\alpha = 0.05$ 。转录组学与微生物组学分析借助联川生物云平台完成。

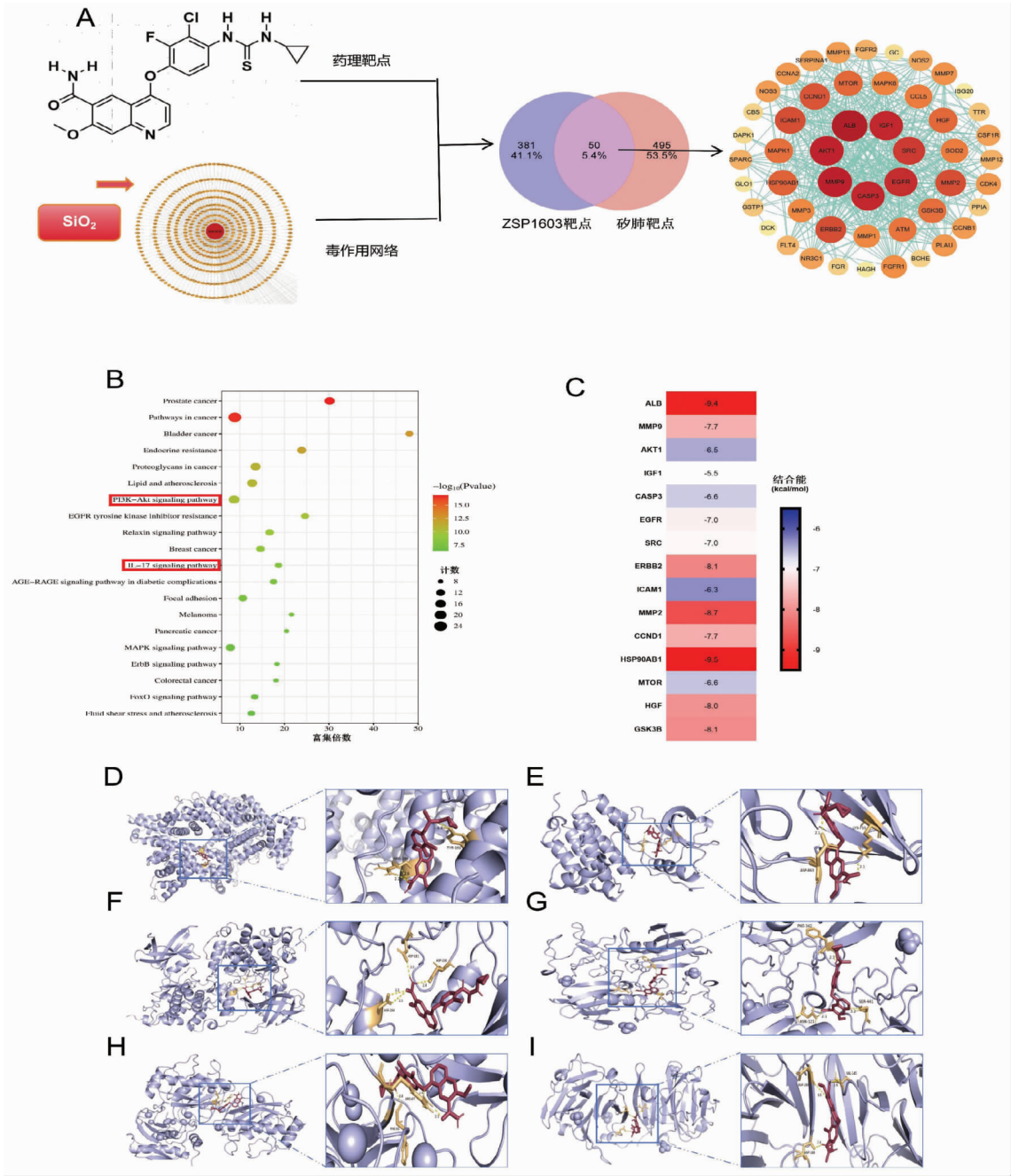
2 结果

2.1 ZSP1603 可通过多靶点和多通路协同作用改善矽肺病理进程 ZSP1603 分子式为 C₂₁H₁₈ClFN₄O₃S, 分子量 460.9 g/mol(图 1A),经数据库预测得到其潜在靶点 431 个;数据库挖掘筛选获得矽肺疾病基因 545 个,经比对分析二者共有交集靶点 50 个,其中 ZSP1603 特异性靶点 381 个,矽肺特异性靶点 495 个(图 1A),核心交集靶点包含 MMP2、MAPK8、IL6 和 TNF 等,主要参与炎症反应、细胞外基质降解及信号转导等生物学过程,提示 ZSP1603 可通过调控上述关键分子干预矽肺进展。针对 50 个交集靶点构建 PPI 网络并按节点度数排序,筛选出 ALB、MMP9 和 AKT1 等核心靶点(图 1A)。后续对上述交集靶点开展 KEGG 富集分析,结果显示靶点显著富集于 PI3K - Akt、MAPK、IL - 17、AGE - RAGE 和 FoxO 等多条信号通路,涉及 EGFR、AKT1 和 mTOR 等关键基因(图 1B),表明 ZSP1603 或可通过抑制炎症反应、减轻氧化应激与细胞凋亡,缓解矽尘诱发的肺组织损伤。结合 PPI 网络节点度数排序,选取排名前 15 的核心靶点蛋白与 ZSP1603 进行分子对接验证,所有靶点结合能均 < -5.0 kcal/mol,且核心靶点对接可视化结果良好,证实 ZSP1603 与筛选核心蛋白具备优异的结合亲和力(图 1C ~ I)。综上,网络药理学与分子对接结果共同证实, ZSP1603 可通过多靶点、多通路协同作用改善矽肺病理进程,且药物与核心致病靶点结合能力稳定,具备深入研发的潜在价值。

2.2 ZSP1603 可改善二氧化硅引起的矽肺小鼠肺组织损伤 H&E 染色结果显示,造模 1 周时,对照组小鼠肺组织结构完整、肺泡形态正常,无明显炎症,模型组出现显著急性炎症,肺泡腔大量炎性细胞浸润和肺泡壁增厚,各药物干预组炎症表现与模型组相近(图 2B)。Szapiel 评分显示,模型组评分显著高于对照组(P < 0.000 1),干预组较模型组无统计学差异(图 2C)。造模 12 周时,模型组肺泡结构破坏与炎症进一步加重,各药物干预组炎症及组织损伤均明显改善

(图 2D), Szapiel 评分显著升高 ($P < 0.0001$), ZSP1603 干预组则显著降低 ($P < 0.01$) (图 2E)。结果表明, ZSP1603 可减轻矽肺小鼠肺组织炎症。Masson 三色染色显示, 造模 1 周时, 对照组胶原分布正常, 模型组及各干预组可见轻度局灶性胶原沉积 (图 2F), 改良 Ashcroft 评分显示模型组显著高于对照

组 ($P < 0.0001$), 干预组无统计学差异 (图 2G)。造模 12 周时, 模型组胶原沉积与结构破坏明显加剧, Ashcroft 评分显著升高 ($P < 0.0001$), ZSP1603 干预组胶原沉积显著减少和肺泡结构明显改善 ($P < 0.0001$, 图 2H 和图 2I)。结果表明, ZSP1603 减轻矽肺小鼠肺纤维化。



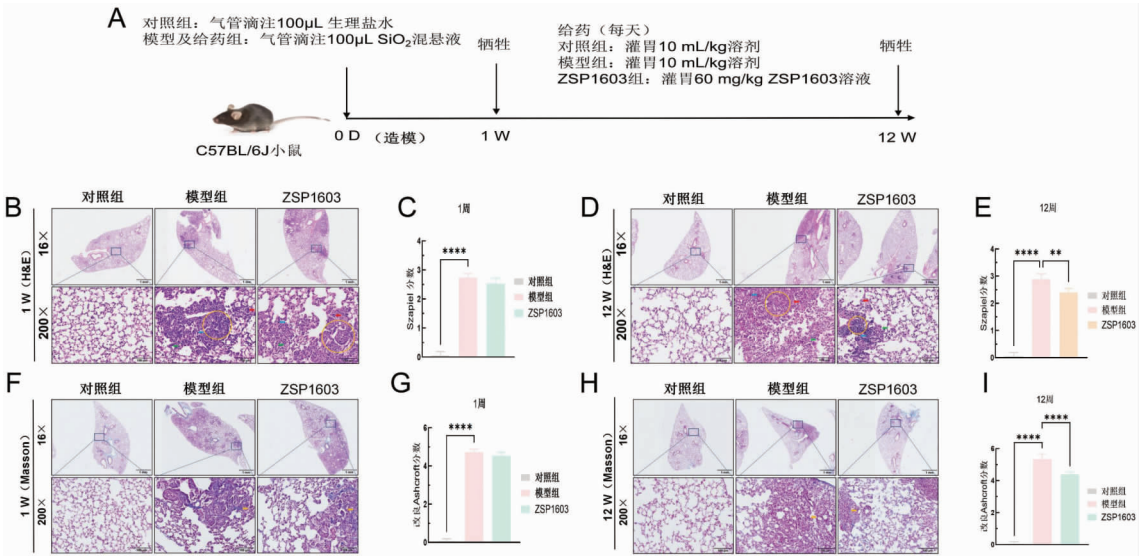
注: A 为 ZSP1603 - 靶点 - 矽肺疾病基因网络示意图; B 为 ZSP1603 改善矽肺肺组织损伤潜在作用位点的 KEGG 富集分析图; C 为分子对接热图; D 为 ZSP1603 - ALB; E 为 ZSP1603 - ERBB2; F 为 ZSP1603 - GSK3B; G 为 ZSP1603 - HGF; H 为 ZSP1603 - MMP2; I 为 ZSP1603 - MMP9。

图 1 ZSP1603 和矽肺相互作用网络药理学预测结果

Fig. 1 Network pharmacology prediction results of the interaction between ZSP1603 and silicosis

2.3 ZSP1603 在小鼠体内未观察到明显脏器损伤
分别于造模后 1 周和 12 周取各组小鼠心、肝、脾和肾

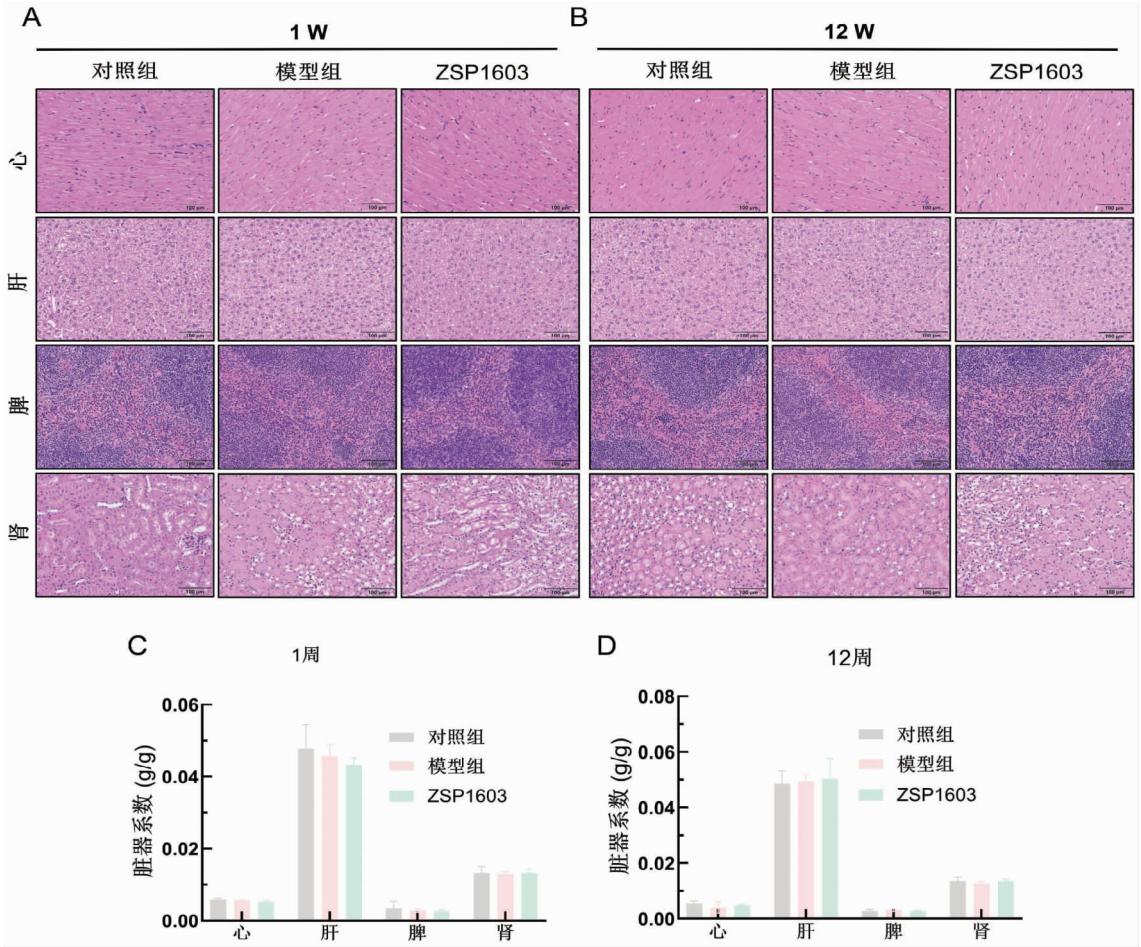
组织进行 H&E 染色观察。造模 1 周时 (图 3A), 模型组与各给药组小鼠心脏、肝脏、脾脏、肾脏均未见明显



注:图 A 为动物实验流程;B 和 C 为 1 周各组小鼠肺组织 H&E 染色病理切片及炎症评分;D 和 E 为 12 周各组小鼠肺组织 H&E 染色病理切片及炎症评分;F 和 G 为 1 周各组小鼠肺组织 Masson 染色病理切片及纤维化评分;H 和 I 为 12 周各组小鼠肺组织 Masson 染色病理切片及纤维化评分。统计学显著性标注规则为: * 表示 $P < 0.05$, ** 表示 $P < 0.01$, *** 表示 $P < 0.001$, **** 表示 $P < 0.0001$,下同。

图 2 各组小鼠肺组织 H&E 和 Masson 染色病理切片及评分(H&E 染色, × 16 及 × 200;Masson 染色, × 16 及 × 200)

Fig.2 Histopathological sections and scores of lung tissue stained with H&E and Masson in mice from different groups (H&E, × 16 and × 200;Masson, × 16 and × 200)



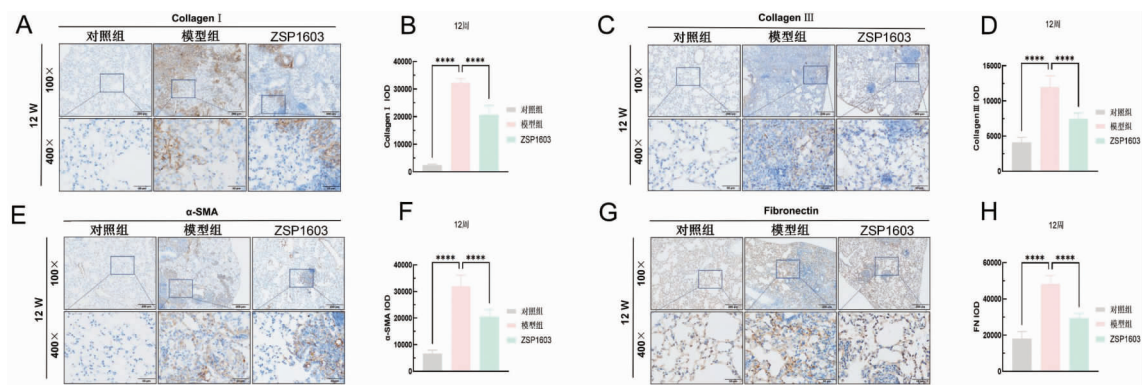
注:A 和 B 为 1 周和 12 周各组小鼠心、肝、脾和肾 H&E 染色病理图;C 和 D 为 1 周和 12 周各组小鼠心、肝、脾和肾脏器指数。

图 3 ZSP1603 对矽肺小鼠主要脏器的无明显损伤(H&E 染色, × 200)

Fig.3 ZSP1603 exhibited no overt organ toxicity in silicotic mice (H&E, × 200)

病理损伤。造模 12 周时(图 3B),各组上述脏器病理形态仍无明显异常,组织结构完整,未出现炎性浸润、变性、坏死或纤维化等病变,整体表现与 1 周时一致。同时测定各组小鼠心、肝、脾、肾脏器系数,结果显示,给药 1 周和 12 周后,各组心、肝、脾和肾脏器系数均无统计学差异(图 3C 和 3D)。结果表明,在治疗剂量下,口服给药对小鼠主要脏器无明显影响,长期给药 ZSP1603 在小鼠体内是安全的。

2.4 ZSP1603 可改善二氧化硅引起的矽肺小鼠肺组



注:A-H 为 12 周各组小鼠肺组织中 Collagen I、Collagen III、α-SMA 和 Fibronectin 免疫组化及阳性表达量化图。

图 4 ZSP1603 可减轻矽肺小鼠肺组织纤维化(IHC 染色, ×100 及 ×400)

Fig.4 ZSP1603 attenuates pulmonary fibrosis in silicotic mice (IHC, ×100 and ×400)

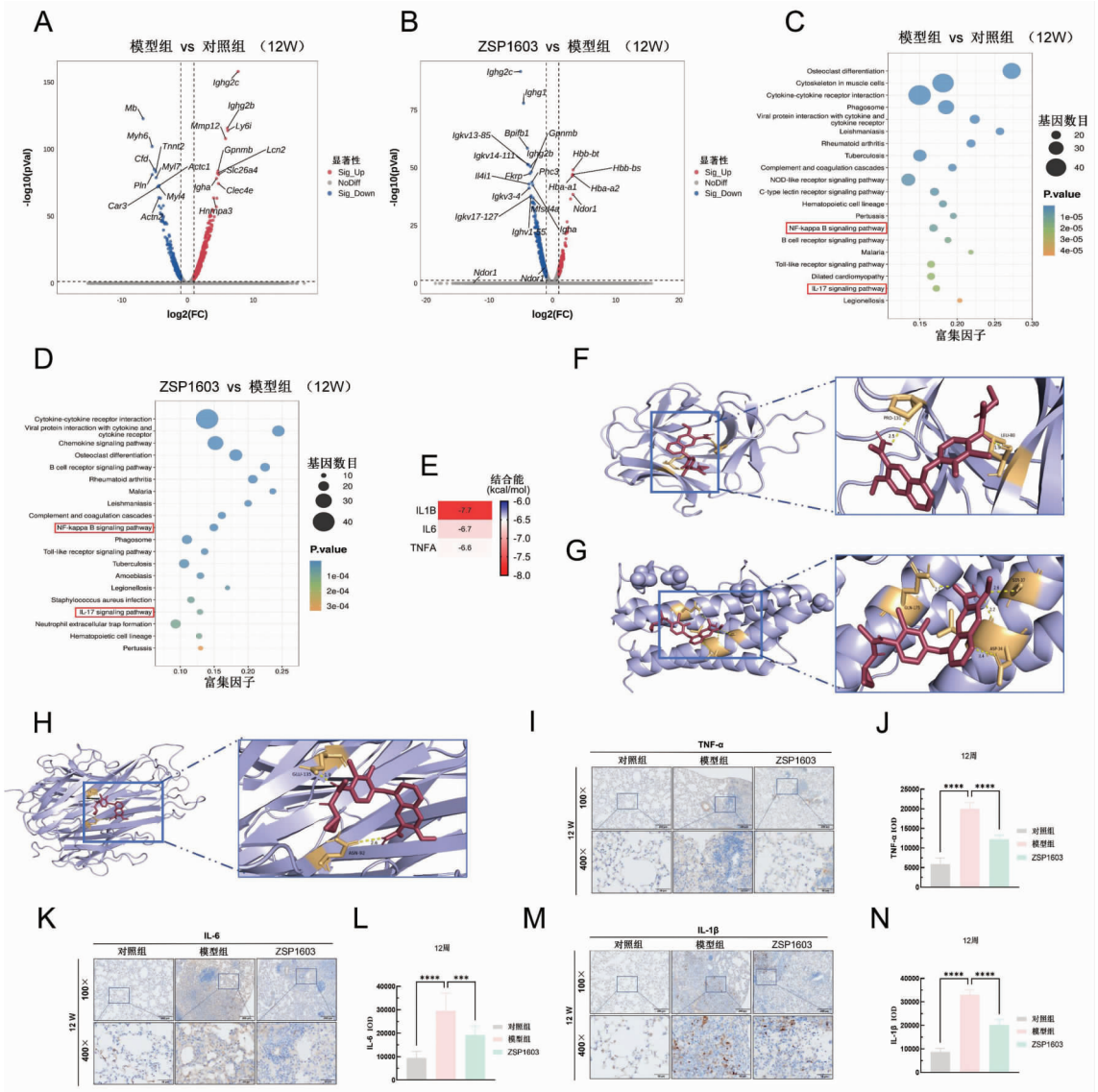
2.5 ZSP1603 可通过抗炎和减轻氧化应激改善矽肺样炎症 给药 12 周时,模型组较对照组筛选出 1 103 个差异基因(724 个上调,379 个下调),ZSP1603 治疗组较模型组差异更显著(801 个差异基因、147 个上调、654 个下调),且以下调关键炎症基因为主(图 5A 和 5B)。第 12 周模型组较对照组 KEGG 富集以细胞因子-细胞因子受体互作、IL-17 通路为主,核心炎症基因 *Tnf*、*Il1b* 介导多条通路激活(图 5C)。ZSP1603 较模型组 KEGG 最显著富集通路为多条炎症通路,其中 TLR-NF-κB 相关分子表达下调,表明 ZSP1603 抗炎效果显著(图 5D)。

2.6 ZSP1603 可改善二氧化硅引起的矽肺小鼠肺组织炎症相关指标 如分子对接热图(图 5E)和可视化图(图 5F、G 和 H)所示,ZSP1603 与 IL-1β、IL-6 和 TNF-α 分子对接结果显示结合力均 < -6.5 kcal/mol,提示长期 ZSP1603 干预具有显著抗炎效果。免疫组化染色结果显示,二氧化硅暴露 12 周后,对照组肺组织内 TNF-α、IL-6 和 IL-1β 仍几乎无表达,模型组三种蛋白表达均显著升高,阳性信号集中于增厚肺泡间隔与炎性浸润区(图 5I、K 和 M)。定量分析显示,模型组各因子表达量均显著高于对照组(均 $P < 0.0001$,图 5J、L 和 N),ZSP1603 干预组的三种炎症因子表达量均显著低于模型组(均 $P < 0.001$)。

2.7 ZSP1603 通过调节肠道微生物稳态改善二氧化硅引起的矽肺小鼠肺组织损伤 各组扩增子序列变体(amplicon sequence variants, ASVs)组成差异显著,模型组与对照组共有 ASV 751 个,特有 ASV 分别为 924 个、1 128 个(图 6A);ZSP1603 治疗组与模型组共有 ASV 714 个,特有 ASV 分别为 1 038 个和 961 个(图 6B)。Chao1 和 Shannon 指数稀释曲线(图 6C、6D)高测序深度下趋于平稳,证明测序数据量充足,可精准反映样本菌群结构。α 多样性分析(ACE、Chao1 和 Shannon 指数,图 6E ~ G)显示,模型组物种丰富度较对照组下降,ZSP1603 干预后回升,提示该药可逆转造模引发的菌群丰度降低。主成分分析(principal component analysis, PCA)分析中 PCA1 和 PCA2 分别解释 12.55%与 15.04%的总变异,累计解释度 27.59%,各组样本二维分布高度重叠(图 6H);基于 Bray-Curtis 距离的多因素方差分析(permutational multivariate analysis of variance, PERMANOVA)($R^2 = 0.2974$, $P = 0.004$)表明,分组可解释 29.74%的群落变异,不同干预可诱发菌群结构系统性多维改变。非度量多维尺度分析(non-metric multidimensional scaling, NMDS)应力值 0.10975(<0.2),拟合效果优良(图 6I),进一步验证组间菌群结构差异显著。门水平菌群分析(图 6J)显

示,厚壁菌门和拟杆菌门为各组核心优势菌门,总相对丰度超 80%,疣微菌门、放线菌门和变形菌门为次要优势菌群;组间对比可知,模型组放线菌门和硫酸盐还原菌门相对丰度较对照组显著升高,ZSP1603 治疗组硫酸盐还原菌门丰度显著下调,疣微菌门丰度显著上调。属水平菌群分析(图 6K ~ M)表明,毛螺菌

科 NK4A136 群、阿克曼菌属和双歧杆菌属为核心优势菌属;模型组毛螺菌科 NK4A136 群丰度较对照组显著降低、脱硫弧菌属丰度显著升高,ZSP1603 干预后,阿克曼菌属和利吉乳杆菌属丰度较模型组显著上调。综上,ZSP1603 可有效调控肠道菌群丰度与群落结构。



注:A 和 B 为模型组 vs 对照组与 ZSP1603 vs 模型组在第 12 周的差异表达基因火山图,筛选阈值设定为同时满足 $| \log_2(FC) | > 1$ 且 $P < 0.05$ 的基因将被判定为差异表达基因;C 和 D 为模型组 vs 对照组和 ZSP1603 vs 模型组在第 12 周的差异表达基因 KEGG 富集分析图;E ~ H 为 ZSP1603 与 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 分子对接结果热图及可视化图;I ~ N 为 12 周各组小鼠肺组织 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 免疫组织化学染色及阳性表达图。

图 5 ZSP1603 可减轻矽肺小鼠肺组织炎症(IHC 染色, $\times 100$ 及 $\times 400$)
Fig.5 ZSP1603 attenuates lung inflammation in silicotic mice (IHC, $\times 100$ and $\times 400$)

3 讨论

矽肺作为我国最常见且危害最严重的一类尘肺病,在采矿、隧道建设、人造石加工、陶瓷制造等行业仍呈高发态势,已成为重要公共卫生问题^[4]。然而,

ZSP1603 在矽肺模型中的疗效尚未验证,其对二氧化硅特异性炎症微环境的影响仍属未知。本研究基于网络药理毒理学筛选出 ZSP1603 与矽肺共有 50 个交集靶点,覆盖 EGFR、FGFR1/2、ERBB2 和 IGF1R 等多种受体酪氨酸激酶,富集在 PI3K - Akt 与 MAPK 通路

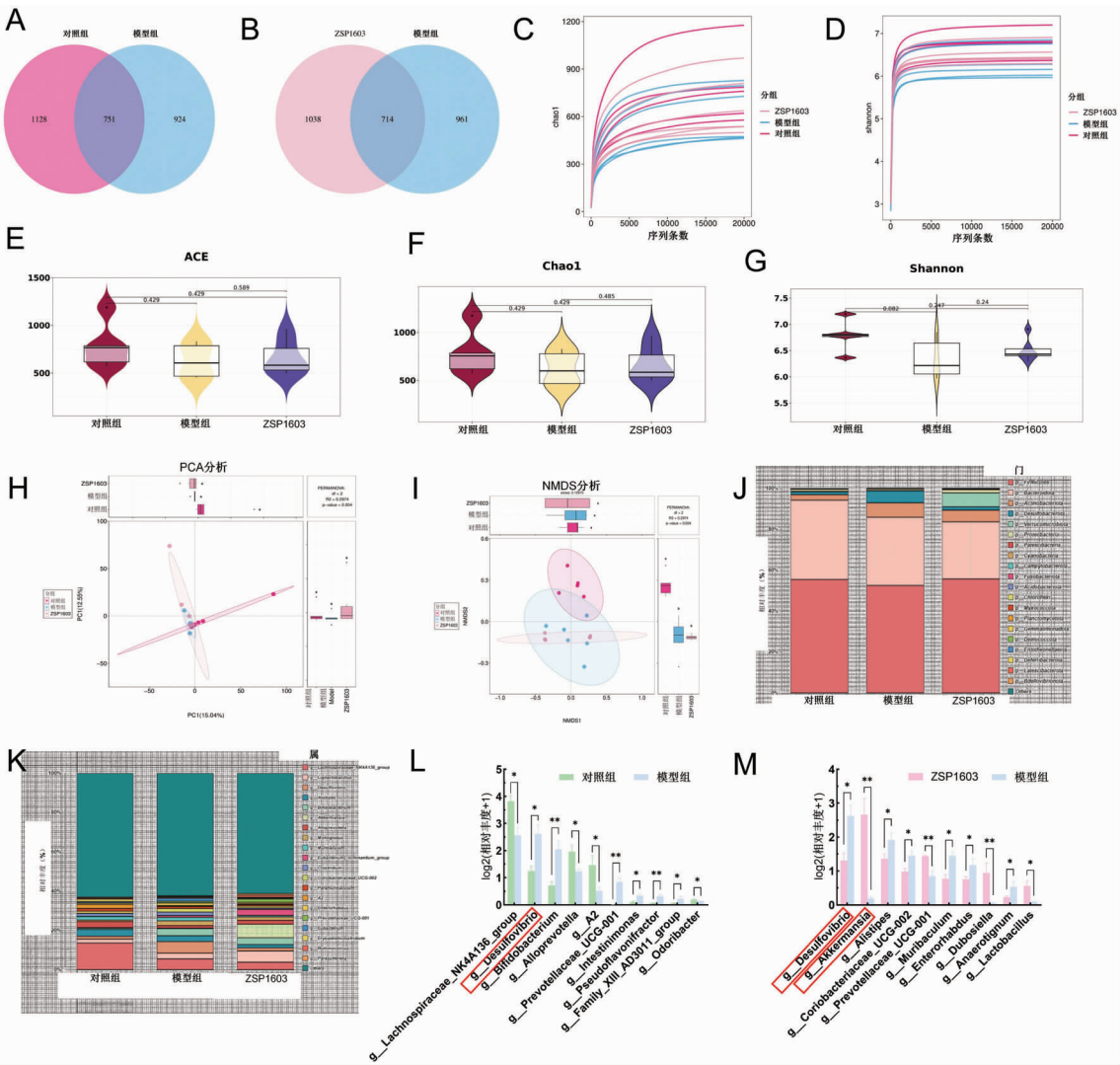


图 6 ZSP1603 能够有效调节矽肺小鼠的肠道微生物多样性

Fig. 6 ZSP1603 effectively regulates gut microbial diversity in silicotic mice

上。分子对接结果证实,ZSP1603 与 SRC 等核心靶点结合能力优异,可能阻断生长因子介导的成纤维细胞增殖与活化^[17-18]。生物信息学层面表明,ZSP1603 的作用机制可能涉及 PI3K - Akt/MAPK/MMPs 信号轴,直接靶向下游酪氨酸激酶介导的成纤维细胞活化与增殖,为体内实验提供了清晰研究假设。

造模 12 周后,模型组小鼠肺泡结构大面积破坏、炎性细胞浸润显著和胶原大量沉积;ZSP1603 干预组能有效抑制慢性炎症,且在矽肺纤维化持续进展过程中可显著减轻胶原沉积、改善肺纤维化程度,Szapiel 肺肺炎评分与改良 Ashcroft 纤维化评分显著降低。免疫组化检测证实,ZSP1603 可显著下调 Collagen I、Collagen III、Fibronectin 及 α - SMA 等纤维化标志性蛋白^[19-20],从蛋白水平验证了其强大的抗纤维化效

力。安全性评估显示,ZSP1603 对心、肝、脾、肾等主要脏器无明显病理损伤,安全性良好,具备临床前开发价值。

转录组学分析从分子层面探究了 ZSP1603 的干预机制,分析发现 ZSP1603 可同时调控慢性炎症与纤维化微环境,核心作用聚焦于抑制炎症细胞招募活化、调控细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 重塑^[21]。ZSP1603 特异性基因集显著富集 ECM 受体互作、溶酶体、Toll 样受体^[22] 与 NF - κ B 通路。免疫组化结果也验证 ZSP1603 可显著降低关键炎症因子 IL - 1 β 、TNF - α 、IL - 6 表达,与前文转录组分析揭示的“ZSP1603 可调控慢性炎症反应”的作用结论相符。

近年研究证实,肠道菌群失调通过肠 - 肺轴调控肺部免疫与代谢,参与矽肺纤维化进程^[23],临床与动

物实验均发现矽肺患者及模型动物存在明显肠道菌群紊乱,靶向肠道微生态成为矽肺干预的新方向^[24-25]。在矽肺患者中,16S rRNA 基因测序分析显示,其粪便微生物组成在门水平和属水平均发生特异性改变,且菌群多样性与疾病严重程度密切相关^[24]。患者粪便中厚壁菌门和放线菌门的丰度显著降低^[24]。在矽肺大鼠模型中,瘤胃球菌属和乳杆菌属的相对丰度也出现显著异常^[25]。这些研究结果表明,肠道菌群失调是矽肺患者及模型动物的稳定表型特征。一项纵向研究发现,小鼠暴露于二氧化硅 4 周和 8 周后,肠道菌群呈现出时间特异性改变:暴露早期(4 周),肠道菌群以 *Allobaculum*、*Turicibacter* 等属为主;暴露晚期(8 周),则以 *Ruminococcaceae* NK4A214 group 和 *Ruminiclostridium* 5 的显著富集为核心特征^[26]。特定肠道菌群(如 *Romboutsia* 属)对矽肺具有保护效应,而巴斯德氏菌科等则为矽肺发病的风险因素^[27]。本研究首次结合肠道微生物组学探究 ZSP1603 的干预机制,证实 ZSP1603 可有效修复肠道菌群稳态,可显著上调阿克曼菌属(一种已被报道的有益菌属^[28-29])、利吉乳杆菌属^[30]等有益菌丰度,下调硫酸盐还原菌^[31]等有害菌丰度,阻断菌群紊乱介导的全身炎症扩散^[32],从微生态层面拓展了酪氨酸激酶抑制剂的作用机制。

综上,ZSP1603 可呈时间依赖性改善矽肺小鼠肺组织损伤,慢性纤维化阶段干预效果显著,能同时发挥抗炎、抗氧化应激、抗纤维化和调节肠道菌群稳态的作用,且药物安全性良好、疗效确切。但本研究存在一定局限性:仅采用小鼠矽肺模型,存在种属差异,可能影响临床转化效果,未深入解析核心靶点的精细调控机制,未设置多剂量梯度探索量效关系;本研究通过网络药理学、转录组学及下游炎症因子免疫组化初步提示 ZSP1603 可能调控 PI3K - Akt/MAPK/MMPs 通路,但尚未对通路关键蛋白的磷酸化水平进行直接验证,相关结论仍需后续通过 Western blot 等蛋白水平实验进一步证实;本研究为全程干预模式,观察到的胶原减少主要反映药物对纤维化进展过程中胶原新生与沉积的抑制作用,其是否能够直接降解已形成的细胞外基质、逆转成熟纤维化,仍有待后续采用治疗性给药方案(造模后延迟给药)加以验证。整体而言,研究充分证实 ZSP1603 具备成为矽肺临床防治新型候选药物的潜力,为后续临床转化及矽肺防治新方案研发提供了坚实的实验基础与理论支撑。

利益冲突声明 本研究不存在任何利益冲突

参考文献

- [1] Leung CC, Yu IT, Chen W. Silicosis[J]. Lancet, 2012, 379(9830): 2008 - 2018.
- [2] Xu W, Ma R, Wang J, et al. Pneumoconiosis combined with connective tissue disease in China: a cross - sectional study[J]. BMJ Open, 2023, 13(4): e068628.
- [3] Makol A, Reilly MJ, Rosenman KD. Prevalence of connective tissue disease in silicosis (1985 - 2006): a report from the state of Michigan surveillance system for silicosis[J]. American Journal of Industrial Medicine, 2011, 54(4): 255 - 262.
- [4] Hoy RF, Chambers DC. Silica - related diseases in the modern world[J]. Allergy, 2020, 75(11): 2805 - 2817.
- [5] Rajavel S, Raghav P, Gupta MK, et al. Silico - tuberculosis, silicosis and other respiratory morbidities among sandstone mine workers in Rajasthan: a cross - sectional study[J]. PLOS One, 2020, 15(4): e0230574.
- [6] Murgia N, Akgun M, Blanc PD, et al. Issue 3 - the occupational burden of respiratory diseases, an update[J]. Pulmonology, 2025, 31(1): 2416808.
- [7] 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.
- [8] Richeldi L, Du BR, Raghu G, et al. Efficacy and safety of Nintedanib in idiopathic pulmonary fibrosis [J]. New England Journal of Medicine, 2014, 370(22): 2071 - 2082.
- [9] Eisen T, Shparyk Y, Macleod N, et al. Effect of small angiokinase inhibitor Nintedanib (BIBF1120) on QT interval in patients with previously untreated, advanced renal cell cancer in an open - label, phase II study[J]. Investigational New Drugs, 2013, 31(5): 1283 - 1293.
- [10] Flaherty KR, Wells AU, Cottin V, et al. Nintedanib in progressive fibrosing interstitial lung diseases [J]. New England Journal of Medicine, 2019, 381(18): 1718 - 1727.
- [11] Wollin L, Distler JHW, Redente EF, et al. Potential of Nintedanib in treatment of progressive fibrosing interstitial lung diseases [J]. European Respiratory Journal, 2019, 54(3): 1900161.
- [12] Liu Z, Zhao M, Su X, et al. The antifibrotic effect and mechanism of a novel tyrosine kinase inhibitor, ZSP1603, in preclinical models of pulmonary fibrosis [J]. European Review for Medical and Pharmacological Sciences, 2020, 24(3): 1481 - 1491.
- [13] Song SY, Huang LJ, Zhou XQ, et al. Exploring the toxicological network in diabetic microvascular disease[J]. International Journal of Surgery, 2025, 111(6): 3895 - 3907.
- [14] Piñero J, Ramírez - Anguita JM, Saüch - Pitarch J, et al. The DisGeNET knowledge platform for disease genomics; 2019 update [J]. Nucleic Acids Research, 2020, 48(D1): D845 - D855.
- [15] Szapiel SV, Elson NA, Fulmer JD, et al. Bleomycin - induced interstitial pulmonary disease in the nude, athymic mouse[J]. The American Review of Respiratory Disease, 1979, 120(4): 893 - 899.
- [16] Hübner R, Gitter W, El MN, et al. Standardized quantification of pulmonary fibrosis in histological samples [J]. BioTechniques, 2008, 44(4): 507 - 511, 514 - 517.
- [17] Viganò L, Locatelli A, Ullisse A, et al. Modulation of the estrogen/erbB2 receptors cross - talk by CDK4/6 inhibition triggers sustained senescence in estrogen receptor - and ErbB2 - positive breast cancer[J]. Clinical Cancer Research, 2022, 28(10): 2167 - 2179.

[18]

Espindola MS, Habiél DM, Narayanan R, et al. Targeting of TAM receptors ameliorates fibrotic mechanisms in idiopathic pulmonary fibrosis[J]. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, 2018, 197(11): 1443–1456.

[19]

Wagner JC, Burns J, Munday DE, et al. Presence of fibronectin in pneumoconiotic lesions[J]. Thorax, 1982, 37(1): 54–56.

[20]

Geng F, Xu J, Ren X, et al. Effect of macrophage – to – myofibroblast transition on silicosis[J]. Anim Models Exp Med, 2025, 8(2): 363–371.

[21]

Yoo YJ, Choi E, Kim Y, et al. Therapeutic potential of targeting cathepsin S in pulmonary fibrosis [J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2022, 145(1): 112245.

[22]

You XJ, Xie YJ, Xiong GY, et al. Silica – induced innate immune activation drives macrophage pyroptosis and lung inflammation through glycolytic reprogramming [J]. Environmental Pollution, 2025, 382(3): 126762.

[23]

Gong GC, Song SR, Su J. Pulmonary fibrosis alters gut microbiota and associated metabolites in mice; an integrated 16S and metabolomics analysis [J]. Life Sciences, 2021, 264 (1): 118616.

[24]

Zhou Y, Chen L, Sun GF, et al. Alterations in the gut microbiota of patients with silica – induced pulmonary fibrosis[J]. Journal of Occupational Medicine and Toxicology, 2019, 14(1): 5.

[25]

Zhang WL, Qi XJ, Han MM, et al. Activation of Sirt1 by acetate alleviates silicofibrosis; contribution of the gut microbiota [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2025, 292(2): 117969.

[26]

Guo JG, Zhang BX, Xiong Y, et al. The temporal characteristics of the disruption of gut microbiota, serum metabolome, and cytokines by silica exposure in wistar rats[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2023, 252(2): 114580.

[27]

Zhang CW, Wan BB, Zhang YK, et al. Deciphering the role of VIM, STX8, and MIF in pneumoconiosis susceptibility: a mendelian randomization analysis of the lung – gut axis and multi – omics insights from European and East Asian populations [J]. Biomedical and Environmental Sciences, 2025, 38(10): 1270–1286.

[28]

Huang PF, Liu YQ, Li NN, et al. Causal relationship between gut microbiota and pneumonia: a Mendelian randomization and retrospective case – control study[J]. BMC Pulmonary Medicine, 2025, 25(1): 449.

[29]

Keshavarz aziziraftar S, Bahrami R, Hashemi D, et al. The beneficial effects of Akkermansia muciniphila and its derivatives on pulmonary fibrosis [J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2024, 180(1): 117571.

[30]

You – Tae K, Joon – Gi K, O’ Sullivan DJ, et al. Regulatory mechanism of cysteine – dependent methionine biosynthesis in Bifidobacterium longum; insights into Sulfur metabolism in gut microbiota[J]. Gut Microbes, 2024, 16(1): 2419565.

[31]

Ková ě J, Vítězová M, KushkevychI. Metabolic activity of sulfate – reducing bacteria from rodents with colitis[J]. Open Medicine, 2018, 13(1): 344–349.

[32]

Shen Z, Cui T, Liu Y, et al. Astragalus membranaceus and Salvia miltiorrhiza ameliorate diabetic kidney disease via the “gut – kidney axis”[J]. Phytomedicine, 2023, 121(2): 155129.

收稿日期:2026-03-29

(上接第 2509 页)

[17]

张嘉骏. 饮食多样性和饮食模式对衰弱的影响及性别差异研究——基于 CLHLS 数据[D]. 济南:山东大学,2023.

Zhang JJ. Effects of dietary diversity and dietary patterns on frailty and gender differences study – based on CLHLS data [D]. Jinan; Shandong University, 2023. (In Chinese)

[18]

Kojima G, Taniguchi Y, Kitamura A, et al. Is living alone a risk factor of frailty? – a systematic review and meta – analysis[J]. Ageing Research Reviews, 2020, 59(4): 101048.

[19]

段景宜,马亚男,阿尔有布,等. 炎症与衰弱的关系研究进展 [J]. 实用老年医学,2025,39(7):649–653.

Duan JY, Ma YN, A EYB, et al. Association of inflammation and frailty[J]. Practical Geriatrics, 2025, 39(7): 649–653. (In Chinese)

[20]

Zhang Y, Yu G, Bai W, et al. Association of depression and sleep quality with frailty: a cross – sectional study in China[J]. Front Public Health, 2024, 12(3): 1361745.

[21]

Schoufour JD, Overvest E, Weijs P, et al. Dietary protein, exercise, and frailty domains [J]. Nutrients, 2019, 11(10): 2399.

[22]

韩佳滢,巢健茜,罗宗玉,等. 不同社会参与模式老年人的认知衰弱差异[J]. 中华疾病控制杂志,2023,27(9):1052–1058.

Han JY, Chao JQ, Luo ZY, et al. A comparative study of differences in cognitive frailty in older adults with different social participation patterns [J]. Chinese Journal of Disease Control & Prevention, 2023, 27(9): 1052–1058. (In Chinese)

[23]

Bunt S, Steverink N, Olthof J, et al. Social frailty in older adults: a scoping review[J]. European Journal of Ageing, 2017, 14(3): 323–334.

[24]

葛汝旭,井淇,郭桐桐,等. 老年人社会参与对认知功能的影响: 代际精神支持和抑郁的链式中介作用[J]. 现代预防医学, 2024,51(22):4159–4164, 4218.

Ge RX, Jing Q, Guo TT. Effects of social participation on cognitive functioning in older adults: the chain – mediated role of intergenerational psychosocial support and depression[J]. Modern Preventive Medicine, 2024, 51(22): 4159–4164, 4218. (In Chinese)

收稿日期:2025-09-19