

◇ 基础医学研究 ◇

基于 iTRAQ 技术探究过表达 *Ptpn2* 对 SiO₂ 介导的小鼠肺泡巨噬细胞炎症反应的调控作用魏 懿^{1,2}, 李雅倩^{2,3}, 李欣杰¹, 冯梦斐^{1,2}, 靳馥宇^{1,2}, 徐 洪^{1,2,4}, 朱 莹^{1,2}(华北理工大学¹公共卫生学院、³中医学院、⁴医学部, 唐山 063210;²河北省器官纤维化重点实验室, 唐山 063210)

摘要 目的 探究过表达非受体型蛋白酪氨酸磷酸酶 2(*Ptpn2*)对 SiO₂介导的小鼠肺泡巨噬细胞(MH-S)炎症反应的调控作用。方法 构建过表达 *Ptpn2* 稳转细胞系,给予 SiO₂诱导,分为空载对照组(NC)、过表达 *Ptpn2* 组(P)、空载对照+SiO₂诱导组(NS)、过表达 *Ptpn2*+SiO₂诱导组(PS);对 4 组细胞进行同位素标记相对和绝对定量(iTRAQ)技术联合液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)技术分析,筛选差异蛋白,进行数据库基因本体(GO)和京都基因和基因组百科全书(KEGG)分析;采用免疫荧光染色检测肿瘤坏死因子(TNF)- α 、气孔形成蛋白 D(GSDMD)和转化生长因子(TGF)- β 1 的表达;Western blot 检测 PTPN2、Toll 样受体(TLR4)、TNF- α 、核苷酸结合寡聚结构域样受体蛋白(NLRP3)和 TGF- β 1 信号通路相关的蛋白表达水平。结果 iTRAQ 结果显示,4 组共有 144 个差异蛋白;GO 结果显示,差异蛋白在生物学过程主要富集在 I κ B 激酶/核因子 κ B(NF- κ B)信号传导、免疫反应的细胞激活和信号传导及转录激活蛋白(STAT)对受体信号通路的调节等;KEGG 结果显示差异蛋白主要富集在 Toll 样受体信号通路、NF- κ B 信号通路、NOD 样受体信号通路、TGF- β 信号通路和 TNF 信号通路。免疫荧光染色结果显示,与 NC 组比较,NS 组细胞中 TNF- α 、GSDMD 和 TGF- β 1 的表达增多;而与 NS 组比较,PS 组细胞蛋白中上述蛋白表达减少($P < 0.05$)。Western blot 结果显示,与 NC 组比较,NS 组细胞蛋白中 PTPN2、p-NF- κ B、MyD88、TLR4、NLRP3、GSDMD、Caspase-1、IL-1 β 、TGF- β R1、TGF- β R2、p-Smad2/3 蛋白表达水平显著上调($P < 0.05$);而与 NS 组比较,PS 组细胞蛋白中上述蛋白表达水平显著下调($P < 0.05$)。结论 过表达 *Ptpn2* 能够抑制 SiO₂介导的 MH-S 细胞中与炎症反应密切相关的 TLR4-TNF- α 信号、NLRP3 信号和 TGF- β 1 信号的蛋白表达。

关键词 非受体型蛋白酪氨酸磷酸酶 2;巨噬细胞;炎症;气孔形成蛋白 D;肿瘤坏死因子 α

中图分类号 R 135.2

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2026)02-0183-09

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2026.02.001

矽肺病是由长期吸入大量游离 SiO₂ 粉尘引起的一种职业性尘肺病^[1]。2023 年全国职业性尘肺病在各类职业病新病例中占比 76.05%^[2]。巨噬细胞是矽肺纤维化形成进程中的重要免疫细胞,尤其是肺泡巨噬细胞能够识别和吞噬吸入的 SiO₂ 颗粒,是启动肺部正常免疫功能和引起炎症反应的第一步^[1]。非受体型蛋白酪氨酸磷酸酶 2(protein tyrosine phosphatase non-receptor type 2, PTPN2)通过磷酸酪氨酸的信号转导以调节多种细胞过程,其广泛的调节途径与炎症反应、免疫反应密切相关^[3]。研究^[4]显

示炎症性疾病中伴发 PTPN2 的异常表达,且过表达 *Ptpn2* 后能够减轻大鼠神经炎症。而特异性敲除 *Ptpn2* 的小鼠表现出因炎症应激引起加速死亡,提示 PTPN2 可能具有抗炎作用^[5]。在炎症性疾病模型研究中,PTPN2 通过抑制巨噬细胞中炎症因子的释放发挥保护作用,可作为炎症性疾病的潜在治疗靶点^[6]。

课题组前期研究^[7]表明 PTPN2 可通过去磷酸化 STAT3 抑制上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)减轻大鼠矽肺纤维化。然而,PTPN2 是否通过调节巨噬细胞炎症发挥抗纤维化作用尚不清楚。因此,该研究拟通过体外实验观察过表达 *Ptpn2* 对于 SiO₂ 介导的肺泡巨噬细胞炎症反应的作用机制,以期对矽肺纤维化的干预和治疗提供实验依据。

1 材料方法

1.1 主要材料与仪器 小鼠肺泡巨噬细胞 MH-S

2025-10-19 接收

基金项目:国家自然科学基金项目(编号:82473607);河北省自然科学基金项目(编号:H2021209049);河北省高等学校科学研究项目(编号:QN2025407);河北省高等教育科学研究项目(编号:JJC2024032)

作者简介:魏 懿,女,硕士研究生;

朱 莹,女,副教授,硕士生导师,通信作者,E-mail:

zhuying@ncst.edu.cn

购自中国科学院细胞库;RPMI-1640培养基、SiO₂粉尘(0.5~10 μm,纯度99%)(美国Sigma公司,货号:R5886、S5631);胎牛血清(以色列Biological Industries公司,货号:04-001-1ACS);β-巯基乙醇、NOD样受体家族含pyrin结构域蛋白3(NOD-like receptor family pyrin domain containing 3, NLRP3)抗体、山羊抗鼠抗体、山羊抗兔抗体(中国瑞帕特公司,货号:RS1015、RA1075、S1001-100、S1002-100);*Ptpn2*慢病毒包装试剂盒(中国合生基因科技有限公司合成);嘌呤霉素(美国Cayman公司,货号:13884);β-actin抗体(中国爱博泰克公司,货号:AC038);PTPN2抗体、气孔形成蛋白D(gasdermin D, GSDMD)抗体(美国Affinity Biosciences公司,货号:DF6629、AF4012);磷酸化核因子κB(phosphorylated nuclear factor kappa-B, p-NF-κB)抗体、核因子κB(nuclear factor kappa B, NF-κB)抗体、Toll样受体4(toll-like receptor 4, TLR4)抗体、转化生长因子-β1(transforming growth factor-β1, TGF-β1)抗体、转化生长因子-β受体1(transforming growth factor-β receptor 1, TGF-βR1)抗体、转化生长因子-β受体2(transforming growth factor-β receptor 2, TGF-βR2)抗体(中国Arigo公司,货号:ARG51518、ARG51013、ARG204679、ARG56429、ARG57752、ARG59501);髓样分化因子88(myeloid differentiation primary response 88, MyD88)抗体、肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor-α, TNF-α)抗体(美国Gene Tex公司,货号:GTX112987、GTX110520);半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶1(cysteine-aspartic acid protease 1, Caspase-1)抗体、白细胞介素-1β(interleukin-1β, IL-1β)抗体(美国Santa cruz公司,货号:sc-56036、sc-515598);磷酸化母亲抗去头蛋白同源物2/3(phosphorylated mothers against decapentaplegic homolog 2/3, p-Smad2/3)抗体、Smad2/3抗体(美国BD Biosciences公司,货号:552598、610842);ECL超敏发光试剂盒(中国庄盟国际生物基因科技有限公司,货号:25AF04)

CO₂培养箱、酶标仪(美国Thermo Fisher Scientific公司,型号:Forma 3111、Multiskan FC);SDS-PAGE电泳仪和电转仪(美国Bio-Rad公司,型号:Mini-PROTEAN Tetra、Mini Trans-Blot Cell);化学发光成像系统(上海勤翔科学仪器有限公司,型号:ChemiScope 6100)。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞分组与处理

选用MH-S细胞,培养在含15%胎牛血清和0.1%β-巯基乙醇的RPMI-1640培养基中,最终置于恒温37℃、5%体积分数的CO₂细胞培养箱中培养。采用第3代细胞进行试验,于RPMI-1640空白培养基中同步化处理24 h后进行转染慢病毒处理。计算慢病毒和凝聚胺体积后将空白载体(1.83×10⁸ TU)与*Ptpn2*过表达载体(1.83×10⁸ TU)慢病毒分别转染细胞,转染48 h后使用含有嘌呤霉素的完全培养基培养细胞,抗性筛选2周后得到稳转空载对照组和过表达*Ptpn2*组细胞系。

将慢病毒转染成功的MH-S细胞进行SiO₂诱导,共分为4组:空载对照组(NC组),空白培养基培养空白载体转染的细胞24 h;过表达*Ptpn2*组(P组),空白培养基培养*Ptpn2*过表达细胞24 h;空载对照+SiO₂诱导组(NS组),空白培养基培养空白载体转染的细胞并给予终浓度100 μg/mL的SiO₂诱导24 h;过表达*Ptpn2*+SiO₂诱导组(PS组),空白培养基培养*Ptpn2*过表达细胞并给予终浓度100 μg/mL的SiO₂诱导24 h。

1.2.2 蛋白质组学生物信息学分析

将NC组、P组、NS组和PS组进行同位素标记相对和绝对定量(isobaric tags for relative and absolute quantification, iTRAQ)技术联合液相色谱串联质谱(liquid chromatography-trandem mass spectrometry, LC-MS/MS)技术筛选差异蛋白。细胞经转染慢病毒及SiO₂诱导处理24 h后提取蛋白,经蛋白定量试剂盒测定总蛋白浓度,确保样品间浓度一致,经同位素标记技术对不同样本进行标记,将标记后的肽段样品进行液相色谱分离,通过液相色谱-质谱联用进行定量和定性分析。将得到的质谱数据去除噪音信号和背景信号后计算差异倍数和显著性水平,根据差异倍数以及显著性水平进行差异蛋白筛选,并绘制维恩图和聚类热图,进一步对筛选得到的差异蛋白进行基因本体(gene ontology, GO)富集分析和京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)富集分析。

1.2.3 Western blot

采用总蛋白提取法提取细胞蛋白,每皿细胞加入200 μL总蛋白裂解液,4℃裂解20 min后转移进1.5 mL EP管置于4℃离心机,以12 000 r/min条件下离心30 min,提取上清液并进行BCA浓度测定,以每孔20 μg的蛋白质量进行常规电泳和电转。一抗PTPN2、p-NF-κB、NF-κB、MyD88、TLR4、TNF-α、NLRP3、GSDMD、Caspas-1、IL-

1 β 、TGF- β R1、TGF- β R2、p-Smad2/3、Smad2/3 和 β -actin 稀释比均为 1:1 000,4 $^{\circ}$ C 孵育过夜;山羊抗兔或鼠抗体(1:5 000)置于 37 $^{\circ}$ C 摇床孵育 30 min,ECL 超敏发光试剂盒显色。采用 Image-Pro-plus6.0 图像处理软件对条带进行灰度值分析,用目标蛋白与内参蛋白的比值进行蛋白相对表达量的分析。

1.2.4 细胞免疫荧光 将 MH-S 细胞均匀铺至玻璃爬片,经 4% 多聚甲醛固定 30 min,置于自来水中水化,然后分别置于梯度乙醇和二甲苯中,脱去胶圈,再经二甲苯和梯度乙醇处理,最后置于自来水中水化,置于含枸橼酸钠的修复盒中,高压修复 80 s,PBS 冲洗后孵育一抗 TNF- α 、GSDMD 和 TGF- β 1,稀释比均为 1:500,于 4 $^{\circ}$ C 冰箱过夜,次日于 37 $^{\circ}$ C 温箱孵育异硫氰酸荧光素标记的二抗(1:100)90 min,经 DAPI 封片后置于荧光显微镜下观察,拍摄图片。

1.3 统计学处理 所有实验均重复 3 次,采用 SPSS 23.0 统计分析软件进行统计学分析,所有数据以均数 \pm 标准差表示;多组间比较采用完全随机设计的单因素方差分析,事后两两比较方差齐采用 LSD-*t* 检验,方差不齐采用 Tamhane's 检验,所有检验均为双侧检验,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 过表达 *Ptpn2* 对 SiO₂ 诱导的 MH-S 细胞中 PTPN2 蛋白表达水平的影响 免疫印迹法结果显示,与 NC 组比较,P 组中 PTPN2 的蛋白表达水平上调(LSD-*t*=15.876, *P*<0.05),而 NS 组中 PTPN2 的蛋白表达水平下调(LSD-*t*=-5.937, *P*<0.05);与 NS 组比较,PS 组中 PTPN2 的蛋白表达水平上调(LSD-*t*=7.487, *P*<0.05)。见图 1。

2.2 蛋白质组生物信息学分析过表达 *Ptpn2* 对 SiO₂ 诱导的 MH-S 细胞的影响 维恩图结果显示,在 *P*<0.05 的条件下,筛选 NS:NC 组 FC>1.2 同时满足 PS:NS 组 FC<0.83 的差异表达蛋白以及 NS:NC

组 FC<0.83 同时满足 PS:NS 组 FC>1.2 的差异表达蛋白,共得到差异表达蛋白 144 个。见图 2A。为直观展示各组间差异表达蛋白,对筛选得到的 144 个差异表达蛋白进行聚类分析得到可视化热图,热图颜色梯度代表蛋白表达水平,红色为上调,蓝色为下调,聚类结果显示 4 组蛋白表达谱差异显著且分组特异性强。见图 2B。

对上述差异表达蛋白进行 GO 和 KEGG 富集分析。GO 分析显示,差异表达蛋白在生物学过程中主要富集在 I κ B 激酶/核因子 κ B 信号传导通路、免疫反应的细胞激活和信号转导及转录激活因子(STAT)介导的受体信号调控通路等;在分子功能中主要富集在泛素蛋白连接酶结合作用、泛素样蛋白连接酶结合作用和 ω 肽酶活性等;在细胞组分中主要富集在网格蛋白包被小窝、丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶复合物和蛋白激酶复合物等。见图 3A-3C。

KEGG 分析结果重点关注炎症相关信号通路,结果显示差异蛋白主要富集在 Toll 样受体信号通路、NF- κ B 信号通路、NOD 样受体信号通路、TGF- β 信号通路、TNF 信号通路。见图 3D。

2.3 过表达 *Ptpn2* 对 SiO₂ 诱导的 MH-S 细胞中 TLR4-TNF- α 信号通路蛋白表达水平的影响 免疫荧光染色结果显示,与 NC 组比较,NS 组中 TNF- α 的表达增多;与 NS 组比较,PS 组中 TNF- α 的表达减少。见图 4。

Western blot 结果显示,与 NC 组比较,NS 组中 p-NF- κ B、MyD88、TLR4、TNF- α 的蛋白表达水平显著上调(LSD-*t*=7.606、10.615、14.169、5.544,均 *P*<0.05);与 NS 组比较,PS 组中 p-NF- κ B、MyD88、TLR4、TNF- α 的蛋白表达水平下调(LSD-*t*=-4.871、-10.244、-33.922、-9.279,均 *P*<0.05)。与 NC 组比较,P 组中 p-NF- κ B、MyD88、TLR4、TNF- α 的蛋白表达水平无显著差异(LSD-*t*=-0.024、0.725、2.538、-0.51,均 *P*>0.05)。见图 5。

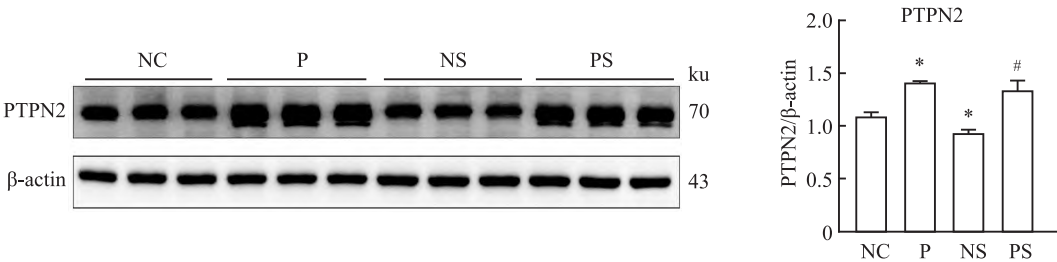


图 1 过表达 *Ptpn2* 对 SiO₂ 诱导的 MH-S 细胞中 PTPN2 蛋白表达水平的影响

Fig. 1 The effects of the overexpression of *Ptpn2* on the expression level of PTPN2 protein in MH-S cells induced by SiO₂

**P* < 0.05 vs NC group; #*P* < 0.05 vs NS group.

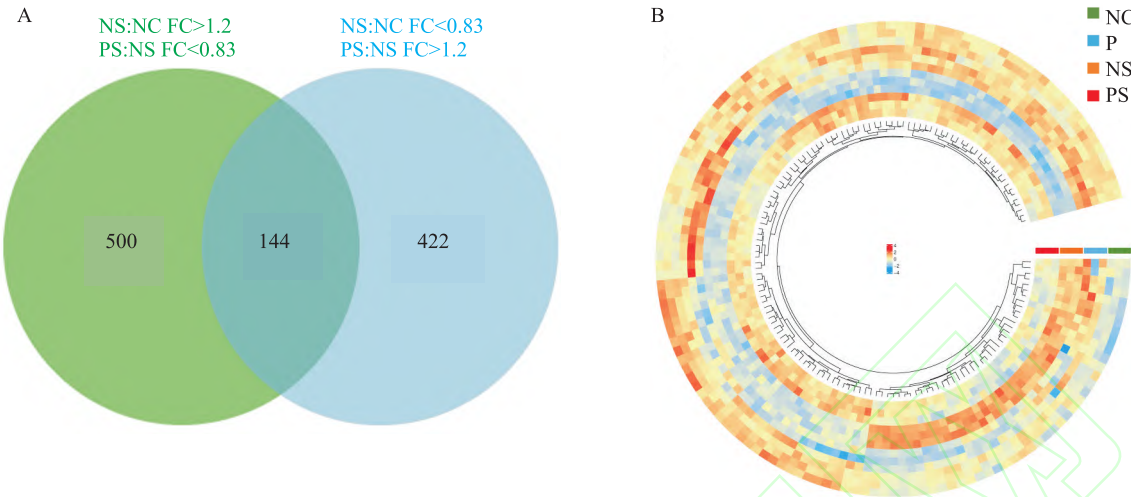


图2 蛋白质组生物信息学分析差异蛋白韦恩图(A)与聚类热图(B)

Fig. 2 Venn diagram (A) and clustering heatmap (B) of differentially expressed proteins from bioinformatics analysis of the proteome

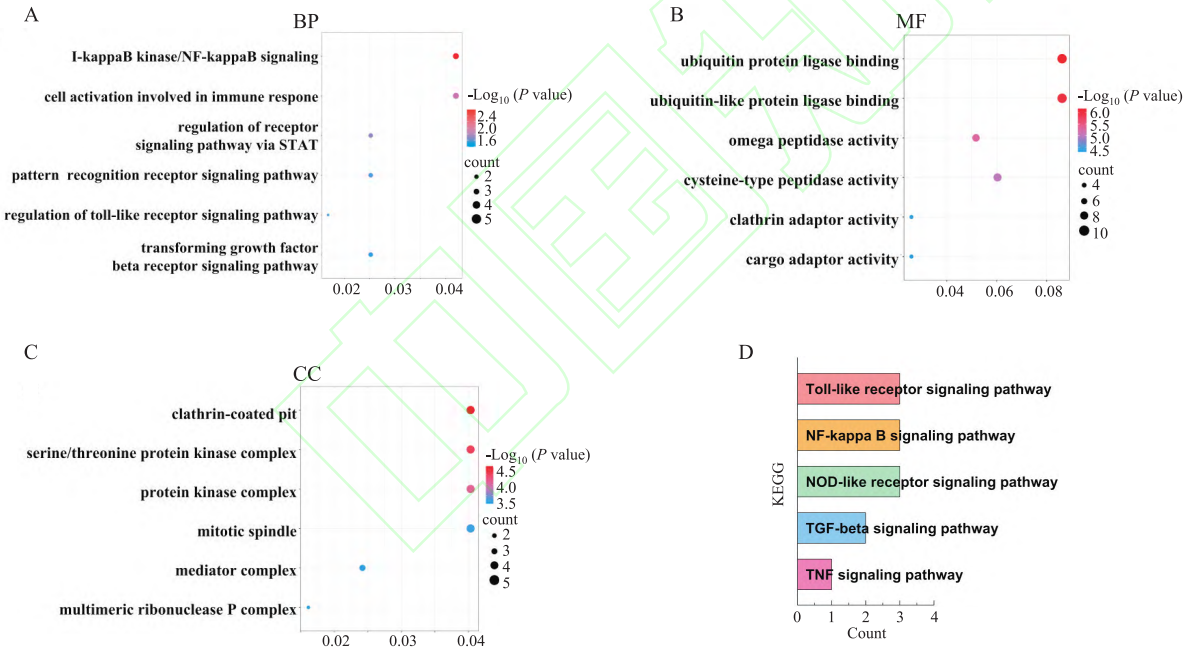


图3 蛋白质组生物信息学分析过表达 *Ptpn2* 对 SiO_2 诱导的 MH-S 细胞的影响

Fig. 3 Proteomic bioinformatics analysis of the effects of the overexpression of *Ptpn2* on MH-S cells induced by SiO_2

A-C: GO enrichment analysis; D: KEGG enrichment analysis; BP: biological process; CC: cellular component; MF: molecular function.

2.4 过表达 *Ptpn2* 对 SiO_2 诱导的 MH-S 细胞中 NLRP3 信号通路蛋白表达水平的影响 免疫荧光染色结果显示,与 NC 组比较,NS 组中 GSDMD 的表达增多;与 NS 组相比较,PS 组中 GSDMD 的表达减少。见图 6。

Western blot 结果显示,与 NC 组比较,NS 组中 NLRP3、GSDMD、Caspas-1、IL-1 β 的蛋白表达水平上调 (LSD- t =13.638、6.761、20.185、8.785, 均 $P < 0.05$);与 NS 组比较,PS 组中 NLRP3、GSDMD、Caspas-1、IL-1 β 的蛋白表达水平下调 (LSD- t =-9.363、

-4.924、-9.07、-10.586, 均 $P < 0.05$)。与 NC 组比较,P 组中 NLRP3、GSDMD、Caspas-1、IL-1 β 的蛋白表达水平无显著差异 (LSD- t =2.437、-1.374、1.522、1.731, 均 $P > 0.05$)。见图 7。

2.5 过表达 *Ptpn2* 对 SiO_2 诱导的 MH-S 细胞中 TGF- β 1 信号通路蛋白表达水平的影响 免疫荧光染色结果显示,与 NC 组比较,NS 组中 TGF- β 1 的表达增多;与 NS 组比较,PS 组中 TGF- β 1 的表达减少。见图 8。

Western blot 结果显示,与 NC 组比较,NS 组中

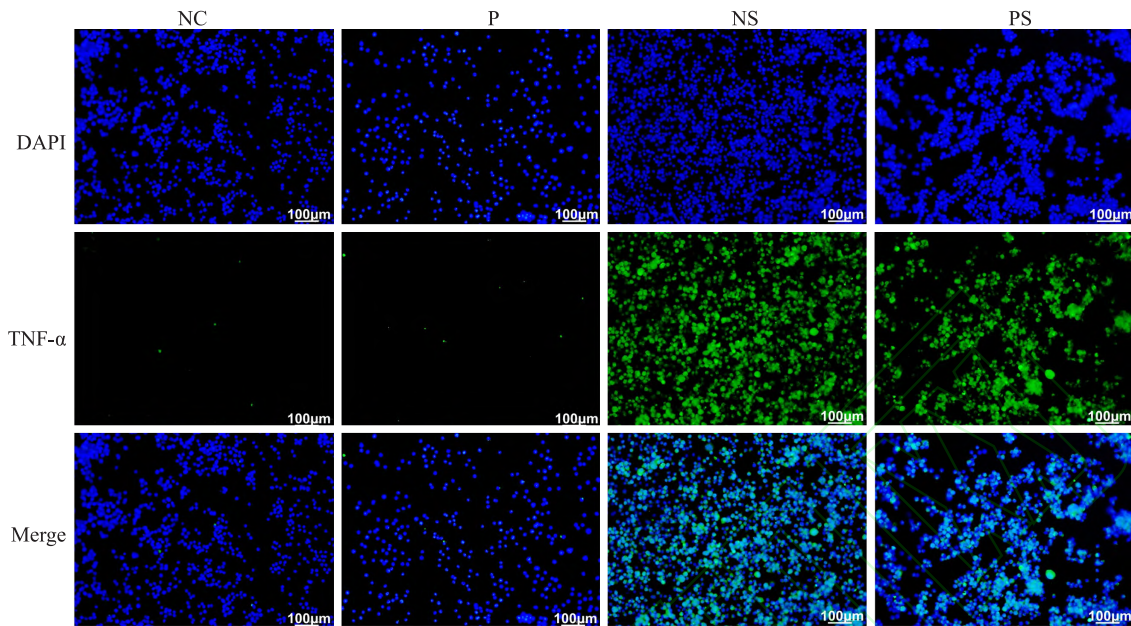


图4 MH-S细胞爬片 TNF-α免疫荧光染色图 ×200

Fig. 4 Immunofluorescence staining of TNF-α of MH-S cell climbing slices ×200

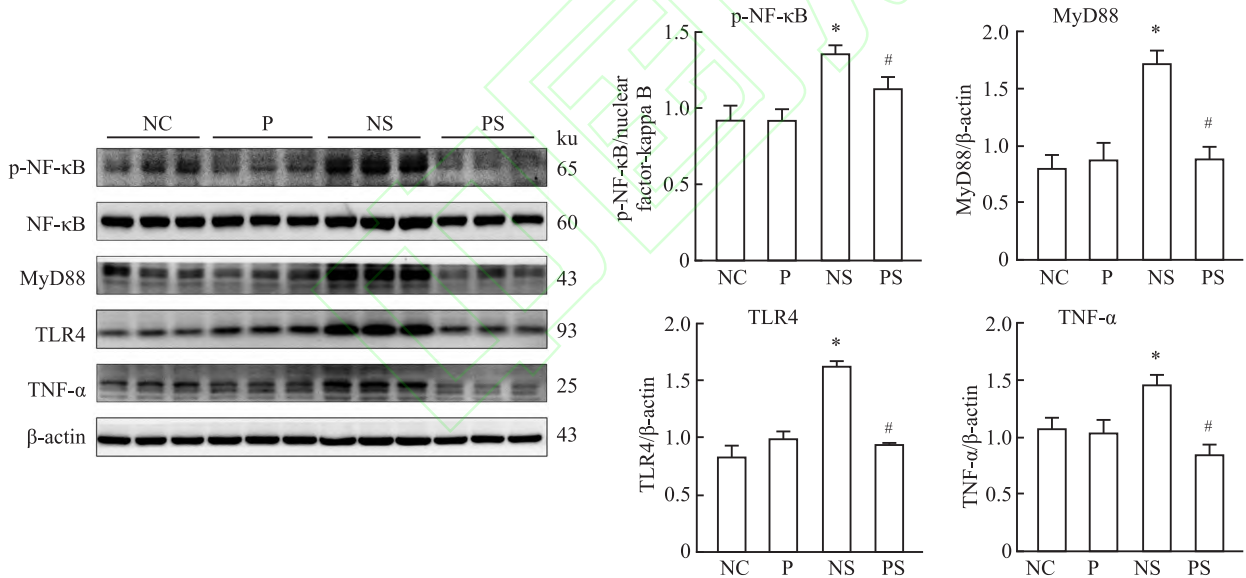


图5 过表达 *Ptpn2* 对 SiO_2 诱导的 MH-S 细胞中 TLR4-TNF-α 信号通路蛋白表达水平的影响

Fig. 5 The effects of the overexpression of *Ptpn2* on the expression levels of proteins in the TLR4-TNF-α signaling pathway in MH-S cells induced by SiO_2

* $P < 0.05$ vs NC group; # $P < 0.05$ vs NS group.

TGF-βR1、TGF-βR2、p-Smad2/3 的蛋白表达水平上调(LSD- $t=3.111$ 、 7.583 、 44.552 , 均 $P < 0.05$); 与 NS 组比较, PS 组中 TGF-βR1、TGF-βR2、p-Smad2/3 的蛋白表达水平下调(LSD- $t=-7.111$ 、 -6.705 、 -29.574 , 均 $P < 0.05$)。与 NC 组比较, P 组中 TGF-βR1、TGF-βR2、p-Smad2/3 的蛋白表达水平无显著差异(LSD- $t=-1.011$ 、 -0.671 、 -2.085 , $P > 0.05$)。见图9。

3 讨论

矽肺是我国危害最严重的职业病之一^[2]。发生在多种工作场所,例如采矿、冶金、汽车制造业和研磨玻璃、瓷器等传统行业。目前对于矽肺纤维化的治疗缺乏有效的手段和靶向药物。因此,探索矽肺病的发病机制和寻找潜在的治疗靶点具有重要意义。矽肺病发病机制复杂,研究^[8-9]多认为巨噬细

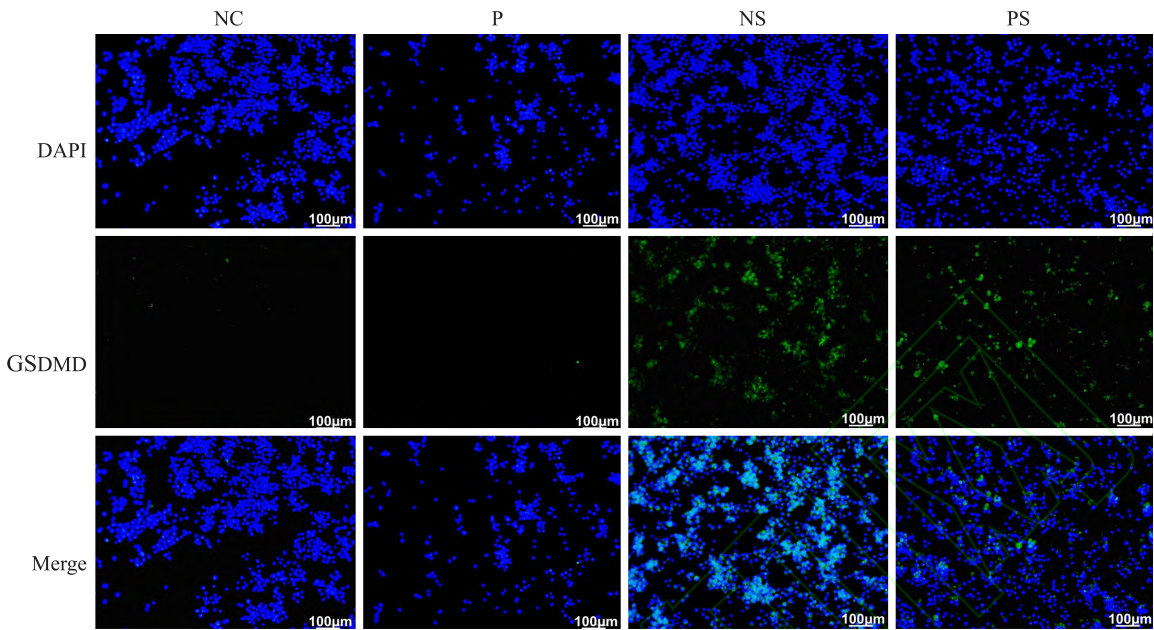


图6 MH-S细胞爬片GSDMD免疫荧光染色图 ×200
Fig. 6 Immunofluorescence staining of GSDMD of MH-S cell climbing slices ×200

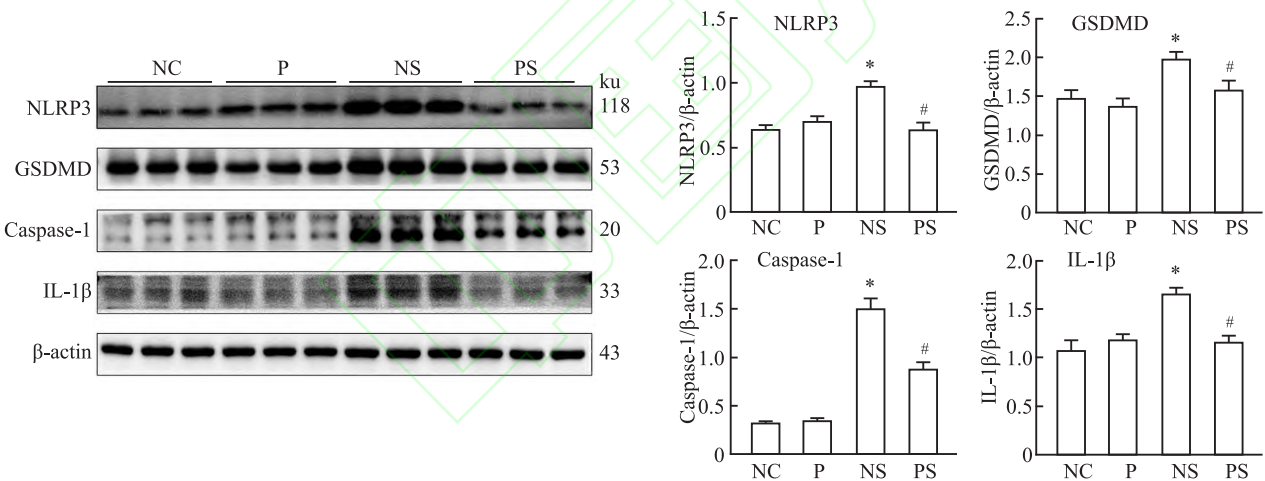


图7 过表达*Ptpn2*对SiO₂诱导的MH-S细胞中NLRP3信号通路蛋白表达水平的影响
Fig. 7 The effects of the overexpression of *Ptpn2* on the expression levels of proteins in the NLRP3 signaling pathway in MH-S cells induced by SiO₂

* $P < 0.05$ vs NC group; # $P < 0.05$ vs NS group.

胞吞噬SiO₂粉尘释放多种细胞因子,是矽肺纤维化发生、发展的首要环节。在矽肺纤维化形成过程中,肺泡巨噬细胞能够识别并吞噬可吸入的SiO₂粉尘,经过一系列反应发生自身死亡,死亡的肺泡巨噬细胞会释放一系列促炎症因子,增加肺部炎症反应^[8]。PTPN2作为炎症和免疫反应的重要调节因子,具有调节炎症反应的作用。PTPN2影响炎症免疫细胞内的功能,并通过多种信号通路调节促炎症因子的释放,以调节炎症反应的发生、进展和

消退^[3]。

TLR信号通路的激活是巨噬细胞启动炎症反应的核心机制,能够促进炎症因子释放,加剧炎症反应^[10]。TLR4通过MyD88依赖性通路激活NF-κB等转录因子,并释放TNF-α等促炎因子,在炎症反应中发挥关键作用^[10]。PTPN2作为一种在所有细胞类型中均有表达的蛋白酪氨酸磷酸酶,能够直接作用于TLR下游接头蛋白MyD88的关键酪氨酸位点,使其去磷酸化进而阻断MyD88与TRAF6的结合,抑制

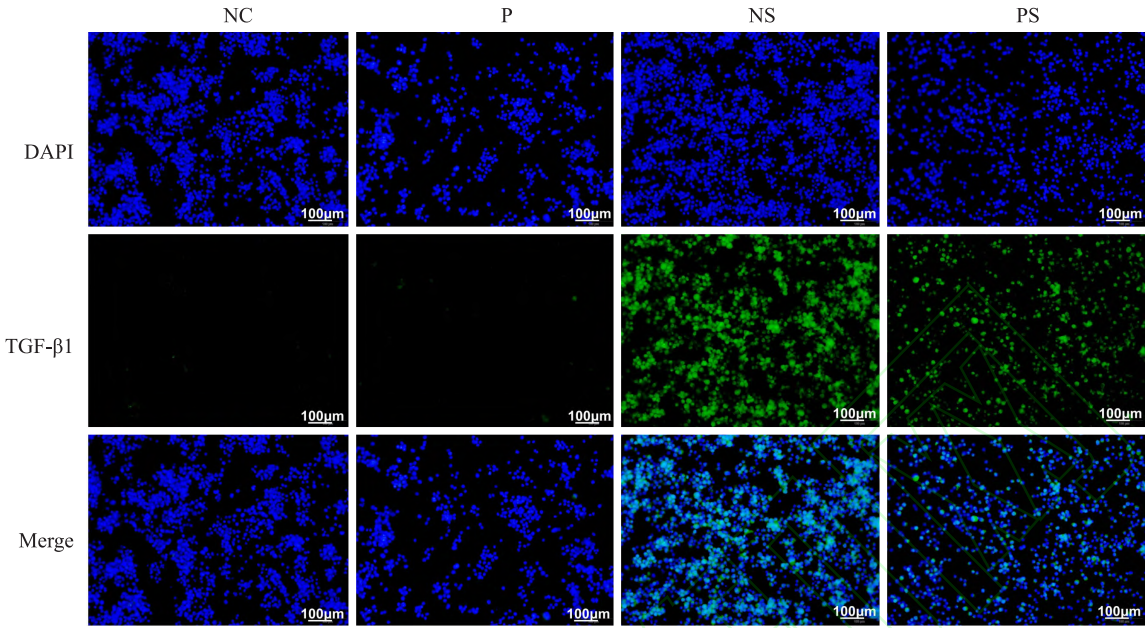


图8 MH-S细胞爬片TGF-β1免疫荧光染色图 ×200

Fig. 8 Immunofluorescence staining of TGF-β1 of MH-S cell climbing slices ×200

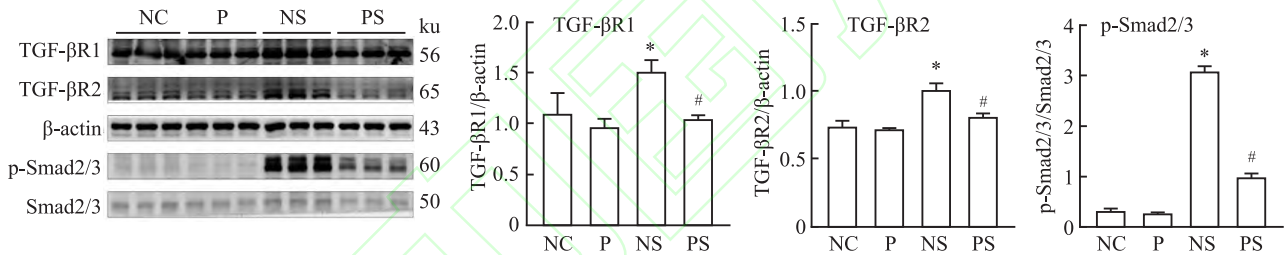


图9 过表达Ptpn2对SiO₂诱导的MH-S细胞中TGF-β1信号通路蛋白表达水平的影响

Fig. 9 The effects of the overexpression of Ptpn2 on the expression levels of proteins in the TGF-β1 signaling pathway in MH-S cells induced by SiO₂

*P < 0.05 vs NC group; #P < 0.05 vs NS group.

NF-κB 和 MAPK 通路的激活^[11]。NLRP3/Caspase-1 信号通路可通过调控促炎细胞因子 IL-1β 等的活性引发炎症反应,影响许多疾病的发生和进展^[12]。Caspase-1 作为 NLRP3 炎症小体的关键下游效应分子,激活后可增强 IL-1β 和 IL-18 的活性进一步加重炎症反应^[13]。此外,NLRP3 介导炎症小体复合物的组装并通过丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)和 NF-κB 信号通路进一步介导 MyD88 激活^[14]。同时,TNF-α 和 IL-1β 又可以协同激活 NF-κB,进一步募集炎症细胞^[15]。PTPN2 可通过去磷酸化 c-Jun 氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK),抑制甾醇调控元件结合蛋白(sterol regulatory element-binding Protein, SREBP) 2 的成熟,进而调节细胞凋亡相关斑点样蛋白(apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD,

ASC)4 的磷酸化,调节 NLRP3 炎症小体的激活^[16]。TGF-β 信号通路的过度激活导致肺部细胞外基质的过度沉积,是肺纤维化形成的重要机制^[17]。p-Smad2/3 作为信号传导的关键节点,可进入细胞核调控相关基因表达,从而促进细胞外基质的合成与沉积,导致肺组织纤维化^[18]。另外,TGF-β 通过激活 NF-κB 引发信号传导,诱导 NLRP3 炎症小体激活,并增加促炎细胞因子 IL-1β 的分泌^[19]。PTPN2 可通过与 Smad4 结合,并在 Tyr95 位置去磷酸化,以保留 Smad4 的 DNA 结合能力,进一步调控 TGF-β 信号传导^[20],从而调节炎症反应。以上研究提示 PTPN2 可以通过调控以上信号通路,调控巨噬细胞炎症反应。本研究结果也证实,SiO₂能够通过 TLR4-TNF-α 信号、NLRP3 信号和 TGF-β1 信号的异常激活,引发巨噬细胞炎症反应,过表达 Ptpn2 可抑制 SiO₂介导

的巨噬细胞TLR信号通路、NLRP3信号通路和TGF- β 1信号通路的激活,抑制巨噬细胞炎症反应,进而调控矽肺纤维化进程。

综上所述,过表达*Ptpn2*能够抑制SiO₂介导的巨噬细胞炎症相关TLR4-TNF- α 信号、NLRP3信号和TGF- β 1信号,进而发挥对矽肺纤维化的保护作用,为矽肺纤维化的靶向调控提供潜在靶点信息和实验证据。然而,本研究并未进一步探讨以上信号通路的协同作用,未来的研究将聚焦于靶向*Ptpn2*基因调控矽肺纤维化炎症反应的深层作用机制,并深入分析这些信号通路间的协同调控网络。

参考文献

- [1] Li T, Yang X, Xu H, et al. Early identification, accurate diagnosis, and treatment of silicosis [J]. *Can Respir J*, 2022, 2022: 3769134. doi: 10.1155/2022/3769134.
- [2] 国家卫生健康委员会规划发展与信息化司. 2023年我国卫生健康事业发展统计公报[J]. *中国病毒病杂志*, 2024, 14(5): 416-24. doi:10.16505/j.2095-0136.2024.0083.
- [2] Department of Planning, Development, Information Technology, National Health Commission of the People's Republic of China. Statistical bulletin of China's health development in 2023 [J]. *Chin J Viral Dis*, 2024, 14(5): 416-24. doi:10.16505/j.2095-0136.2024.0083
- [3] Song J, Lan J, Tang J, et al. PTPN2 in the immunity and tumor immunotherapy: a concise review [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(17): 10025. doi: 10.3390/ijms231710025.
- [4] Zhao X, Wang X, Xu Z, et al. PTPN2 dephosphorylates STAT3 to ameliorate anesthesia-induced cognitive decline in aged rats by altering the microglial phenotype and inhibiting inflammation [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2025, 1871(1): 167545. doi: 10.1016/j.bbadis.2024.167545.
- [5] Kim Y K, Kim Y R, Wells K L, et al. PTPN2 regulates metabolic flux to affect β -cell susceptibility to inflammatory stress [J]. *Diabetes*, 2024, 73(3): 434-47. doi: 10.2337/db23-0355.
- [6] Zhou Q, Wang Y, Cheng Y, et al. Ilexgenin A inhibits lipid accumulation in macrophages and reduces the progression of atherosclerosis through PTPN2/ERK1/2/ABCA1 signalling pathway [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*, 2024, 1869(7): 159533. doi: 10.1016/j.bbalip.2024.159533.
- [7] Zhu Y, Yao J, Duan Y, et al. Protein expression profile in rat silicosis model reveals upregulation of PTPN2 and its inhibitory effect on epithelial-mesenchymal transition by dephosphorylation of STAT3 [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(4): 1189. doi: 10.3390/ijms21041189.
- [8] 刘 艺, 李金城, 周昱慧, 等. MSR1对矽肺小鼠脂质蓄积和炎性因子分泌的影响研究[J]. *安徽医科大学学报*, 2023, 58(11): 1928-33. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.11.021.
- [8] Liu Y, Li J C, Zhou Y H, et al. The effect of MSR1 on the secretion of inflammatory factors and lipid accumulation in silicosis mice [J]. *Acta Univ Med Anhui*, 2023, 58(11): 1928-33. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.11.021.
- [9] 程鸿明, 何海兰, 王 袁, 等. 基于生物信息学分析筛选矽肺患者肺泡巨噬细胞中线粒体靶向标志物[J]. *安徽医科大学学报*, 2024, 59(10): 1828-34, 1841. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.10.019.
- [9] Cheng H M, He H L, Wang Y, et al. Screening of mitochondria-targeting markers in alveolar macrophages of silicosis patients based on bioinformatics analysis [J]. *Acta Univ Med Anhui*, 2024, 59(10): 1828-34, 1841. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.10.019.
- [10] Zhao L, Miao Y, Shan B, et al. Theabrownin isolated from Pu-erh tea enhances the innate immune and anti-inflammatory effects of RAW_{264.7} macrophages via the TLR2/4-mediated signaling pathway [J]. *Foods*, 2023, 12(7): 1468. doi: 10.3390/foods12071468.
- [11] Larabi A, Barnich N, Nguyen H T T. New insights into the interplay between autophagy, gut microbiota and inflammatory responses in IBD [J]. *Autophagy*, 2020, 16(1): 38-51. doi: 10.1080/15548627.2019.1635384.
- [12] Jia H, Liu Y, Guo D, et al. PM_{2.5}-induced pulmonary inflammation via activating of the NLRP3/caspase-1 signaling pathway [J]. *Environ Toxicol*, 2021, 36(3): 298-307. doi: 10.1002/tox.23035.
- [13] Radmehr E, Yazdanpanah N, Rezaei N. Non-coding RNAs affecting NLRP3 inflammasome pathway in diabetic cardiomyopathy: a comprehensive review of potential therapeutic options [J]. *J Transl Med*, 2025, 23(1): 249. doi: 10.1186/s12967-025-06269-w.
- [14] Root-Bernstein R. Innate receptor activation patterns involving TLR and NLR synergisms in COVID-19, ALI/ARDS and sepsis cytokine storms: a review and model making novel predictions and therapeutic suggestions [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(4): 2108. doi: 10.3390/ijms22042108.
- [15] Bakshi H A, Quinn G A, Nasef M M, et al. Crocin inhibits angiogenesis and metastasis in colon cancer via TNF- α /NF- κ B/VEGF pathways [J]. *Cells*, 2022, 11(9): 1502. doi: 10.3390/cells11091502.
- [16] Wang X, Wu F P, Huang Y R, et al. Matrine suppresses NLRP3 inflammasome activation via regulating PTPN2/JNK/SREBP2 pathway in sepsis [J]. *Phytomedicine*, 2023, 109: 154574. doi: 10.1016/j.phymed.2022.154574.
- [17] Hu B, Zhang X, Fan H, et al. FOXF1 reverses lung fibroblasts transdifferentiation via inhibiting TGF- β /SMAD2/3 pathway in silica-induced pulmonary fibrosis [J]. *Int Immunopharmacol*, 2024, 133: 112067. doi: 10.1016/j.intimp.2024.112067.
- [18] Zhao M, Wang M, Chen X, et al. Targeting progranulin alleviated silica particles-induced pulmonary inflammation and fibrosis via decreasing Il-6 and Tgf- β 1/Smad [J]. *J Hazard Mater*,

2024, 465: 133199. doi: 10.1016/j.jhazmat.2023.133199.

(5): 1329-38. doi: 10.1007/s11010-022-04369-5.

- [19] Kang H, Seo E, Oh Y S, et al. TGF- β activates NLRP3 inflammasome by an autocrine production of TGF- β in LX-2 human hepatic stellate cells[J]. *Mol Cell Biochem*, 2022, 477

- [20] Shi S, Xu D, Gu S, et al. Protein tyrosine phosphatase PTPN2 regulates TGF- β signaling through Smad4 dephosphorylation[J]. *Am J Cancer Res*, 2022, 12(12): 5516-31.

Investigation of the regulatory effect of overexpressed *Ptpn2* on SiO₂-mediated mouse alveolar macrophages based on iTRAQ technology

Wei Yi^{1,2}, Li Yaqian^{1,2,3}, Li Xinjie¹, Feng Mengfei^{1,2}, Jin Fuyu^{1,2}, Xu Hong^{1,2,4}, Zhu Ying^{1,2}

(¹*School of Public Health*, ³*School of Traditional Chinese Medicine*, ⁴*Health Science Center*, North China University of Science and Technology, Tangshan 063210; ²*Hebei Key Laboratory of Organ Fibrosis*, Tangshan 063210)

Abstract Objective To investigate the regulatory effect of overexpressed protein tyrosine phosphatase non-receptor type 2 (*Ptpn2*) on the inflammatory response of mouse alveolar macrophages (MH-S) induced by SiO₂. **Methods** Cells with overexpressed *Ptpn2* were constructed and induced by SiO₂. The experimental groups were divided into four groups: the negative control group with an empty vector (NC), the overexpressed *Ptpn2* group (P), the negative control group with an empty vector + SiO₂ induction (NS), and the overexpressed *Ptpn2* + SiO₂ induction group (PS). Isobaric tags for relative and absolute quantification (iTRAQ) combined with liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) were used to screen differential proteins, followed by Gene Ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) database analyses. Immunofluorescence staining was used to detect the expressions of Tumor necrosis factor (TNF) α , Gasdermin D (GSDMD), and Transforming growth factor (TGF)- β 1. Western blot was used to detect the protein expression levels of PTPN2, Toll-like receptor 4 (TLR4), tumor necrosis factor- α (TNF- α), nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein 3 (NLRP3), and proteins related to the TGF- β 1 signaling pathway in the cells of each group. **Results** iTRAQ results identified 144 differential proteins among the four groups. GO analysis showed that in biological processes (BP), these differential proteins were mainly enriched in I κ B kinase/nuclear factor- κ B (NF- κ B) signaling, cell activation and signal transduction involved in immune responses, and regulation of receptor signaling pathways by signal transducer and activator of transcription (STAT), etc. KEGG analysis revealed that the differential proteins were mainly enriched in Toll-like receptor signaling pathway, NF- κ B signaling pathway, NOD-like receptor signaling pathway, TGF- β signaling pathway, and TNF signaling pathway. The results of immunofluorescence staining showed that compared with the NC group, the expressions of TNF α , GSDMD, and TGF- β 1 in the cells of the NS group increased ($P < 0.05$); Compared to the NS group, the expression of the aforementioned proteins in the PS group decreased in cellular proteins ($P < 0.05$). The results of Western blot showed that compared with the NC group, the protein expression levels of PTPN2, p-NF- κ B, MyD88, TLR4, NLRP3, GSDMD, Caspase-1, IL-1 β , TGF- β R1, TGF- β R2, p-Smad2/3 in the NS group were significantly upregulated ($P < 0.05$); Compared with the NS group, the expression levels of the aforementioned proteins in the PS group were significantly downregulated ($P < 0.05$). **Conclusion** Overexpression of *Ptpn2* can inhibit the protein expressions of TLR4-TNF- α signaling, NLRP3 signaling, and TGF- β 1 signaling closely related to inflammatory response in SiO₂-mediated MH-S macrophages.

Key words protein tyrosine phosphatase non-receptor type 2; macrophage; inflammation; gasdermin D; tumor necrosis factor- α

Fund programs National Natural Science Foundation of China (No. 82473607); Natural Science Foundation of Hebei Province (No. H2021209049); Science Research Project of Hebei Education Department (No. QN2025407); Higher Education Science Research Project of Hebei Province (No. JJC2024032)

Corresponding author Zhu Ying, E-mail: zhuying@ncst.edu.cn