

薤白超细粉调控上皮细胞铁死亡对肺纤维化的影响及其机制研究

邵宁宁¹, 祝金超², 洪锐文¹, 曹添淞¹, 杜泊源¹, 朱嘉霖¹, 赵文杰¹, 彭守春^{3*}, 董津睿^{1,2*}

¹天津大学医学院, 天津 300072; ²医学救援关键技术装备应急管理部重点实验室/天津大学卫生应急学院, 天津 300072; ³天津大学津南医院呼吸与重症医学科, 天津 300350

[中图分类号] R563 [文献标志码] A [DOI] 10.11855/j.issn.0577-7402.2017.2026.0331

[声明] 本文所有作者声明无利益冲突

[引用本文] 邵宁宁, 祝金超, 洪锐文等. 薤白超细粉调控上皮细胞铁死亡对肺纤维化的影响及其机制研究[J]. 解放军医学杂志, DOI: 10.11855/j.issn.0577-7402.2017.2026.0331.

[收稿日期] 2025-09-25 [录用日期] 2026-01-06 [上线日期] 2026-03-31

[摘要] **目的** 探究薤白超细粉(UXP)抑制肺纤维化及与上皮细胞铁死亡相关的调控机制。**方法** (1)网络药理学预测薤白四种主要活性成分的潜在作用靶点及信号通路。(2)将人支气管上皮细胞(Beas-2b)分为对照组、博来霉素(BLM)组、BLM+1 mg/ml UXP(UXP-L)组、BLM+5 mg/ml UXP(UXP-H)组和BLM+1 μmol/L 尼达尼布(NIN)组。除对照组外, 各组细胞采用BLM(10 μg/ml)处理建立肺纤维化细胞模型。检测各组细胞活性、凋亡水平、活性氧(ROS)、线粒体功能、脂质过氧化和铁死亡指标。(3)将共培养的Beas-2b细胞和人成纤维细胞 HLF-1 随机分为对照组、BLM组、BLM+1 mg/ml UXP(UXP-L)组、BLM+5 mg/ml UXP(UXP-H)组和BLM+1 μmol/L NIN组。除对照组外, 各组细胞采用BLM(10 μg/ml)处理建立肺纤维化细胞模型。免疫荧光染色检测 HLF-1 细胞中I型胶原蛋白α1链(COL1A1)、α-平滑肌肌动蛋白(ACTA2)表达水平。(4)将C57BL/6小鼠随机分为对照组、BLM组、BLM+UXP-L组、BLM+UXP-H组和BLM+NIN组, 每组8只。除对照组外, 各组小鼠经气管滴注BLM(0.5 mg/ml)建立肺纤维化模型; 建模后7—20天, 分别每天给予UXP-L(100 mg/kg)、UXP-H(500 mg/kg)或NIN(50 mg/kg)灌胃, 对照组与BLM组灌胃等量生理盐水。测定小鼠肺指数、肺组织湿/干重比(W/D)、Masson染色和天狼星红染色评估肺水肿及病理改变; 检测超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、谷胱甘肽(GSH)、羟脯氨酸含量; RT-qPCR检测相关纤维化因子mRNA表达, Western blotting分析相关蛋白表达水平; 透射电镜观察线粒体超微结构变化。**结果** (1)薤白主要活性成分与肺纤维化有交集靶点基因240个。(2)与对照组比较, BLM组细胞活力、线粒体膜电位明显降低($P<0.05$), 而细胞凋亡率、ROS水平、脂质过氧化物及 Fe^{2+} 含量均明显升高($P<0.001$)。与BLM组比较, BLM+UXP-L组、BLM+UXP-H组及BLM+NIN组细胞活力、线粒体膜电位明显增高($P<0.001$), 细胞凋亡率、ROS水平、脂质过氧化物及 Fe^{2+} 含量明显降低($P<0.001$)。(3)与对照组比较, 与Beas-2b共培养的BLM组 HLF-1 细胞中ACTA2和COL1A1水平均明显增高($P<0.001$); 与BLM组比较, BLM+UXP-L组、BLM+UXP-H组及BLM+NIN组 HLF-1 细胞中ACTA2和COL1A1水平明显降低($P<0.001$)。(4)与对照组比较, BLM组小鼠肺指数、W/D、羟脯氨酸及MDA含量, 纤维化相关及促铁死亡基因(ACTA2、COL1A1、COL1A2、Fn、Acsl4、Ncoa4)和ACTA2、COL3A1、p-ERK蛋白表达水平明显升高($P<0.05$ 、 $P<0.01$ 或 $P<0.001$), 而SOD与GSH活性、抗铁死亡基因Gpx4和Slc7a11表达水平明显降低($P<0.001$); 肺组织中可见明显的胶原沉积、铁沉积及线粒体超微结构损伤。与BLM组比较, BLM+UXP-L组、BLM+UXP-H组及BLM+NIN组小鼠肺指数、W/D、羟脯氨酸和MDA含量、ACTA2、COL1A1、COL1A2、Fn、Acsl4、Ncoa4及ACTA2、COL3A1、p-ERK蛋白表达水平明显降低($P<0.01$ 或 $P<0.001$), SOD与GSH活性、Gpx4、Slc7a11表达水平明显增高($P<0.05$ 或 $P<0.001$); 肺组织中胶原沉积、铁沉积及线粒体超微结构损伤减轻。**结论** UXP可能通过调控氧化应激、脂质过氧化和铁死亡通路抑制肺纤维化。

[关键词] 薤白超细粉; 肺纤维化; 胶原沉积; 氧化应激; 线粒体保护; 铁死亡

[基金项目] 国家自然科学基金(82200655); 国家应急管理部重点实验室自主创新基金(YJBZZJTJU202403); 天津市自然科学基金(23JCYBJC01560)

[作者简介] 邵宁宁, 硕士研究生, 主要从事器官损伤修复机制和新药研发方面的研究

[通信作者] 董津睿, E-mail: jinrui_dong@tju.edu.cn; 彭守春, E-mail: Pengshouchun@163.com

Ultrafine Xiabai powder inhibites pulmonary fibrosis through regulating ferroptosis and the underlying mechanism

Shao Ning-Ning¹, Zhu Jin-Chao, Hong Kai-Wen¹, Cao Tian-Song¹, Du Bo-Yuan¹, Zhu Jia-Lin¹, Zhao Wen-Jie¹, Peng Shou-Chun^{*}, Dong Jin-Rui^{1*}

¹School of Medicine, Tianjin University, Tianjin 300072, China

²Key Laboratory of Key Technology and Equipment of the Ministry of Emergency/Management of Medical Rescue School of Disaster and Emergency Medicine, Tianjin University, Tianjin 300072, China

³Department of Respiratory and Critical Care Medicine, Tianjin University Jinnan Hospital, Tianjin 300350, China

*Corresponding author, Dong Jin-Rui, E-mail: jinrui_dong@tju.edu.cn; Peng Shou-Chun, E-mail: Pengshouchun@163.com

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (82200655), the Independent Innovation Fund of Key Laboratory of Ministry of Emergency Management of China (YJBZZJJTU202403), and the Natural Science Foundation of Tianjin (23JCYBJC01560)

[Abstract] Objective To investigate the inhibitory effects of ultra-fine powder of Ultrafine Xiebai Powder (UXP) on pulmonary fibrosis and to elucidate its regulatory mechanisms associated with epithelial cell ferroptosis. **Methods** (1) Network pharmacology analysis was performed to predict the potential targets and signaling pathways of four major active components of UXP. (2) Human bronchial epithelial cells (Beas-2b) were assigned to control, bleomycin (BLM), BLM+1 mg/mL UXP (UXP-L), BLM+5 mg/mL UXP (UXP-H), and BLM+1 μmol/L nintedanib (NIN) groups. Except for the control group, cells were treated with BLM (10 μg/ml) to establish an *in vitro* pulmonary fibrosis model. Cell viability, apoptosis, reactive oxygen species (ROS), mitochondrial function, lipid peroxidation, and ferroptosis-related indicators were assessed. (3) Co-cultured Beas-2b cells and human lung fibroblasts (HLF-1) were similarly divided into the above groups and treated with BLM (10 μg/ml) to establish a fibrosis model. Immunofluorescence staining was used to evaluate the expression of collagen type I alpha 1 chain (COL1A1) and α-smooth muscle actin (ACTA2) in HLF-1 cells. (4) C57BL/6 mice were randomly divided into control, BLM, BLM+UXP-L, BLM+UXP-H, and BLM + NIN groups (n = 8 per group). Except for the control group, mice received intratracheal instillation of BLM (0.5 mg/mL) to induce pulmonary fibrosis. From day 7 to day 20 post-modeling, mice were administered UXP-L (100 mg/kg), UXP-H (500 mg/kg), or NIN (50 mg/kg) daily by gavage, while control and BLM groups received equal volumes of saline. Lung index and wet-to-dry weight ratio (W/D) were measured; Masson's trichrome and Sirius Red staining were performed to assess pulmonary edema and histopathological alterations. Levels of superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA), glutathione (GSH), and hydroxyproline were determined. RT-qPCR was conducted to quantify fibrosis-related mRNA expression, and Western blotting was used to analyze protein expression. Transmission electron microscopy was employed to observe mitochondrial ultrastructural changes. **Results** (1) A total of 240 overlapping target genes were identified between the major active components of UXP and pulmonary fibrosis. (2) Compared with control group, BLM group exhibited significantly decreased cell viability and mitochondrial membrane potential ($P < 0.05$), along with markedly increased apoptosis rate, ROS levels, lipid peroxidation, and Fe²⁺ content ($P < 0.001$). Compared with BLM group, treatment with UXP-L, UXP-H, or NIN significantly restored cell viability and mitochondrial membrane potential ($P < 0.001$), while reducing apoptosis, ROS production, lipid peroxidation, and Fe²⁺ levels ($P < 0.001$). (3) In co-culture experiments, ACTA2 and COL1A1 expression in HLF-1 cells were significantly elevated in BLM group compared with control group ($P < 0.001$), whereas these levels were markedly reduced in UXP-L, UXP-H, and NIN groups ($P < 0.001$). (4) *In vivo*, compared with control group, BLM-treated mice showed significant increases in lung index, W/D ratio, hydroxyproline and MDA levels, as well as fibrosis-related and pro-ferroptotic gene (*ACTA2*, *COL1A1*, *COL1A2*, *Fn*, *Acs14*, *Ncoa4*) expression and ACTA2, COL3A1, p-ERK protein levels ($P < 0.001$). In contrast, SOD and GSH activity and anti-ferroptotic gene *Gpx4*, *Slc7a11* expression were significantly decreased ($P < 0.001$). Histologically, pronounced collagen deposition, iron accumulation, and mitochondrial ultrastructural damage were observed. Compared with BLM group, UXP-L, UXP-H, and NIN treatments significantly reduced lung index, W/D ratio, hydroxyproline and MDA levels, as well as expression of *ACTA2*, *COL1A1*, *COL1A2*, *Fn*, *Acs14*, *Ncoa4*, and ACTA2, COL3A1, p-ERK protein ($P < 0.01$ or $P < 0.001$), while increasing SOD and GSH activity and expression of *Gpx4* and *Slc7a11* ($P < 0.05$ or $P < 0.001$). Collagen deposition, iron accumulation, and mitochondrial damage were also alleviated. **Conclusion** UXP could exert anti-fibrotic effects by modulating oxidative stress, lipid peroxidation, and ferroptosis-related pathways, thereby attenuating pulmonary fibrosis.

[Key words] ultrafine Xiebai powder; pulmonary fibrosis; collagen deposition; oxidative stress; mitochondrial protection; ferroptosis

肺纤维化是以肺组织进行性瘢痕化、肺泡结构破坏和呼吸功能不可逆下降为特征的严重慢性疾

病^[1]；吡非尼酮与尼达尼布等抗纤维化药物疗效有限^[2]，探索新的干预手段并深入解析其作用机制具

有重要意义。铁死亡是一种新型调控性细胞死亡方式,由铁离子依赖的脂质过氧化积累驱动氧化应激,是上皮细胞损伤和纤维化进展的重要机制^[3],在肺纤维化的发生发展中可能发挥核心作用^[4-5]。铁死亡可通过铁稳态破坏、脂质过氧化与氧化应激正反馈共同驱动上皮损伤及纤维化进展,这一过程可能构成肺纤维化新的病理环节和干预靶点。

天然产物被认为具有干预铁稳态、脂质过氧化及抗铁死亡等关键生物过程的潜力^[6]。薤白(*Allium macrostemon*, Xiebai)为食药同源葱属药材,其相关活性成分具有抗炎、抗氧化及心肺保护等多重药理作用^[7-8];其可否通过“抑制上皮铁死亡”从源头缓解肺纤维化,仍缺乏系统的实验证据。从药物制剂角度看,超细粉碎技术通过显著增大比表面积与孔隙度、改善溶出性与口服可及性,可提高活性成分暴露量与批次一致性,为复杂天然产物制剂的稳定递送提供可行路径^[9];目前尚缺乏针对“人支气管上皮-铁死亡-纤维化”这一关键轴线,结合标准化薤白超细粉(*ultrafine Xiebai Powder*, UXP)进行跨层级验证的系统研究。

鉴于肺上皮细胞铁死亡在肺纤维化中的关键作用,我们假设:UXP可通过抑制上皮细胞铁死亡,减轻氧化应激和脂质过氧化,降低上皮细胞对铁死亡的易感性,削弱促纤维化信号的旁分泌放大效应,进而减少胶原沉积并改善肺纤维化。为验证这一假设,本研究通过网络药理学筛选潜在靶点和通路,在肺上皮细胞损伤模型和小鼠肺纤维化模型中验证,旨在为天然药物干预肺纤维化提供理论基础与实验证据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

1.1.1 主要试剂 UXP(HH44DL302,海南万代兰生物医药科技有限公司);尼达尼布(S1010,美国 Selleck 公司);Liperfluo 染料、FerroOrange 染料(L248、F374,日本同仁化学研究所);增强化学发光(ECL)底物试剂盒(BL520A,陕西白鲨生物科技有限公司);Gluta 固定液(电镜专用,2.5%)(P1126),马松染色(G1346)、天狼星红染色(S8060-5)、普鲁士蓝染色(G1428)、二喹啉甲酸(BCA)蛋白浓度测定(PC0020)、谷胱甘肽(GSH)含量测定(BC1170)、丙二醛(MDA)含量检测(BC1040)、超氧化物歧化酶(SOD)含量测定(BC0170)、羟脯氨酸(hydroxyproline, HYP)含量测定(BC0255)、CCK-8 细胞增殖及毒性检测(CA1210)、膜联蛋白 V(Annexin V)FITC 和碘化丙啶(PI)细胞凋亡检测(CA1020)试剂盒,蛋白磷酸酶抑制剂混合物(P1260),兔抗 I 型胶原蛋白 $\alpha 1$ 链

(collagen type I alpha 1 chain, COL1A1; K002759P)、 α -平滑肌肌动蛋白(alpha-smooth muscle actin, ACTA2; K002759P)多克隆抗体,DAPI(C0060)均购自北京索莱宝科技有限公司;RNAeasy™动物 RNA 抽提试剂盒(离心柱式)(R0027),BeyoRT™ III cDNA 合成预混液(5×)(with gDNA EZeraser)、SYBR Green qPCR Mix(2×)均购自上海碧云天生物科技股份有限公司;兔抗 III 型胶原蛋白 $\alpha 1$ 链(COL3A1; AB184993)、ACTA2(AB124964)单克隆抗体, Alexa Fluor 488 标记的山羊抗兔 IgG (H+L) 多克隆抗体(ab150077)购自英国 Abcam 公司;兔抗细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK; #4695)、磷酸化 ERK(p-ERK; #4370)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH; #2118)单克隆抗体,辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔 IgG 多克隆抗体(#7074)均购自美国 Cell Signaling Technology 公司。

1.1.2 仪器 显微镜、Ti2-U 倒置荧光显微镜(日本尼康公司);透射电显微镜(美国赛默飞世尔科技公司);实时荧光定量 PCR 仪、Western blotting 蛋白电泳仪、Western blotting 半干转仪(1704150J1)均购自美国 Bio-rad 公司;化学发光成像仪(北京德泉兴业商贸有限公司);GL2415R 型离心机(苏州莫纳生物科技有限公司);RM2016 组织切片机(上海徕卡仪器有限公司)。

1.2 薤白主要活性成分的潜在作用靶点及信号通路的网络药理学分析

1.2.1 薤白活性成分筛选与靶点预测 采用药物靶点预测工具瑞士靶标预测数据库(SwissTargetPrediction, <http://www.swisstargetprediction.ch/>)、STITCH 化学物质相互作用检索系统(STITCH, <http://stitch.embl.de/>)对薤白四种主要活性成分大蒜素(Allicin)、蒜氨酸(Alliin)、S-烯丙基半胱氨酸(S-allylcysteine, SAC)和 S-烯丙基-L-半胱氨酸(S-allyl-L-cysteine, GSAC)^[7]进行靶点预测。SwissTargetPrediction 采用 2D/3D 相似度模型返回潜在蛋白靶点,保留 ≥ 0.1 或 0.2 的条目;STITCH 采用化合物-蛋白相互作用的综合评分,保留综合评分 ≥ 700 (高置信)的条目;合并两数据库结果后进行去重与 ID 规范化,使用 UniProt 知识库(UniProtKB, <https://www.uniprot.org/>)进行一对一映射。最后获得每种化合物的潜在靶点,并将其与肺纤维化相关靶点进行交集分析,选出可能的治疗靶点。

1.2.2 蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络构建 将候选治疗靶点输入 STRING 数据库(<https://string-db.org/>, 版本 v12.5),物种限定为人类,证据信源(experiments、databases、co-expression、text-mining、gene fusion、neighborhood)均启用。采用最小交互置

信度 阈值=0.4 (medium confidence) 作为主分析的网络构建标准, 其中0.4是STRING官方定义的“中等置信”界值, 可在初筛阶段尽量保留潜在功能模块, 从而减少假阴性的可能; 采用Cytoscape软件(版本3.10.3)对PPI网络进行可视化, 以识别关键的蛋白质节点和潜在的治疗靶标。

1.2.3 靶点基因的基因本体(Gene Ontology, GO)和京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)富集分析 为探讨相关靶点的生物学功能, 采用DAVID数据库(the Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery, <https://david.ncifcrf.gov/>)进行GO和KEGG通路富集分析。GO分析涵盖细胞组分、分子功能和生物过程等方面的功能注释, 有助于理解靶点在细胞内的作用。KEGG通路分析揭示这些靶点参与的主要生物通路, 特别是与肺纤维化相关的。均设定统计显著性水平为 $P < 0.05$ 。绘制条形图、气泡图可视化展示富集结果, 以揭示薤白活性成分调控肺纤维化的潜在生物学功能与信号通路。

1.3 体外细胞实验

1.3.1 细胞培养与分组 人支气管上皮细胞Beas-2b和人成纤维细胞HLF-1均由中科院上海细胞库提供, 在含有10%胎牛血清和1%青霉素-链霉素的DMEM培养基中, 37℃、5%CO₂培养。取对数生长期细胞进行实验。将细胞随机分为对照组、BLM组、BLM+1 mg/ml UXP(UXP-L)组、BLM+5 mg/ml UXP(UXP-H)组、BLM+1 μmol/L尼达尼布(NIN)组。除对照组外, 各组细胞采用10 μg/ml BLM处理24 h建立肺纤维化细胞模型; UXP或尼达尼布同时加入处理24 h。

1.3.2 CCK-8法检测细胞活力 将Beas-2b细胞以5000个/孔的密度接种于96孔板中, 刺激干预24 h后每孔加入10 μl CCK-8, 90 μl无血清的DMEM培养基, 37℃孵育4 h后, 采用酶标仪检测450 nm处的吸光度值, 计算细胞活力。

1.3.3 流式细胞分析细胞凋亡情况 采用细胞凋亡检测试剂盒(含Annexin V FITC和PI)进行染色; Liperfluo染料检测脂质过氧化情况; FerroOrange检测细胞Fe²⁺水平。随后使用贝克曼流式细胞仪进行定量分析, 并通过CytExpert软件处理数据: 初始细胞群的预设前向散射(FSC)/侧向散射(SSC)门控条件为10 000个事件。排除碎片(SSC-A与FSC-A)和双峰(FSC-H与FSC-A)后, 将所有染色的阳性与阴性染色区域的边界设定为10⁴。

1.3.4 细胞ROS检测 将Beas-2b细胞接种于24孔板(每孔6×10³个细胞)。在刺激干预24 h后, 用磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤细胞, 加入10 μmol/L 2',7'-二氯二

氢荧光素二乙酸酯(DCFDA)溶液(S0033, 上海碧云天), 于37℃避光孵育45 min, 随后按说明书要求用稀释缓冲液冲洗。使用荧光显微镜配合进行观察。

1.3.5 线粒体膜电位检测 将Beas-2b细胞接种于24孔板(每孔6×10³个细胞)。在刺激干预24 h后, 用PBS洗涤细胞, 加入200 nmol/L的Mitotracker染色液, 于37℃避光孵育45 min, 按说明书要求用稀释缓冲液冲洗。使用荧光显微镜进行观察。

1.4 Beas-2b细胞和人成纤维细胞HLF-1的共培养实验

1.4.1 细胞共培养 采用Transwell系统以实现旁分泌相互作用而避免细胞混合, 插入膜孔径0.4 μm, 24孔板格式。先在下腔以每孔5×10⁴个细胞接种人成纤维细胞HLF-1, 贴壁稳定24 h后在上腔插入膜上接种Beas-2b细胞(密度5×10⁴个/孔)。将细胞分为对照组、BLM组、BLM+1 mg/ml UXP(UXP-L)组、BLM+5 mg/ml UXP(UXP-H)组、BLM+1 μmol/L尼达尼布(NIN)组。除对照组外, 各组细胞采用10 μg/ml BLM处理24 h建立肺纤维化细胞模型; UXP、尼达尼布分别与BLM同时加入处理24 h。

1.4.2 免疫荧光染色检测HLF-1细胞中COL1A1、ACTA2蛋白表达水平 10 μg/ml BLM加入24孔板小室中处理Beas-2b细胞48 h, 对下腔HLF-1细胞进行免疫荧光染色。24孔板每孔加入200 μl 4%多聚甲醛溶液固定HLF-1细胞20 min; 每孔加入200 μl 0.1% Triton室温放置30 min。5% BSA封闭1 h。对照组加入1% BSA, 其余每孔加入200 μl 1% BSA稀释的COL1A1、ACTA2一抗(1:100), 4℃避光孵育过夜。对照组加入1% BSA, 其余每孔加入200 μl 1% BSA稀释的二抗(Alexa Fluor 488标记的山羊抗兔IgG)(1:200), 室温避光孵育1 h。每孔加入200 μl 1×PBS稀释的DAPI(1:1000), 室温避光孵育10 min。显微镜下成像。

1.5 小鼠动物模型实验

1.5.1 小鼠分组及BLM模型的建立 将40只雄性C57BL/6N小鼠按随机数表法分为对照组、模型组(BLM组)、BLM+UXP低剂量组(BLM+UXP-L组)、BLM+UXP高剂量组(BLM+UXP-H组)及BLM+尼达尼布组(BLM+NIN组), 每组8只。除对照组外, 各组均经气管滴注0.5 mg/ml BLM诱导肺纤维化。于造模后第7天开始, BLM+UXP-L组和BLM+UXP-H组分别灌胃UXP(100 mg/kg、500 mg/kg), BLM+NIN组灌胃50 mg/kg尼达尼布; 均连续给药2周, 隔日一次。对照组与BLM组同期灌胃等体积生理盐水。本研究动物实验获天津大学实验动物中心动物伦理委员会审批(TJUE2025-A-S-022)。

美国胸科协会(American Thoracic Society, ATS)

将小鼠BLM模型概括为“第0~7 d为急性损伤期,第3~14 d为纤维增生期,第14~28 d为既往/稳定纤维化期”^[10]。为避免早期强炎症对药效判读的混杂,更贴近临床“既往损伤基础上的治疗”情境,本研究自建模第7 d启动干预,连续给药14 d,主要终点评估设于第21 d,以覆盖稳定的胶原沉积与结构重塑窗口。该设定与Moeller等^[11]“≤7 d为预防性、7~10 d为治疗性”的界定及其对急性炎症约持续至第8 d的观察一致;亦与Izbicki等^[12]将第14 d视为可靠的早期纤维化评估时点且HYP在第14~21 d显著升高相符;同时与Ravanetti等^[13]“第14 d纤维化出现、第21 d达峰”及Hübner等^[14]“第14~21 d纤维化最为显著”的报道吻合。

1.5.2 小鼠肺组织取材及病理观察 实验结束后,小鼠称重后异氟烷麻醉,眼球取血,暴露并取出肺。称取整肺和肺右前叶重量,后续烘干(60 ℃, 48 h)。肺右中叶用4 ℃预冷的TEM组织固定液固定、保存。左叶肺采用多聚甲醛固定,石蜡包埋,制备5 μm厚切片,分别按照试剂盒说明进行马松染色、天狼星红染色和普鲁士蓝染色,中性树胶封片,倒置荧光显微镜下观察肺病理改变。剩余肺组织于-80 ℃冷冻保存,以备进行分子生物学分析。血液样本12 000 rpm/min、4 ℃离心10 min,分离血清并保存于-80 ℃,供后续分子生物学研究。

1.5.3 小鼠肺组织肺指数和湿/干重比值(wet weight/dry weight ratio, W/D)评估 肺指数=整肺重量/小鼠体重; W/D=右前叶湿肺重量/右前叶干肺重量。

1.5.4 透射电镜观察肺组织线粒体变化 1%锇酸溶液固定样品1~2 h;用梯度浓度(30%、50%、70%、80%、90%、95%)的乙醇溶液对样品脱水处理,每种浓度15 min,100%乙醇处理20 min;最后过渡到纯丙酮处理20 min。包埋、切片,切片厚度70~90 nm,经柠檬酸铅溶液和醋酸双氧铀50%乙醇饱和溶液各染色5~10 min,晾干后在透射电镜中观察。

1.5.5 小鼠血清SOD、MDA、GSH、HYP水平测定 小鼠血清样本按照SOD、MDA、GSH、HYP含量检测试剂盒的说明书进行测定。

1.5.6 反转录实时定量PCR(RT-qPCR)检测小鼠肺组织肺纤维化相关mRNA水平 取小鼠肺组织20 mg,提取总RNA并测定其浓度,利用cDNA合成预混液进行反转录,使用SYBR荧光探针进行RT-qPCR实验。反应总体系20 μl,包括10 μl SYBR,上、下游引物和cDNA模版各2 μl,4 μl 无菌无酶水。反应条件根据SYBR说明书设置为40个循环的三步法。以GAPDH为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算*Col1a1*、*Col1a2*、纤维连接蛋白(Fibronectin, *Fn*)、谷胱甘肽过氧化物酶4(Glutathione peroxidase 4, *Gpx4*)、长链

脂酰辅酶A合成酶4(*Acyl-CoA synthetase long-chain family member 4, Acs14*)、溶质载体家族7成员11/半胱氨酸-谷氨酸反向转运体轻链(*Slc7a11*)、核受体共激活因子4(*Ncoa4*)的mRNA相对表达水平。引物序列见附表1。

1.5.7 Western blotting检测小鼠肺组织肺纤维化相关蛋白表达水平 使用RIPA裂解液和苯甲基磺酰氟(100:1混合)裂解小鼠主动脉样本,采用BCA法定量检测裂解后的蛋白质样品,将蛋白质样品通过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离,转移到聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上。GAPDH为内参。5%牛血清白蛋白作为封闭液,室温下对PVDF膜封闭2 h,分别加入ACTA2(1:5000)、COL3A1(1:1000)、p-ERK(1:1000)、ERK(1:1000)、GAPDH(1:10000)一抗,4 ℃过夜孵育(12 h)。含1%吐温-20的TBST洗涤膜,去除未结合的一抗。将膜与抗兔HRP标记的二抗在室温下孵育2 h并洗涤,采用ECL化学发光试剂显影,记录蛋白条带。

1.6 统计学处理 采用GraphPad Prism 9.5软件进行统计分析。计量数据均符合正态分布,以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用Tukey检验以控制I型错误率。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 薤白主要活性成分的网络药理学分析与相关机制预测

2.1.1 薤白活性成分与肺纤维化的交集靶点 通过文献检索共获得薤白的主要活性成分有Allicin、蒜氨酸、SAC及GSAC,通过韦恩图分析各活性成分靶点与肺纤维化相关靶点的交集及差异;结果显示,与肺纤维化相关的交集靶点,Allicin有23个,Alliin有71个,SAC有69个,GSAC有77个(图1A)。

2.1.2 PPI网络筛选关键蛋白 基于交集靶点构建Allicin、Alliin、SAC和GSAC的PPI网络(图1B)。(1) Allicin的PPI网络中,胱天蛋白酶-3(caspase-3)为连接度较高的核心节点,并与表皮生长因子受体(EGFR)、激酶插入区受体(KDR)及血红素加氧酶1(HO-1)等多靶点形成致密互作连接。(2)Alliin的PPI网络中,血管紧张素转换酶(ACE)为主要枢纽节点,并与一氧化氮合酶(NOS)1及NOS3、凝血因子II/凝血酶原(coagulation factor II/prothrombin, FII)、蔗糖酶-异麦芽糖酶(sucrase-isomaltase, SI)、EGFR及KDR等节点相互连接,呈现较为紧密的互作模块。(3) SAC的PPI网络中,ACE与二肽基肽酶4(DPP4)处于网络中心位置,并与SI、EGFR、KDR、NOS1/NOS3、FII及前列腺素内过氧化物合酶2(PTGS2)等

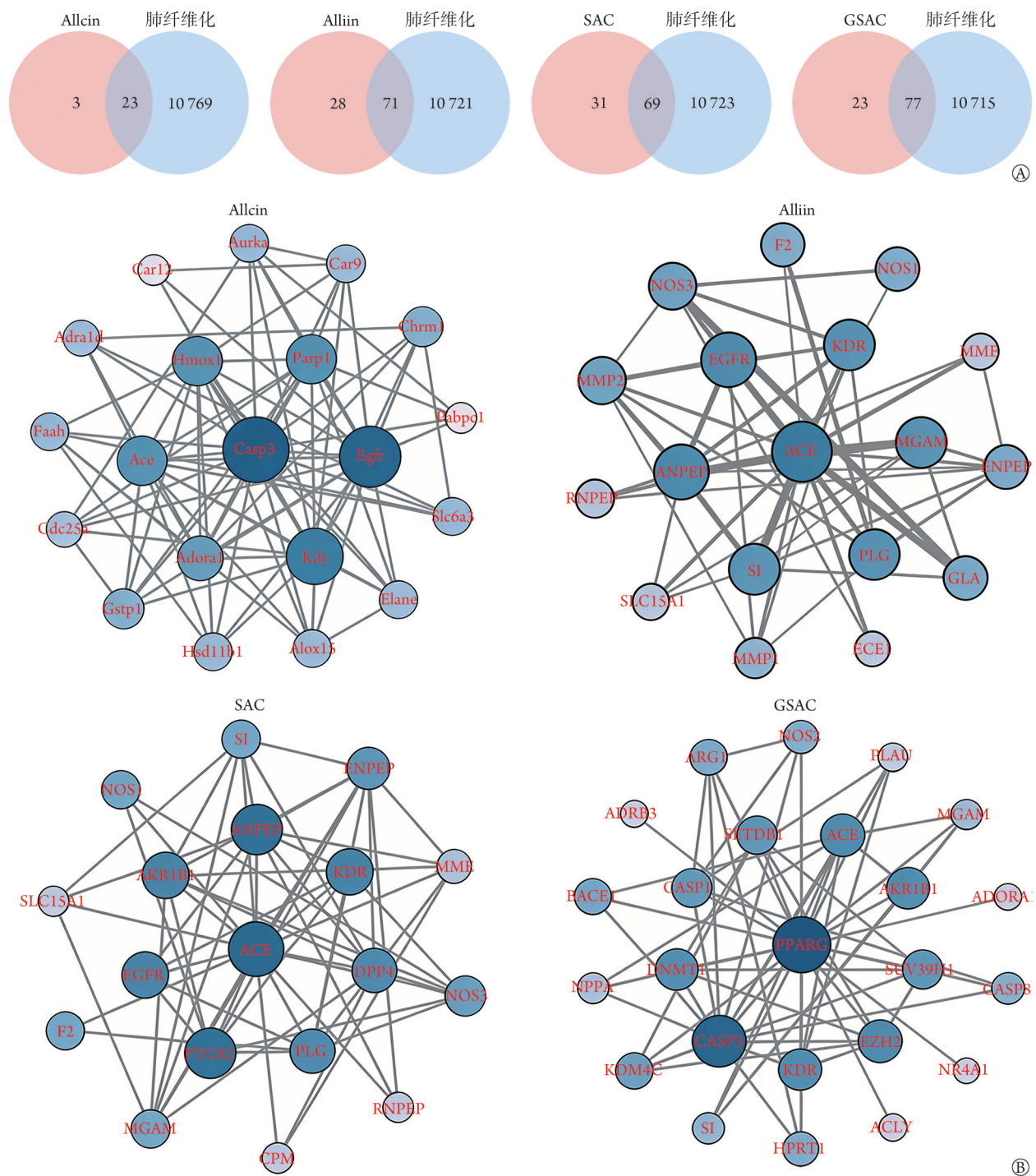


图1 薤白活性成分筛选、靶点基因预测及蛋白质互作(PPI)网络构建

Fig.1 Screening of active components of Xiebai, target gene prediction, and PPI network construction

A. Allcin、Alliin、SAC 和 GSAC 靶点与肺纤维化靶点的交集和差异；B. Allcin、Alliin、SAC 和 GSAC 的 PPI 网络，节点代表靶蛋白，深色节点为与肺纤维化相关的关键靶点，连线示蛋白间相互作用。Allcin. 大蒜素；Alliin. 蒜氨酸；SAC. S-烯丙基半胱氨酸；GSAC. S-烯丙基-L-半胱氨酸

节点形成广泛连接。(4)GSAC 的 PPI 网络中，过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPARG) 为核心节点，并与 caspase-3、caspase-8、ACE、KDR、醛酮还原酶家族 1 成员 B1/醛糖还原酶(AKR1B1)及 β_3 -肾上腺素能受体(ADRB3)等多种调控相关蛋白相互作用。

2.1.3 交集靶点基因的 GO 和 KEGG 富集分析结果

GO 分析结果显示，其生物学过程主要涉及氧化应激反应、细胞增殖与凋亡调控；细胞组分主要涉及线粒体、胞质及细胞外基质；分子功能主要涉及蛋白激酶活性及细胞因子结合。KEGG 通路富集分析结果显示，交集靶点显著富集于 PI3K-Akt 信号通路、MAPK 信号通路和 ERK 信号通路。此外，在 Alliin、

SAC和GSAC相关靶点中,还观察到代谢通路、GSH代谢及多种氨基酸代谢通路的富集(附图1)。

2.2 UXP对BLM处理的肺上皮细胞Beas-2b的影响

2.2.1 UXP对Beas-2b细胞活力、凋亡的影响 CCK-8检测结果显示,刺激24 h后,与对照组比较,BLM组细胞活力显著降低(60.07 ± 4.43 vs. 100.00 ± 0.51 , $P < 0.001$);与BLM组比较,BLM+UXP-L组、BLM+UXP-H组及BLM+NIN组细胞活力明显升高(79.77 ± 3.65 、 92.52 ± 2.49 、 82.55 ± 4.68 vs. 60.07 ± 4.43 , $P < 0.001$)。细胞凋亡检测结果显示,刺激24 h后,与对照组比较,BLM组细胞凋亡水平显著升高(50.89 ± 1.31 vs. 0.98 ± 0.24 , $P < 0.001$);与BLM组比较,BLM+UXP-L组、BLM+UXP-H组及BLM+NIN组细胞凋亡水平均明显降低(22.44 ± 0.77 、 17.23 ± 1.66 、 26.90 ± 1.26 vs. 50.89 ± 1.31 , $P < 0.001$) (图2A、B)。

2.2.2 UXP对Beas-2b细胞线粒体功能的影响 DCFDA染色结果显示,刺激24 h后,与对照组比较,BLM组细胞ROS水平显著升高(201.30 ± 5.43 vs. 1.00 ± 0.03 , $P < 0.001$);与BLM组比较,BLM+UXP-L组、BLM+UXP-H组及BLM+NIN组细胞ROS水平均明显降低(27.51 ± 1.31 、 15.38 ± 0.61 、 21.90 ± 1.70 vs. 201.3 ± 5.43 , $P < 0.001$)。Mitotracker染色结果显示,刺激24 h后,与对照组比较,BLM组细胞线粒体膜电位显著降低(0.124 ± 0.013 vs. 1.000 ± 0.031 , $P < 0.001$);与BLM组比较,BLM+UXP-L组、BLM+UXP-H组及BLM+NIN组细胞线粒体膜电位明显升高(0.420 ± 0.015 、 0.751 ± 0.044 、 21.900 ± 1.704 vs. 0.124 ± 0.013 , $P < 0.001$) (图2C)。

2.2.3 UXP对Beas-2b细胞脂质过氧化和铁死亡的影响 Liperfluor检测结果显示,刺激24 h后,与对照组比较,BLM组细胞脂质过氧化物含量显著升高(51.30 ± 2.40 vs. 2.110 ± 1.22 , $P < 0.001$)。与BLM组比较,BLM+UXP-L组、BLM+UXP-H组及BLM+NIN组细胞脂质过氧化物含量显著降低(25.82 ± 1.56 、 18.05 ± 1.04 、 27.07 ± 1.75 vs. 51.30 ± 2.40 , $P < 0.001$)。FerroOrange染色结果显示,刺激24 h后,与对照组比较,BLM组细胞 Fe^{2+} 含量显著升高(53.88 ± 4.11 vs. 2.34 ± 0.82 , $P < 0.001$);与BLM组比较,BLM+UXP-L组、BLM+UXP-H组及BLM+NIN组细胞 Fe^{2+} 含量显著降低(17.58 ± 2.36 、 10.54 ± 1.78 、 31.52 ± 2.86 vs. 53.88 ± 4.11 , $P < 0.001$) (附图2)。

2.3 UXP对与Beas-2b共培养的HLF-1细胞中ACTA2和COL1A1蛋白表达的影响 免疫荧光检测结果显示,与对照组比较,与Beas-2b共培养的BLM组HLF-1细胞中ACTA2和COL1A1水平均明显增高(15.140 ± 0.446 vs. 1.000 ± 0.083 , 6.256 ± 0.272 vs. 1.000 ± 0.089 , $P < 0.001$)。与BLM组比较,BLM+UXP-L组、

BLM+UXP-H组及BLM+NIN组HLF-1细胞中ACTA2和COL1A1水平均明显降低(ACTA2: 2.738 ± 0.159 、 2.139 ± 0.140 、 1.980 ± 0.090 vs. 15.140 ± 0.446 ; COL1A1: 1.425 ± 0.069 、 1.692 ± 0.065 、 1.086 ± 0.039 vs. 6.256 ± 0.272 , $P < 0.001$) (图3)。

2.4 UXP对肺纤维化模型小鼠肺整体指标与组织病理的影响

2.4.1 对肺纤维化小鼠的肺指数和W/D比值的影响 与对照组比较,BLM组小鼠肺指数和W/D比值明显升高(0.015 ± 0.001 vs. 0.006 ± 0.000 , 6.900 ± 0.308 vs. 4.363 ± 0.337 , $P < 0.001$)。与BLM组比较,BLM+UXP-L组、BLM+UXP-H组及BLM+NIN组小鼠肺指数和W/D比值明显降低(肺指数: 0.01034 ± 0.00089 、 0.00948 ± 0.00108 、 0.00952 ± 0.00130 vs. 0.01457 ± 0.00077 ; W/D比值: 5.455 ± 0.405 、 5.305 ± 0.654 、 5.355 ± 0.560 vs. 6.900 ± 0.308 , $P < 0.001$)。

2.4.2 对肺纤维化小鼠的肺组织病理学的影响 Masson染色、天狼星红染色及普鲁士蓝染色结果显示,对照组小鼠肺组织结构完整,支气管、血管及肌肉纤维排列清晰,未见明显胶原沉积及铁沉积;BLM组小鼠肺组织出现明显病理改变,表现为胶原纤维增生和沉积增加,肺泡结构紊乱,间质增厚,并可见明显铁沉积;与BLM组比较,BLM+UXP-L组、BLM+UXP-H组及BLM+NIN组小鼠肺组织中胶原沉积及铁沉积减少,肺泡结构较为完整,纤维化病灶区域缩小,正常肺泡比例增加(图4A)。

2.4.3 对肺纤维化小鼠的肺组织线粒体形态的影响 透射电镜观察显示,对照组小鼠肺组织线粒体形态正常,数量适中,双层膜结构清晰,线粒体嵴完整;BLM组小鼠肺组织线粒体数量增多,形态不规则,可见线粒体肿胀、线粒体嵴断裂或消失,并伴有明显空泡形成;BLM+UXP-L组、BLM+UXP-H组及BLM+NIN组小鼠肺组织线粒体形态较BLM组有所改善,线粒体肿胀减轻、空泡减少,部分线粒体嵴结构恢复(图4B)。

2.5 UXP对肺纤维化模型小鼠生化指标的影响

2.5.1 对肺纤维化小鼠氧化应激指标的影响 SOD、GSH和MDA检测结果显示,与对照组比较,BLM组小鼠肺组织中SOD和GSH水平明显下降(6.414 ± 0.939 vs. 12.500 ± 0.610 , 0.583 ± 0.034 vs. 0.959 ± 0.018 , $P < 0.001$),MDA水平明显升高(20.590 ± 2.958 vs. 9.082 ± 1.688 , $P < 0.001$)。与BLM组比较,BLM+UXP-L组、BLM+UXP-H组及BLM+NIN组小鼠肺组织中SOD、GSH水平均明显升高(SOD: 9.682 ± 1.410 、 11.140 ± 0.835 、 9.117 ± 0.956 vs. 6.414 ± 0.939 ; GSH: 0.746 ± 0.058 、 0.813 ± 0.062 、 0.714 ± 0.062 vs. 0.583 ± 0.034 , $P < 0.001$),MDA水平明显降低(12.960 ± 1.861 、 $11.210 \pm$

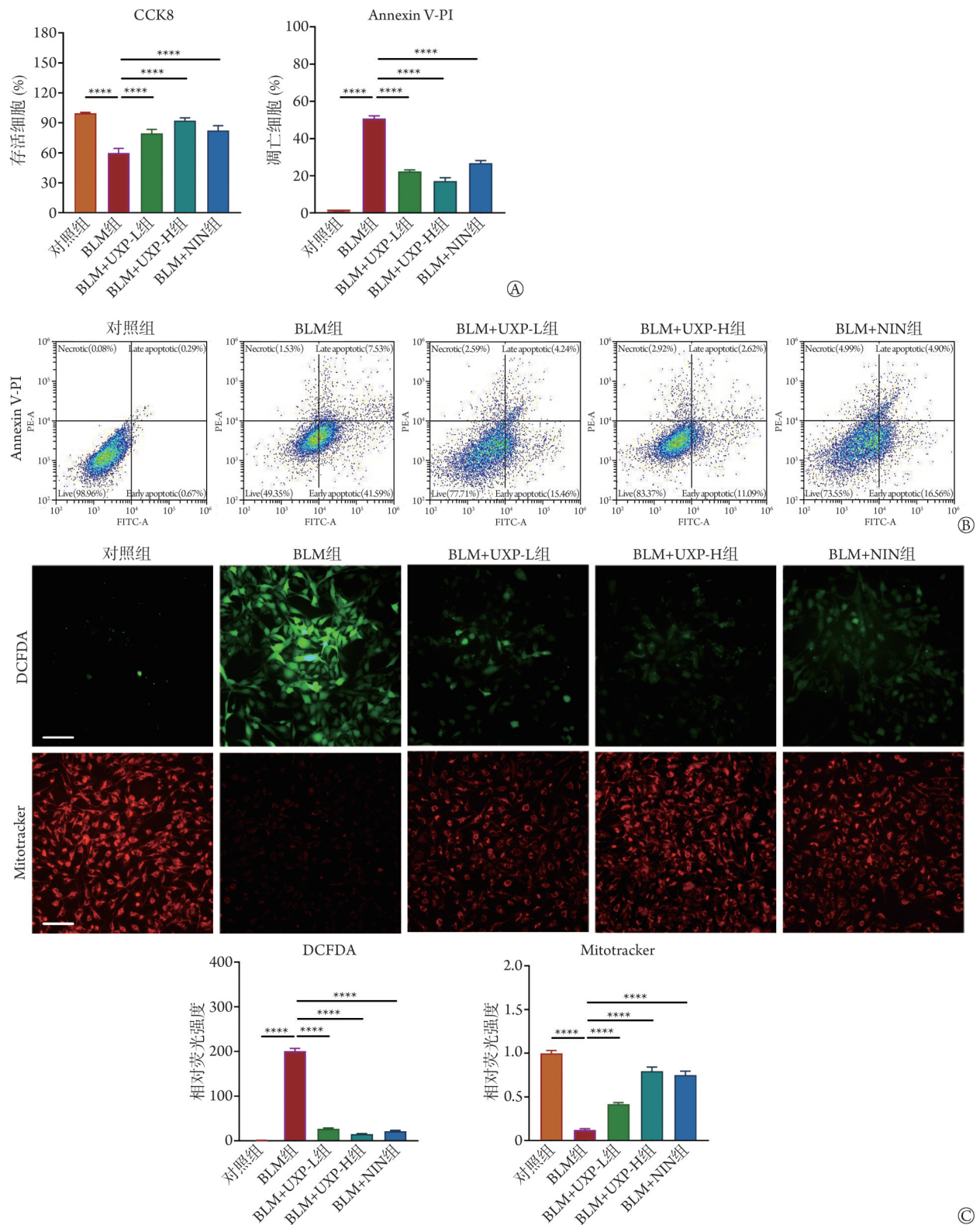


图2 薤白超细粉(UXP)对Beas-2b细胞活力、凋亡和线粒体功能的影响($n=4$)

Fig.2 Effects of ultrafine Xiebai powder (UXP) on viability, apoptosis, and mitochondrial morphology of Beas-2b cell

A. CCK8法检测细胞活力; B. 采用 Annexin V-FITC/PI 双染法, 流式细胞仪检测细胞死亡情况; C. DCFDA 染色和 Mitotracker 染色 (400X); 根据荧光信号将细胞分为: 活细胞(Annexin V-/PI-, 左下角)、早期凋亡细胞(Annexin V+/PI-, 右下角)、晚期凋亡(Annexin V+/PI+, 右上角)及坏死细胞(Annexin V-/PI+, 左上角)。将早、晚期凋亡细胞及坏死细胞合称为总凋亡细胞率进行比较; * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。BLM. 博来霉素; NIN. 尼达尼布

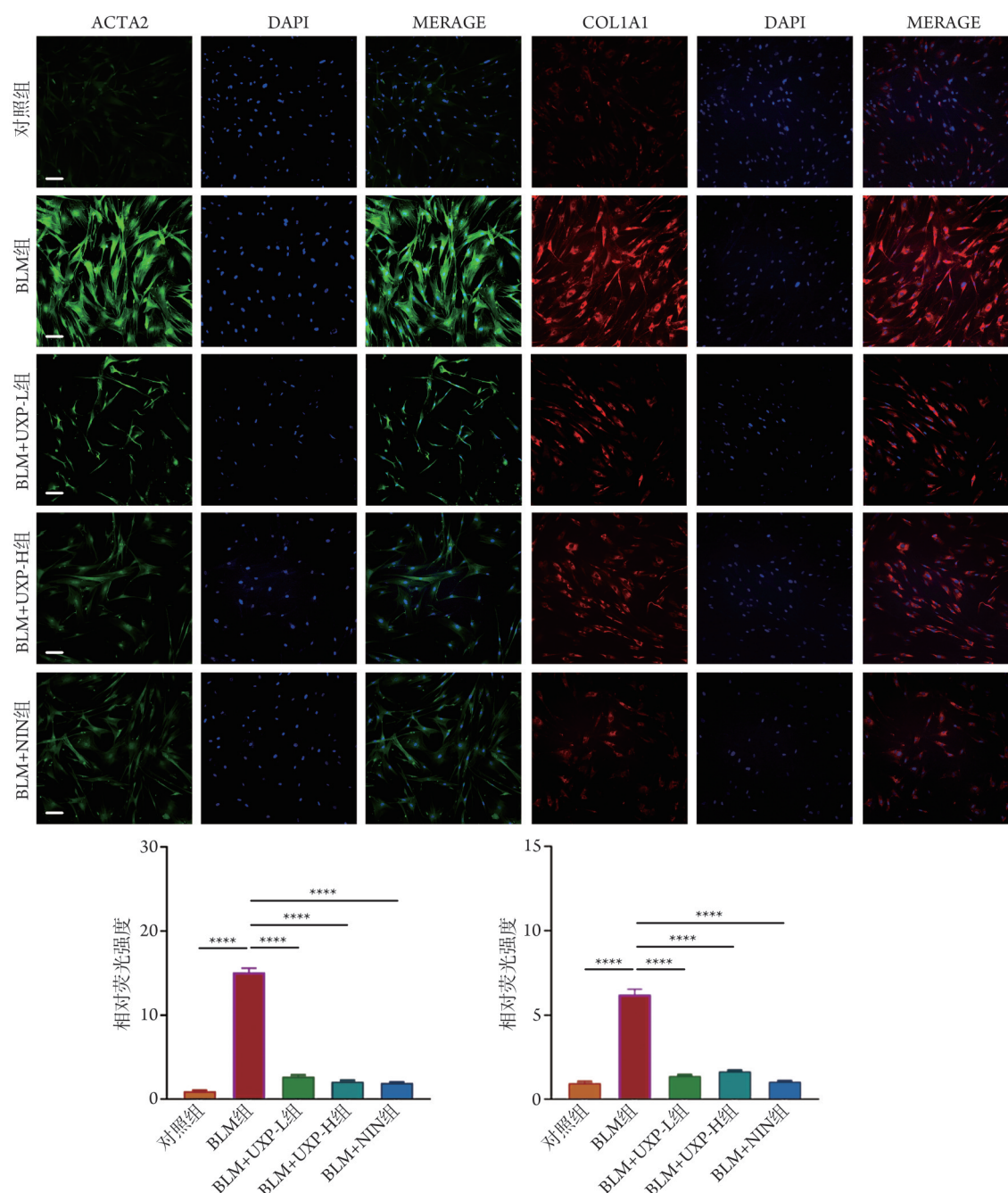


图3 薤白超细粉(UXP)对与Beas-2b细胞共培养的HLF-1细胞中ACTA2、COL1A1表达的影响(免疫荧光染色, 100 \times , $n=4$)

Fig. 3 Effects of ultrafine Xiebai powder (UXP) on the expression of Acta2 and Col1a1 in HLF-1 cell co-cultured with Beas-2B cell (immunofluorescence staining, 100 \times , $n=4$)

蓝色荧光示细胞核位置; 绿色荧光示 ACTA2 蛋白(肌成纤维细胞标志物), 红色荧光示 COL1A1 蛋白(胶原沉积标志物)的表达与定位。* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。BLM. 博来霉素; NIN. 尼达尼布; ACTA2. α -平滑肌肌动蛋白; COL1A1. I型胶原蛋白 α 1链

2.305、 14.830 ± 1.797 vs. 20.590 ± 2.958 , $P<0.001$)。与 BLM+NIN 组比较, BLM+UXP-H 组 SOD 和 GSH 水平增高($P<0.05$) (图5)。

2.5.2 对肺纤维化小鼠胶原沉积的影响 与对照组比较, BLM 组小鼠肺组织中 HYP 含量明显升高(1.332 ± 0.2034 vs. 0.7941 ± 0.05822 , $P<0.001$)。与 BLM 组相比, BLM+UXP-L 组、BLM+UXP-H 组及 BLM+NIN 组小鼠肺组织中 HYP 含量均明显下降($0.914\pm$

0.071 、 0.823 ± 0.049 、 0.932 ± 0.086 vs. 1.332 ± 0.203 , $P<0.001$) (图5)。

2.5.3 对肺纤维化小鼠铁沉积的影响 与对照组比较, BLM 组小鼠肺组织中铁沉积明显增多(14.24 ± 1.040 vs. 5.478 ± 0.3244 , $P<0.001$)。与 BLM 组比较, BLM+UXP-L 组、BLM+UXP-H 组及 BLM+NIN 组小鼠肺组织中铁沉积明显减少(7.499 ± 0.580 、 6.273 ± 0.535 、 8.335 ± 0.830 vs. 14.240 ± 1.040 , $P<0.001$) (图5)。

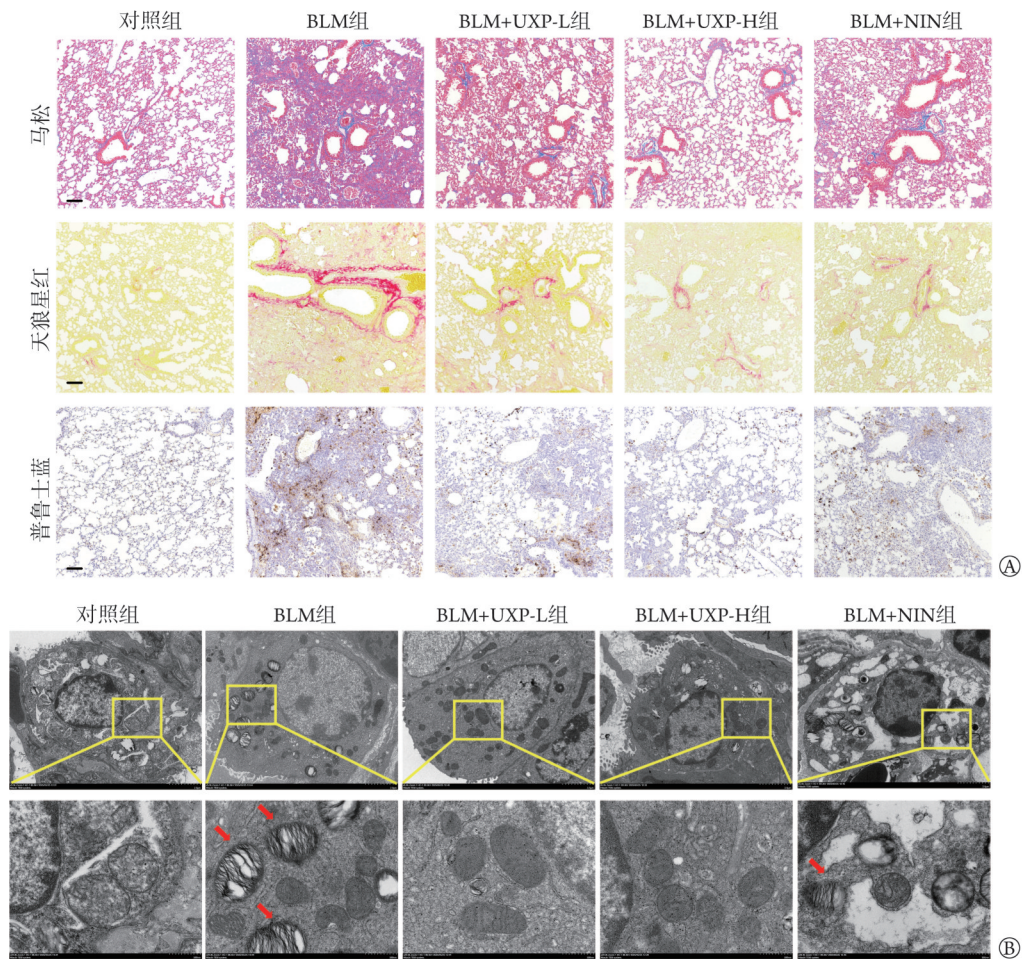


图4 薤白超细粉(UXP)对各组小鼠肺组织病理和线粒体形态的影响

Fig.4 Effects of ultrafine Xiebai powder (UXP) on lung pathology and mitochondrion in mice of each group

A. 马松染色、天狼星红染色和普鲁士蓝染色结果(100 \times); B. 电镜下的线粒体形态(2000 \times , 10000 \times)。对照组小鼠肺组织结构正常, 未见明显胶原与铁沉积。BLM组呈现典型肺纤维化改变, 包括肺泡结构紊乱、间质增厚, 并伴有大量胶原纤维及铁沉积。经 UXP-L、UXP-H 或阳性药物 NIN 干预后, 肺组织纤维化程度、胶原沉积及铁沉积均显著减轻, 肺泡结构改善。对照组线粒体形态正常, 结构清晰, 嵴排列有序; BLM 组线粒体数量增多, 形态异常, 出现显著的结构损伤(箭头指示典型的线粒体肿胀、嵴断裂/消失和空泡形成); 与 BLM 组比较, BLM+UXP-L 组线粒体损伤程度减轻, BLM+UXP-H 组线粒体结构改善明显且损伤特征减少, BLM+NIN 组线粒体形态接近正常。BLM. 博来霉素; NIN. 尼达尼布

2.6 UXP 对肺纤维化小鼠肺组织纤维化和铁死亡相关的 mRNA 和蛋白表达的影响

2.6.1 对相关 mRNA 表达的影响

RT-qPCR 检测结果显示, 与对照组比较, BLM 组小鼠肺组织中 ACTA2、COL1A1、COL1A2、Fn、Acsl4 及 Ncoa4 mRNA 表达水平明显升高(ACTA2: 2.999 ± 0.2274 vs. 1.000 ± 0.1339 ; COL1A1: 3.851 ± 0.350 vs. 1.000 ± 0.124 ; COL1A2: 2.283 ± 0.221 vs. 1.000 ± 0.117 ; Fn: 2.822 ± 0.195 vs. 1.000 ± 0.101 ; Acsl4: 3.040 ± 0.319 vs. 1.000 ± 0.108 ; Ncoa4: 2.133 ± 0.199 vs. 1.000 ± 0.0716 , $P < 0.01$), Slc7a11 和 Gpx4 mRNA 表达水平明显降低(0.3646 ± 0.06551 vs. 1.000 ± 0.0723 , 0.5145 ± 0.351 vs. 1.000 ± 0.185 , $P < 0.05$)。与 BLM 组比较, BLM+UXP-L、BLM+UXP-H 及 BLM+NIN 组小鼠肺组织中 ACTA2、COL1A1、COL1A2、Fn、Acsl4、Ncoa4 mRNA 表达水平显著降

低(ACTA2: 1.696 ± 0.151 、 1.364 ± 0.260 、 1.657 ± 0.178 vs. 2.999 ± 0.227 ; COL1A1: 1.787 ± 0.267 、 1.108 ± 0.0812 、 1.731 ± 0.263 vs. 3.851 ± 0.350 ; COL1A2: 1.447 ± 0.101 、 1.200 ± 0.074 、 1.461 ± 0.162 vs. 2.283 ± 0.221 ; Fn: 1.661 ± 0.115 、 1.455 ± 0.097 、 1.577 ± 0.205 vs. 2.822 ± 0.195 ; Acsl4: 2.167 ± 0.259 、 1.147 ± 0.2631 、 1.553 ± 0.298 vs. 3.040 ± 0.319 ; Ncoa4: 1.638 ± 0.295 、 1.057 ± 0.1341 、 1.274 ± 0.2361 vs. 2.133 ± 0.199 , $P < 0.01$), Slc7a11、Gpx4 mRNA 表达水平显著增高(Slc7a11: 0.671 ± 0.104 、 0.888 ± 0.109 、 0.755 ± 0.0845 vs. 0.365 ± 0.066 ; Gpx4: 0.7030 ± 0.06144 、 0.9214 ± 0.04696 、 0.7905 ± 0.06899 vs. 0.5145 ± 0.3508 , $P < 0.05$)。与 BLM+NIN 组比较, BLM+UXP-H 组 COL1A1 和 COL1A2 mRNA 表达水平明显降低($P < 0.05$) (图 6A)。

2.6.2 对相关蛋白表达水平的影响

Western blotting

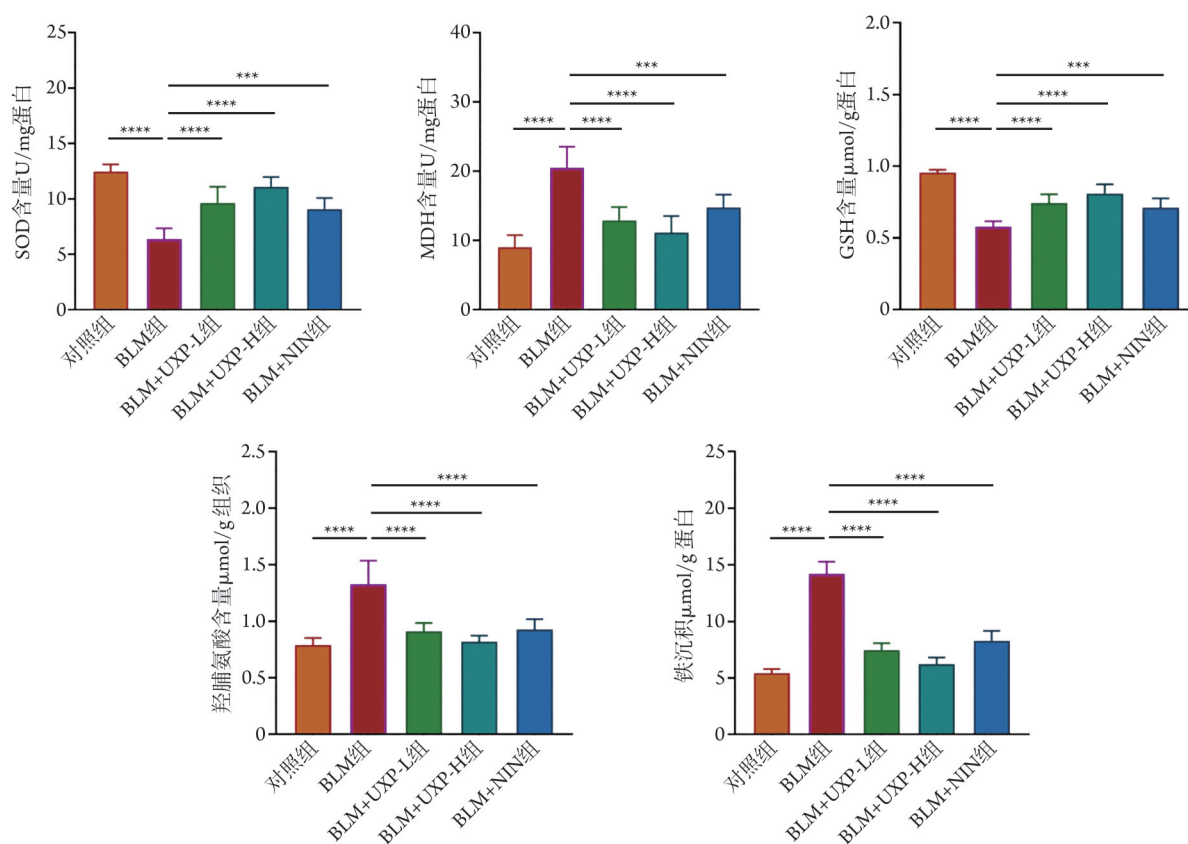


图5 薤白超细粉(UXP)对各组小鼠肺组织氧化应激、胶原沉积和铁沉积指标的影响

Fig.5 Effects of ultrafine Xiebai powder (UXP) on the indexes of oxidative stress, collagen deposition, and iron deposition in lung tissue of mice of each group

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. BLM. 博来霉素; NIN. 尼达尼布; SOD. 超氧化物歧化酶; MDA. 丙二醛; GSH. 谷胱甘肽; HYP. 羟脯氨酸

检测结果显示,与对照组比较,模型组小鼠肺组织中 ACTA2、COL3A1 及 p-ERK 蛋白表达水平均模型升高 (ACTA2: 1.530 ± 0.03869 vs. 1.000 ± 0.03831 ; COL3A1: 3.890 ± 0.1793 vs. 1.000 ± 0.3236 ; p-ERK: 2.619 ± 0.1858 vs. 1.000 ± 0.1264 , $P < 0.001$)。与 BLM 组比较, BLM+UXP-H 组及 BLM+NIN 组小鼠肺组织中 ACTA2、COL3A1 及 p-ERK 蛋白表达水平均明显降低 (ACTA2: 0.9916 ± 0.06875 、 1.077 ± 0.05373 vs. 1.530 ± 0.03869 ; COL3A1: 2.170 ± 0.08094 、 2.534 ± 0.2387 vs. 3.890 ± 0.1793 ; p-ERK: 1.170 ± 0.1177 、 1.856 ± 0.03068 vs. 2.619 ± 0.1858 , $P < 0.001$)。与 BLM+NIN 组比较, UXP-H 组 ACTA2 和 p-ERK 表达水平降低 ($P < 0.05$) (图 6B)。

3 讨论

肺纤维化致残率和病死率较高,患者常表现为逐渐加重的呼吸困难和运动耐力下降,最终可发展为呼吸衰竭^[15];其发病机制尚未阐明,遗传易感性与环境因素(如吸烟、空气污染、药物或放射损伤)均可诱发;这些因素通过影响肺上皮细胞稳态、氧

化还原平衡及细胞死亡方式,驱动纤维化的发生和进展^[16]。

本研究首先通过网络药理学预测薤白主要活性成分的潜在靶点与信号通路;其次,在体外采用博来霉素(BLM)诱导的肺上皮细胞损伤模型,在不同剂量 UXP 及临床对照药物尼达尼布干预下,评估细胞活性、凋亡、活性氧(ROS)水平、线粒体功能、脂质过氧化及铁死亡标志物的变化;最后,采用 BLM 诱导的小鼠肺纤维化模型,结合肺水肿与组织学染色、抗氧化与纤维化生化指标、促纤维化因子转录与蛋白表达及线粒体超微结构分析,旨在构建从网络药理学-细胞-组织层面的多尺度证据链,为天然药物干预肺纤维化提供理论基础与实验证据。

近年研究显示,铁死亡作为一种铁依赖性程序性细胞死亡形式,在上皮细胞损伤中起关键作用^[17]。铁死亡由铁稳态失衡和多不饱和脂质过氧化的协同积累所驱动:一方面,转铁蛋白受体介导的铁摄取增强及核受体共激活因子 4(NCOA4)相关的铁蛋白自噬可扩大游离铁池,促进芬顿反应和 ROS 生成^[18];另一方面,Acsl4 与溶血磷脂酰胆碱酰基转移

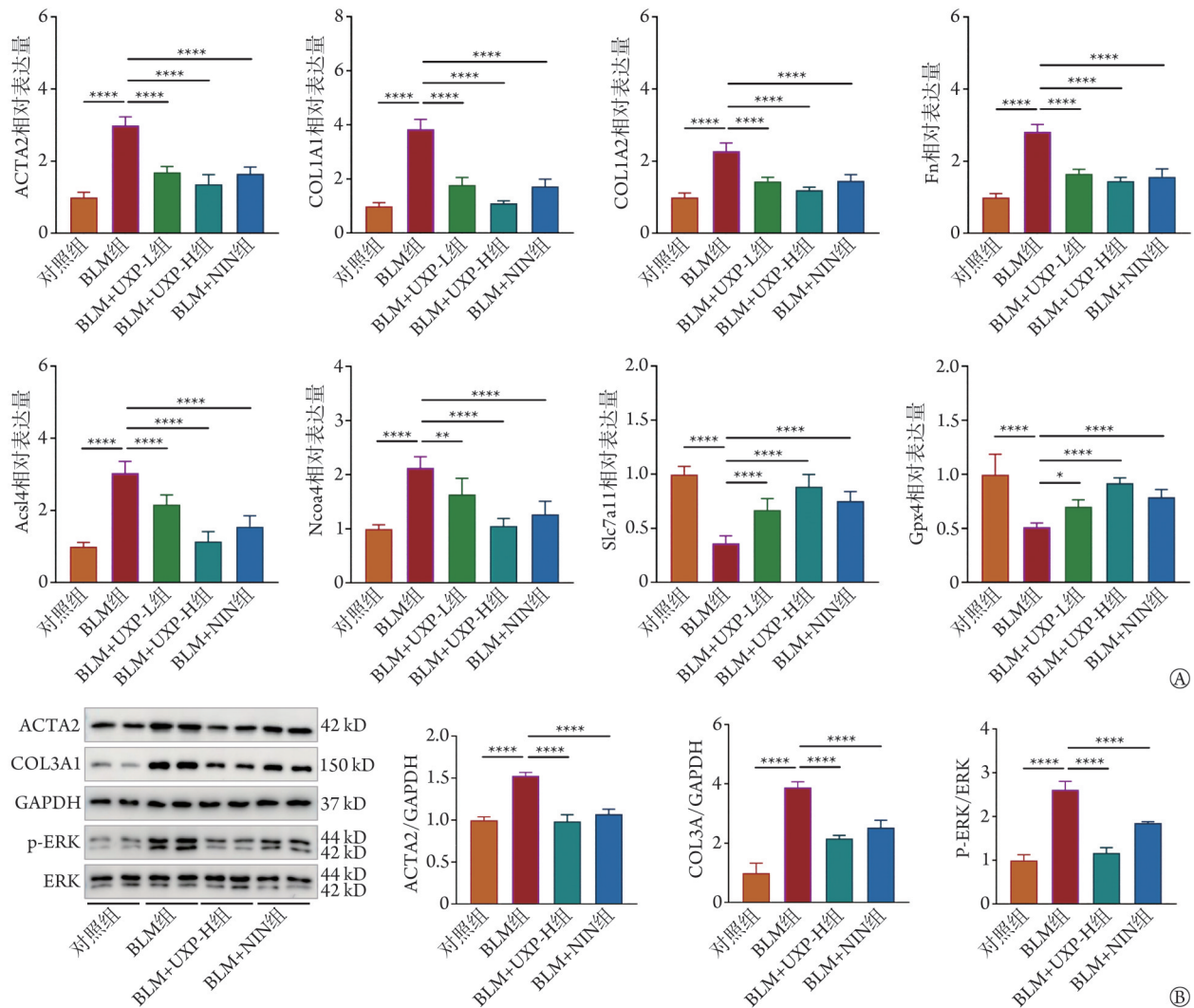


图6 薤白超细粉(UXP)对小鼠肺组织纤维化和铁死亡相关的mRNA和蛋白蛋白表达的影响

Fig.6 Effects of ultrafine Xiebai powder (UXP) on expression of mRNAs and proteins related to pulmonary fibrosis and ferroptosis in lung tissue of mice of each group

A. 相关mRNA表达水平(RT-qPCR); B. 相关蛋白表达水平(Western blotting)。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。BLM. 博来霉素; NIN. 尼达尼布; ACTA2. α -平滑肌肌动蛋白; ERK. 外源性细胞信号调节激酶; p-ERK. 磷酸化ERK; COL3A1. III型胶原蛋白 $\alpha 1$ 链; Fn. 纤维连接蛋白; COL1A1. I型胶原蛋白 $\alpha 1$ 链; COL1A2. I型胶原蛋白 $\alpha 2$ 链; GAPDH. 甘油醛-3-磷酸脱氢酶; Acs4. 长链酰基辅酶A合成酶4; Ncoa4. 核受体共激活因子4; Slc7a11. 溶质载体家族7成员11; Gpx4. 谷胱甘肽过氧化物酶4

酶3(LPCAT3)决定的多不饱和脂质底物富集, 以及花生四烯酸脂氧合酶5/12/15(ALOXS/12/15)等脂氧合酶活化, 使细胞膜更易发生脂质过氧化^[19-20]。当氧化应激水平升高时, ROS大量积聚, 压垮抗氧化防御系统, 导致脂质过氧化反应失控, 并引起MDA及4-羟基壬烯醛(4-hydroxynonenal, 4-HNE)等终末产物的积累, 诱发线粒体功能障碍和细胞死亡信号的放大^[21]。氧化应激与脂质过氧化的持续正反馈进一步破坏细胞膜结构, 激活促纤维化信号通路并诱发炎症反应^[22]。铁死亡不仅驱动细胞内的代谢与结构损害, 还可通过细胞间信号放大其病理效应。上皮细胞铁死亡不仅限于细胞自身的损伤, 其释放的损伤相关分子模式(DAMPs)及脂质过氧化衍生物, 可

通过旁分泌途径增强转化生长因子- β (TGF- β)等促纤维化信号, 重塑上皮分泌谱, 并提高邻近间质细胞对生长因子的反应性, 从而在组织层面促进肌成纤维表型的形成和胶原沉积的持续^[23-24]。与传统凋亡或坏死不同, 铁死亡以GSH耗竭、Gpx4失活、脂质过氧化积累及铁稳态失衡为分子特征, 其发生可放大氧化应激并破坏线粒体结构, 导致上皮屏障功能受损, 并通过旁分泌信号促进成纤维细胞活化和细胞外基质沉积, 因此上皮细胞铁死亡被视为潜在治疗靶点^[25]。本研究系统评估了UXP对BLM诱导的肺纤维化的干预效果, 并围绕氧化应激、线粒体损伤及铁死亡相关通路, 阐释其潜在的抗纤维化分子机制; 结果显示, UXP并非作用于单一靶点, 而是通

过多层级、多通路协同调控，整体缓解肺组织损伤并抑制纤维化进程。

氧化应激被认为是肺纤维化发生与进展的重要驱动因素。过量ROS的持续积累可导致GSH耗竭、抗氧化防御失衡，并损伤线粒体膜结构，引发线粒体膜电位下降并放大细胞损伤信号^[26]。在本研究中，BLM可显著降低肺组织中SOD与GSH水平，同时导致脂质过氧化终产物MDA明显升高^[27]；提示氧化应激反应被显著激活。值得注意的是，UXP干预可提升SOD与GSH水平，降低MDA含量，提示其可促进肺组织抗氧化防御能力恢复，减轻氧化应激反应。本研究的超微结构观察显示，SOD、GSH下降及MDA升高，与肺组织ROS积累、线粒体膜电位降低及透射电镜下线粒体嵴断裂、肿胀和空泡化等典型损伤特征一致，提示“氧化应激—线粒体损伤轴”在BLM诱导的肺纤维化中处于关键地位。UXP对上述指标的改善，提升其抗纤维化效应并非局限于单一靶点，可能通过整体缓解氧化损伤并维持线粒体结构与功能稳定而发挥保护作用。

铁死亡的典型特征包括铁沉积增加、脂质过氧化增强及铁死亡相关基因表达失衡^[28-29]。本研究显示，BLM可诱导肺组织铁沉积增加，并伴随铁死亡相关基因*Acs14*、*Ncoa4*上调，及*Slc7a11*与*Gpx4*下调，提示铁稳态失衡与铁死亡激活在肺纤维化进程中密切参与。UXP干预后，小鼠肺组织铁沉积和细胞内Fe²⁺及脂质过氧化水平均显著降低；同时，*Acs14*与*Ncoa4*表达下调，而*Slc7a11*与*Gpx4*表达上调。这些分子改变与ROS降低及抗氧化能力增强的功能性证据基本一致，提示UXP可通过调控铁代谢与脂质过氧化过程抑制铁死亡。

本研究通过网络药理学分析结果显示，MAPK/ERK通路在UXP作用网络中呈现显著富集。ERK信号通路在成纤维细胞活化、细胞外基质合成及纤维化进展中发挥关键调控作用^[30]。本研究在蛋白水平的结果显示，BLM诱导的肺纤维化伴随ERK通路的过度激活，而UXP处理可降低p-ERK水平；这与网络药理学预测一致，提示ERK可能是连接氧化应激、铁死亡与纤维化反应的重要枢纽。本研究显示，UXP可降低氧化应激水平并抑制ERK过度激活，协同抑制*Acs14*介导的多不饱和脂肪酸酯化及NCOA4介导的铁死亡，同时增强SLC7A11/GPX4轴相关的抗氧化防御能力，从而减弱脂质过氧化与铁依赖性细胞死亡，最终延缓肺纤维化进程。

本研究还在BLM模型小鼠观察了UXP的抗纤维化作用。BLM模型小鼠呈现明显的肺水肿和结构损伤，肺指数及湿/干重比值(W/D)显著升高，同时HYP含量增加并伴随Masson染色下胶原过度沉积；

UXP干预后，上述指标均得到明显改善。进一步在细胞与组织水平，UXP可显著抑制HLF-1细胞中ACTA2与COL1A1的表达，并逆转肺组织中Acta2、Col1a1、Col1a2及Fn等纤维化相关基因的异常上调。这些结果从整体功能、组织学改变到分子表达的多角度呈现了UXP的抗肺纤维化作用。

与既往多数聚焦于肺泡上皮或广谱抗氧化策略的研究不同，本研究以“肺上皮细胞”为靶细胞，聚焦“铁死亡”这一可塑性通路，并以“标准化超细粉制剂”为干预载体，在机制阐释与制剂可转化性之间建立可复验、量化的关联。本研究仍存在一定局限性。首先，UXP作为天然产物，其化学成分复杂，不同活性成分在抗纤维化及铁死亡调控中的相对贡献尚不明确。未来可通过分离纯化单一成分并系统评估其剂量-效应关系，以阐明关键药效物质基础。其次，单一品系、单一建模方式的小鼠模型仍难以完全模拟人类肺纤维化的复杂病理过程，后续研究需在多模型、多品系甚至临床前体系中进一步验证。最后，网络药理学预测的多通路互作仍需通过更精细的功能实验加以验证，尤其应系统解析ERK与PI3K-Akt、TGF- β /Smad等经典纤维化通路及铁死亡通路之间的交叉调控关系。

综上所述，本研究显示，UXP可通过协同调控氧化应激、线粒体损伤与铁死亡相关通路，抑制成纤维细胞活化与胶原沉积，发挥抗肺纤维化作用。这些发现可为UXP作为潜在抗肺纤维化候选药物及相关的临床前研究提供实验依据和理论支持。

【参考文献】

- [1] Koudstaal T, Funke-Chambour M, Kreuter M, *et al.* Pulmonary fibrosis: from pathogenesis to clinical decision-making[J]. *Trends Mol Med*, 2023, 29(12): 1076-1087.
- [2] Giulianelli G, Cocconcelli E, Fiorentù G, *et al.* Idiopathic pulmonary fibrosis, today and tomorrow: certainties and new therapeutic horizons[J]. *Pulm Ther*, 2025, 11(2): 195-234.
- [3] Yao M, Liao J, Liu Z, *et al.* Ferroptosis: a key driver and therapeutic target in the pathogenesis of acute respiratory distress syndrome[J]. *Front Immunol*, 2025, 16: 1567980.
- [4] Zhang J, Du J, Liu D, *et al.* Polystyrene microplastics induce pulmonary fibrosis by promoting alveolar epithelial cell ferroptosis through cGAS/STING signaling[J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2024, 277: 116357.
- [5] Zhang WY, Wen L, Du L, *et al.* S-RBD-modified and miR-486-Sp-engineered exosomes derived from mesenchymal stem cells suppress ferroptosis and alleviate radiation-induced lung injury and long-term pulmonary fibrosis[J]. *J Nanobiotechnology*, 2024, 22(1): 662.
- [6] Chen S, Zhu JY, Zang X, *et al.* The emerging role of ferroptosis in liver diseases[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 801365.
- [7] Zhu Q, Kakino K, Nogami C, *et al.* An LC-MS/MS-SRM method

- for simultaneous quantification of four representative organosulfur compounds in garlic products[J]. *Food Analytical Methods*, 2016, 9(12): 3378-3384.
- [8] Fan M, Du L, Jiang W, *et al.* Banxia Gualou XiebaiTang and Qishen Yiqi dropping pills combined therapy for Qi deficiency, phlegm, and blood stasis syndrome in post-PCI coronary heart disease patients [J]. *Int J Gen Med*, 2025, 18: 1795-1805.
- [9] 邵宁宁, 杨剑明, 王耀光, 等. 大蒜超细粉改善小鼠动脉粥样硬化及血脂异常的作用机制[J]. *中国药理学通报*, 2025, 41(7): 1376-1381.
- [10] Jenkins RG, Moore BB, Chambers RC, *et al.* An official American thoracic society workshop report: use of animal models for the preclinical assessment of potential therapies for pulmonary fibrosis [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2017, 56(5): 667-679.
- [11] Moeller A, Ask K, Warburton D, *et al.* The bleomycin animal model: a useful tool to investigate treatment options for idiopathic pulmonary fibrosis[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2008, 40(3): 362-382.
- [12] Izbicki G, Segel MJ, Christensen TG, *et al.* Time course of bleomycin-induced lung fibrosis[J]. *Int J Exp Pathol*, 2002, 83(3): 111-119.
- [13] Ravanetti F, Ragionieri L, Ciccimarra R, *et al.* Modeling pulmonary fibrosis through bleomycin delivered by osmotic minipump: a new histomorphometric method of evaluation[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2020, 318(2): L376-L385.
- [14] Hübner RH, Gitter W, El Mokhtari NE, *et al.* Standardized quantification of pulmonary fibrosis in histological samples[J]. *Biotechniques*, 2008, 44(4): 507-511, 514-507.
- [15] Du K, Wen X, Zhu J, *et al.* Yi-Fei-Tong-Bi decoction alleviates bleomycin induced pulmonary fibrosis in mice[J]. *Drug Des Devel Ther*, 2025, 19: 3983-3995.
- [16] Shaghghi H, Para R, Tran C, *et al.* Glutamine restores mitochondrial respiration in bleomycin-injured epithelial cells[J]. *Free Radic Biol Med*, 2021, 176: 335-344.
- [17] Li J, Lu K, Sun F, *et al.* Panaxydol attenuates ferroptosis against LPS-induced acute lung injury in mice by Keap1-Nrf2/HO-1 pathway [J]. *J Transl Med*, 2021, 19(1): 96.
- [18] Famurewa AC, Akhigbe RE, George MY, *et al.* Mechanisms of ferroptotic and non-ferroptotic organ toxicity of chemotherapy: protective and therapeutic effects of ginger, 6-gingerol and zingerone in preclinical studies[J]. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol*, 2025, 398(5): 4747-4778.
- [19] Xia L, Yang M, Liu Y. *Portulaca oleracea* L. polysaccharide inhibits ovarian cancer *via* inducing ACSL4-dependent ferroptosis[J]. *Aging (Albany NY)*, 2024, 16(6): 5108-5122.
- [20] Eskander G, Abdelhamid SG, Wahdan SA, *et al.* Insights on the crosstalk among different cell death mechanisms[J]. *Cell Death Discov*, 2025, 11(1): 56.
- [21] Li Y, Chandra TP, Song X, *et al.* H2S improves doxorubicin-induced myocardial fibrosis by inhibiting oxidative stress and apoptosis *via* Keap1-Nrf2[J]. *Technol Health Care*, 2021, 29(S1): 195-209.
- [22] Sun HN, Ren CX, Lee DH, *et al.* PRDX1 negatively regulates bleomycin-induced pulmonary fibrosis *via* inhibiting the epithelial-mesenchymal transition and lung fibroblast proliferation *in vitro* and *in vivo*[J]. *Cell Mol Biol Lett*, 2023, 28(1): 48.
- [23] Hassanein EHM, Ibrahim IM, Abd El-Maksoud MS, *et al.* Targeting necroptosis in fibrosis[J]. *Mol Biol Rep*, 2023, 50(12): 10471-10484.
- [24] Kempf CL, Song JH, Sammani S, *et al.* TLR4 ligation by eNAMPT, a novel DAMP, is essential to sulfur mustard-induced inflammatory lung injury and fibrosis[J]. *Eur J Respir Med*, 2024, 6(1): 389-397.
- [25] Gao Q, Mao Y, Xie S, *et al.* Nrf2 signaling in chronic obstructive pulmonary disease: regulation of ferroptosis and therapeutic implications[J]. *Redox Biol*, 2025, 88: 103931.
- [26] Shan GY, Shi YP, Zhang YX, *et al.* Ginsenoside Rg5 ameliorates lipopolysaccharide (LPS)-induced acute liver injury *via* interfering Autophagy/Nrf2/Ferroptosis signal axis[J]. *Phytomedicine*, 2025, 144: 156941.
- [27] Nie Y, Chu C, Qin Q, *et al.* Lipid metabolism and oxidative stress in patients with Alzheimer's disease and amnesic mild cognitive impairment[J]. *Brain Pathol*, 2024, 34(1): e13202.
- [28] Gu Y, Wang Z, Wang K, *et al.* Low-dose valproic acid ameliorates osteoporosis by restoring redox homeostasis and suppressing ferritinophagy-dependent ferroptosis *via* EZH2/H3K27me3 signaling[J]. *Free Radic Biol Med*, 2025, 241: 76-89.
- [29] He F, Zhang P, Liu J, *et al.* ATF4 suppresses hepatocarcinogenesis by inducing SLC7A11 (xCT) to block stress-related ferroptosis[J]. *J Hepatol*, 2023, 79(2): 362-377.
- [30] Lai X, Lin Y, Huang S, *et al.* Dexmedetomidine alleviates pulmonary fibrosis through the ADORA2B-Mediated MAPK signaling pathway [J]. *Respir Res*, 2023, 24(1): 214.

(责任编辑: 蒋铭敏)