蒙花苷体内外抗肺纤维化作用及其机制研究Δ

黄梨婷*，王珠强，王依婷，范卫锋，董更婷，彭伟文#（广州中医药大学附属中山中医院药学部，广东 中山 528400）

中图分类号 R965　　**文献标志码** A　　**文章编号** 1001-0408（2023）03-0333-07
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2023.03.15

摘　要　目的 考察蒙花苷的体内外抗纤维化作用，并初步探讨其作用机制。**方法** 将C57BL/6J小鼠随机分为正常组（羧甲基纤维素钠）、模型组（羧甲基纤维素钠）、阳性对照组（吡非尼酮，200 mg/kg）和蒙花苷低、高剂量组（12.5、25 mg/kg），每组8只。除正常组外，其余各组小鼠均制备肺纤维化模型。造模结束后，灌胃给药，每天1次，连续14 d。观察小鼠一般情况，测定其肺指数，检测其血清中肿瘤坏死因子α（TNF-α）、转化生长因子β_1（TGF-β_1）水平以及肺组织中白细胞介素6（IL-6）水平；采用苏木素-伊红（HE）染色及Masson染色观察其肺组织病理学变化，并参照Ashcroft评分标准进行肺纤维化评分；检测其肺组织中α-平滑肌肌动蛋白（α-SMA）、Ⅰ型胶原蛋白（Collagen Ⅰ）、磷酸化胞外信号调节激酶（p-ERK1/2）、TGF-β_1的表达水平。使用TGF-β_1刺激人胚肺成纤维细胞HFL1建立体外肺纤维化模型，实验设置正常组、模型组和蒙花苷低、中、高浓度组（3.7、7.4、14.8 mg/L），培养48 h后，检测细胞中α-SMA、Collagen Ⅰ、p-ERK1/2蛋白表达水平。**结果** 在体内实验中，与正常组比较，模型组小鼠肺指数和TNF-α、TGF-β_1、IL-6水平均显著升高（$P<0.01$）；肺泡中出现大量炎症浸染及细胞纤维化等病变，且有大量胶原蛋白沉积，HE染色和Masson染色评分均显著升高（$P<0.01$）；肺组织中α-SMA、Collagen Ⅰ、p-ERK1/2及TGF-β_1蛋白表达均显著上调（$P<0.01$）。与模型组比较，蒙花苷高剂量组小鼠上述指标均显著改善（$P<0.05$或$P<0.01$），蒙花苷低剂量组大部分指标（除肺指数外）均显著改善（$P<0.05$或$P<0.01$）。在体外实验中，与空白组比较，模型组细胞出现密度变大、明显增殖等变化，细胞中α-SMA、Collagen Ⅰ和p-ERK1/2蛋白表达均显著上调（$P<0.05$或$P<0.01$）。与模型组比较，蒙花苷各浓度组细胞密度变小，形态逐渐恢复正常；蒙花苷高浓度组细胞中上述蛋白及蒙花苷中浓度组细胞中p-ERK1/2蛋白表达均显著下调（$P<0.05$或$P<0.01$）。**结论** 蒙花苷可能通过调控ERK及炎症相关通路，减轻炎症反应，从而发挥抗肺纤维化作用。

关键词 蒙花苷；肺纤维化；胞外信号调节激酶通路；炎症通路

Study on the anti-pulmonary fibrosis effect of linarin *in vivo* and *in vitro* and its mechanism

HUANG Liting, WANG Zhuqiang, WANG Yiting, FAN Weifeng, DONG Gengting, PENG Weiwen (Dept. of Pharmacy, Zhongshan Hospital of Traditional Chinese Medicine Affiliated to Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangdong Zhongshan 528400, China)

ABSTRACT　OBJECTIVE To investigate the anti-pulmonary fibrosis effect of linarin *in vivo* and *in vitro*, and investigate its mechanism preliminarily. **METHODS** C57BL/6J mice were randomly divided into normal group (carboxymethylcellulose sodium), model group (carboxymethylcellulose sodium), positive control group (pirfenidone, 200 mg/kg), linarin low-dose and high-dose groups (12.5, 25 mg/kg), with 8 mice in each group. Except for normal group, pulmonary fibrosis model was induced in other groups. After modeling, they were given relevant medicine intragastrically, once a day, for consecutive 14 d. The general situation of mice was observed, and their lung indexes were measured; the levels of tumor necrosis factor-α (TNF-α) and transforming growth factor-β_1 (TGF-β_1) in serum and interleukin-6 (IL-6) in lung tissue were determined. Hematoxylin-eosin (HE) staining and Masson staining were used to observe the histopathological morphology of lung. The pulmonary fibrosis was scored according to Ashcroft score standard. The expressions of α-smooth muscle actin (α-SMA) and (type Ⅰ collagen, Collagen Ⅰ), phosphorylated extracellular signal-regulated kinase (p-ERK1/2) and TGF-β_1 in lung tissues were detected. HFL1 cells were stimulated by TGF-β_1 to form pulmonary fibrosis model *in vitro*, which were divided into normal group, model group and linarin low-, medium- and high-concentration groups (3.7, 7.4, 14.8 mg/L). After being cultured for 48 h, the protein expressions of α-SMA, Collagen Ⅰ and p-ERK1/2 in HFL1 cells were detected. **RESULTS** *In vivo*, compared with normal group, the lung index of model group and the levels of TNF-α, TGF-β_1 and IL-6 were significantly increased ($P<0.01$). There were a large number of inflammatory infiltration and cellular fibrosis lesions in the alveoli, and a large number of collagen depositions. The

Δ **基金项目** 中山市第三批社会公益与基础研究专项（医疗卫生重点项目）（No.2020B3007）

* **第一作者** 硕士研究生。研究方向：中药制剂开发与研究。电话：0760-89980219。E-mail：812416031@qq.com

通信作者 主任中药师，硕士生导师。研究方向：中药制剂开发与研究。电话：0760-89980219。E-mail：1432340131@qq.com

scores of HE staining and Masson staining were significantly increased ($P<0.01$). The protein expressions of α-SMA, Collagen Ⅰ, p-ERK1/2 and TGF-β_1 in lung tissue were up-regulated significantly ($P<0.01$). Compared with model group, above indexes of mice were improved significantly in linarin high-dose group ($P<0.05$ or $P<0.01$), and most of indexes (except for lung index) were improved significantly in linarin low-dose group ($P<0.05$ or $P<0.01$). *In vitro*, compared with blank group, the density of cells in the model group increased, and obvious proliferation and other changes occurred; protein expressions of α-SMA, Collagen Ⅰ and p-ERK1/2 were significantly up-regulated ($P<0.05$ or $P<0.01$). Compared with model group, the cell density of each concentration group was decreased and the morphology gradually returned to normal; the expressions of above proteins in linarin high-concentration group and the protein expression of p-ERK1/2 in linarin medium-concentration group were down-regulated significantly ($P<0.05$ or $P<0.01$). **CONCLUSIONS** Linarin may regulate ERK and inflammatory pathways to reduce the inflammatory response, thereby exerting anti-pulmonary fibrosis effect.

KEYWORDS linarin; pulmonary fibrosis; extracellular signal-regulated kinase pathway; inflammatory pathway

特发性肺纤维化(idiopathic pulmonary fibrosis,IPF)是一种进行性、致命性的疾病,主要表现为细胞外基质(extracellular matrix,ECM)沉积、肺间质纤维瘢痕化和肺部重塑[1]。近年来,IPF发病率呈持续上升趋势,且随年龄的增加而升高[2]。中医将IPF归为“肺痿”和“肺痹”,其治法为益气养阴、清热解毒、活血化瘀[3]。研究表明,诸多中药成分(如黄芩素、雷公藤内酯、芍药苷等)都显现出了较好的IPF治疗效果[4-7]。以中医药理论和传统用法为线索,从中药成分中开发治疗IPF新药的前体化合物具有重要价值。

黑面神*Breynia fruticosa*(Linn.)Hook.f为大戟科黑面神属植物,以干燥嫩枝叶及根入药,其性凉,微苦,归心、肝、肺经[8]。黑面神具有抗炎、抗病毒和免疫抑制等药理作用[9],由其组成的相关制剂可用于治疗慢性支气管炎[10]。本课题组前期从黑面神提取物中分离出了多种化合物,并进行初步药效筛选后发现其中的蒙花苷具有良好的抗肺纤维化药效。

据文献报道,蒙花苷具有抗炎镇痛、抗氧化、抗衰老等作用[11],而肺纤维化与炎症、氧化等有密切关联[1]。肺纤维化伴随着炎症发生和细胞因子释放。转化生长因子β_1(transforming growth factor beta 1,TGF-β_1)作为主要致肺纤维化的细胞因子,可促进胶原蛋白产生,进而导致纤维沉积[12]。TGF-β_1致肺纤维化作用与其下游的胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase,ERK)通路密切相关,在多种肺纤维化模型和病理组织中均发现磷酸化ERK(p-ERK)表达上调[13]。因此,本研究通过构建体内外肺纤维化模型,探讨蒙花苷对肺纤维化的改善作用,并基于炎症和ERK通路初步考察其作用机制,为抗IPF的新药研究提供实验基础。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用的主要仪器有HY-LWH03型微量液体气管内雾化装置(北京元森凯德生物技术有限公司);MULTISKAN型酶标仪(美国PerkinElmer公司);ECLIPSE TI2-A型倒置荧光显微镜(日本Nikon公司);2-16R型低温高速离心机(湖南恒诺仪器设备有限公司);MCO-18AICUUV型CO_2细胞培养箱(日本PHCbi公司);ChemiDoc MP型化学发光成像系统(美国Bio-Rad公司)。

1.2 主要药品与试剂

本研究所用的主要药品与试剂有蒙花苷对照品(四川萃益润生物科技有限公司,批号CYR-M0074210415,纯度98.5%),注射用盐酸博莱霉素(日本化药株式会社,批号Y00720,规格15 mg/瓶),吡非尼酮胶囊(北京康蒂尼药业股份有限公司,批号20211105,规格100 mg/颗),TGF-β_1(美国Peprotech公司,批号1020209),HFL1细胞专用培养基(武汉普诺赛生命科技有限公司),兔源α-平滑肌肌动蛋白(alpha-smooth muscle actin,α-SMA)、Ⅰ型胶原蛋白(type Ⅰ collagen,Collagen Ⅰ)多克隆抗体和辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔免疫球蛋白G(IgG)二抗(美国Cell Signaling公司,批号分别为8685T、72026T、7074P2),兔源甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase,GAPDH)、ERK1/2、磷酸化ERK1/2(p-ERK1/2)抗体(美国Affinity公司,批号分别为AF7021、AF0155、AF1015),肿瘤坏死因子α(tumor necrosis factor-α,TNF-α)和TGF-β_1酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(杭州联科生物技术股份有限公司,批号分别为A28220233、A98111123),白细胞介素6(interleukin-6,IL-6)ELISA试剂盒(江苏晶美生物科技有限公司,批号202203),二氨基联苯胺(diaminobenzidine,DAB)显色试剂盒(武汉塞维尔生物科技有限公司,货号G1212);水为自制纯化水。

1.3 动物

本研究所用动物为SPF级雄性C57BL/6J小鼠,共40只,8周龄,体质量(20±2)g,购自广东省医学实验动物中心,动物生产许可证号为SCXK(粤)2022-0002,质量合格证号为44007200100881。检疫合格后将其饲养于中山市中医院中药药理实验室动物房中(屏障环境),

动物使用许可证号为SYXK（粤）2020-0109。饲养条件为环境温度20～24 ℃，相对湿度50%～70%，明暗交替各12 h。所有动物实验流程均通过中山市中医院动物伦理委员会审核，批准文号为AEWC-2022034。

1.4 细胞株

人胚肺成纤维细胞HFL1购自武汉普诺赛生命科技有限公司（货号CL-0106）。

2 方法

2.1 体内实验

2.1.1 动物分组、造模及给药 将小鼠适应性饲养1周后，按体质量大小采用区间随机分组法分成正常组、模型组、蒙花苷低剂量组、蒙花苷高剂量组和阳性对照组，每组8只。除正常组外，其余各组小鼠均腹腔注射1%戊巴比妥钠麻醉，然后将其固定于操作台上，通过微量液体气管内雾化装置迅速给予每只小鼠50 μL博莱霉素（剂量为3 mg/kg）制备肺纤维化模型[14]；正常组小鼠则以同样方式给予等体积生理盐水。造模24 h后，蒙花苷低、高剂量组小鼠灌胃12.5、25 mg/kg蒙花苷（溶剂为0.5%羧甲基纤维素钠溶液，剂量根据预实验结果设置），阳性对照组小鼠灌胃200 mg/kg吡非尼酮（溶剂为0.5%羧甲基纤维素钠溶液，剂量为临床等效剂量），正常组和模型组小鼠灌胃等体积0.5%羧甲基纤维素钠溶液。每日给药1次，连续14 d。实验过程中，小鼠自由饮水及进食。

2.1.2 小鼠一般情况观察 实验过程中，每天观察各组小鼠的活动、毛发、饮食、体质量等一般情况。

2.1.3 取材 末次给药前，记录各组小鼠的体质量。末次给药2 h后，麻醉小鼠并摘眼球取血，将得到的全血在4 ℃条件下静置2 h，然后以3 500 r/min离心15 min，收集上层血清，将其冻存于－80 ℃冰箱中待测。采血后，处死小鼠，并解剖剥离其肺组织。

2.1.4 肺指数测定 称定剥离得到的干净肺组织的质量，按下列公式计算小鼠肺指数：肺指数（mg/g）＝肺质量（mg）/末次给药前小鼠体质量（g）。

2.1.5 肺组织病理学检查 取各组小鼠左肺组织适量，置于福尔马林溶液中固定24 h，经脱水、石蜡包埋、切片（厚度4 μm）后，常规进行苏木精-伊红（HE）染色和Masson染色，使用光学显微镜观察肺组织病理形态并采集图像。参照Ashcroft评分标准分别进行肺纤维化评分，评分越高表明肺纤维化程度越严重：0分——正常肺组织；1分——肺泡壁或支气管壁轻微增厚；3分——肺泡壁或支气管壁中度增厚，但肺泡结构没有明显破坏；5分——条索状纤维带或小范围纤维灶形成，肺泡结构明显破坏；7分——肺泡结构严重变形，广泛的纤维灶形成，呈“蜂窝肺”；8分——肺组织全视野纤维化病变；2、4、6分的病变严重程度介于相应分数之间[15]。

2.1.6 血清及肺组织中炎症指标检测 取“2.1.3”项下血清，常规解冻后按照ELISA试剂盒说明书检测血清中TGF-β_1、TNF-α水平；取右肺组织，加入磷酸盐缓冲液（PBS）制备组织匀浆，按照ELISA试剂盒说明书检测肺组织匀浆中IL-6水平。

2.1.7 肺组织中ERK及炎症相关通路蛋白表达检测 采用免疫组化法进行检测。制备小鼠肺组织切片（厚度3 μm），常规脱蜡及处理后，分别加入TGF-β_1、α-SMA、Collagen Ⅰ、p-ERK1/2抗体（稀释比例均为1∶200），按照试剂盒说明方法操作，封片后显微镜观察，采集图像并进行分析。以棕黄色颗粒沉积为阳性表达，用Image-Pro Plus 6.0软件计算各蛋白的平均光密度值。

2.2 体外实验

2.2.1 细胞培养 将HFL1细胞接种于HFL1细胞专用培养基中，置于37 ℃、5% CO_2培养箱中培养，每隔3 d进行传代换液1次，保证细胞活力为最佳状态。

2.2.2 细胞形态学观察 取处于对数生长期且状态良好的HFL1细胞接种于6孔板中，每孔细胞数约为1×10^5个，常规培养，次日贴壁后，将细胞分为空白组、模型组和蒙花苷低、中、高浓度组。其中，空白组加培养基；模型组加入TGF-β_1（10 ng/mL）溶液刺激形成肺纤维化细胞模型[16]；蒙花苷低、中、高浓度组分别加入3.7、7.4、14.8 mg/L蒙花苷（质量浓度根据预实验结果设置），同时加入TGF-β_1（10 ng/mL）溶液。培养48 h后，于倒置显微镜下拍照并观察HFL1细胞的形态学变化。

2.2.3 细胞中ERK及炎症相关通路蛋白表达检测 采用Western blot法进行检测。HFL1细胞的接种、分组及给药方式均同“2.2.2”项下。培养结束后加入RIPA裂解液裂解细胞，离心（4 ℃，10 000 r/min，10 min），收集上清液，采用BCA法测定上清液中总蛋白浓度，加入Loading buffer，96 ℃金属浴煮10 min使蛋白变性。采用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白组分（电压70～120 V，时间1.5 h），湿转法将蛋白转移到聚偏二氟乙烯膜上（恒流300 mA，时间2 h），用5%脱脂奶粉封闭2 h，以PBST洗膜3次；加入α-SMA、Collagen Ⅰ、ERK1/2、p-ERK1/2和GAPDH一抗（稀释比例均为1∶1 000），4 ℃孵育过夜，以PBST洗膜3次；加入二抗（稀释比例为1∶10 000），室温孵育2 h。采用化学发光成像系统曝光并拍照，采用Image-Pro Plus 6.0软件分析蛋白条带灰度值，以p-ERK1/2蛋白与ERK1/2蛋白条带灰度值的比值表示p-ERK1/2蛋白的表达水平，其余则以目的蛋白与内参蛋白（GAPDH）条带灰度值的比值表示目的蛋白的表达水平。实验重复3次。

2.3 统计学方法

采用SPSS 22.0软件进行统计学分析。计量资料以$\bar{x}\pm s$表示，多组间均数比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用LSD-t检验。检验水准$\alpha=0.05$。

3 结果

3.1 体内实验结果

3.1.1 蒙花苷对小鼠一般情况及肺指数的影响 与正常组比较，模型组小鼠摄食量、饮水量日渐减少，行动迟缓，皮毛粗糙、脱落严重，行为懒散，且身体机能有明显下降，主要表现为肢体协调性差、动作不灵敏，出现呼吸不畅、异常呼吸音，体质量显著降低（$P<0.01$）。与模型组比较，蒙花苷高剂量组和阳性对照组小鼠的上述症状和表现均明显好转，体质量显著升高（$P<0.05$）。肺指数测定结果显示，与正常组比较，模型组小鼠肺指数显著升高（$P<0.01$）；与模型组比较，蒙花苷高剂量组和阳性对照组小鼠肺指数均显著降低（$P<0.05$）。结果见表1。

表1 各组小鼠的体质量、肺指数测定结果（$\bar{x}\pm s$，$n=8$）

组别	体质量/g	肺指数/(mg/g)
正常组	21.64±0.39	6.37±0.11
模型组	15.35±0.74[a]	22.61±1.47[a]
蒙花苷低剂量组	16.91±0.65[b]	19.18±1.16
蒙花苷高剂量组	17.13±0.43	15.91±0.98[b]
阳性对照组	17.99±0.41[b]	17.02±0.63[b]

a：与正常组比较，$P<0.01$；b：与模型组比较，$P<0.05$

3.1.2 蒙花苷对肺组织病理学变化的影响 正常组小鼠肺组织结构正常，肺泡结构完整，无病理相关的炎症浸染、细胞坏死、纤维化等现象；与正常组比较，模型组小鼠肺泡壁显著增厚，肺泡均呈病理状态，存在大量炎症浸染及细胞纤维化病变（见图1、图2箭头处），HE染色评分和Masson染色评分均显著升高（$P<0.01$）；与模型组比较，各给药组小鼠肺组织炎症病变均显著减轻，肺泡壁增厚显著改善，纤维化沉积显著减轻，炎症浸染显著改善，HE染色评分和Masson染色评分均显著降低（$P<0.05$）。结果见图1、图2、表2。

表2 各组小鼠肺组织HE染色和Masson染色评分结果（$\bar{x}\pm s$，$n=8$，分）

组别	HE染色	Masson染色
正常组	1.17±0.30	1.33±0.21
模型组	5.67±0.33[a]	5.33±0.21[a]
蒙花苷低剂量组	4.17±0.47[b]	4.33±0.21[b]
蒙花苷高剂量组	3.33±0.42[b]	3.66±0.21[b]
阳性对照组	3.83±0.40[b]	3.83±0.31[b]

a：与正常组比较，$P<0.01$；b：与模型组比较，$P<0.05$

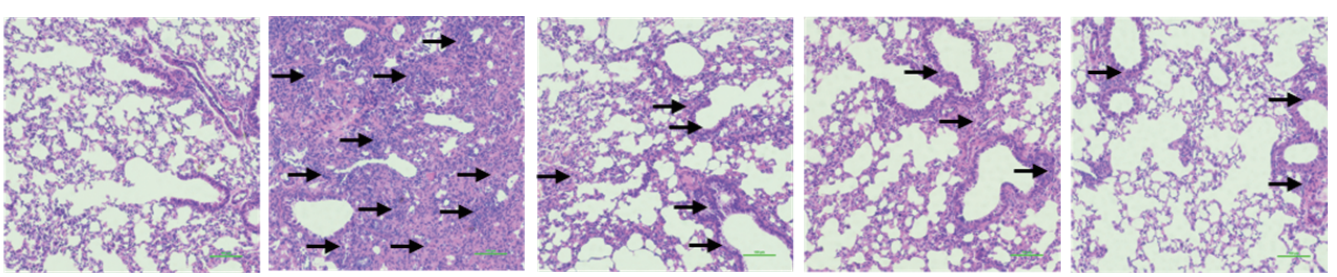
3.1.3 蒙花苷对小鼠血清及肺组织中炎症因子水平的影响 与正常组比较，模型组小鼠血清中TGF-β_1、TNF-α及肺组织中IL-6水平均显著升高（$P<0.01$）；与模型组比较，各给药组小鼠上述指标水平均显著降低（$P<0.05$或$P<0.01$）。结果见表3。

表3 各组小鼠血清中TNF-α、TGF-β_1及肺组织中IL-6水平测定结果（$\bar{x}\pm s$，$n=8$，pg/mL）

组别	血清TNF-α	血清TGF-β_1	肺组织IL-6
正常组	21.79±0.97	87.15±4.31	26.62±0.82
模型组	31.08±2.17[a]	132.50±5.43[a]	38.08±1.99[a]
蒙花苷低剂量组	22.45±1.76[b]	86.74±5.58[c]	31.92±1.57[b]
蒙花苷高剂量组	19.32±2.27[c]	72.58±3.63[c]	32.49±1.43[b]
阳性对照组	24.19±2.66[b]	98.02±2.01[c]	32.85±1.47[b]

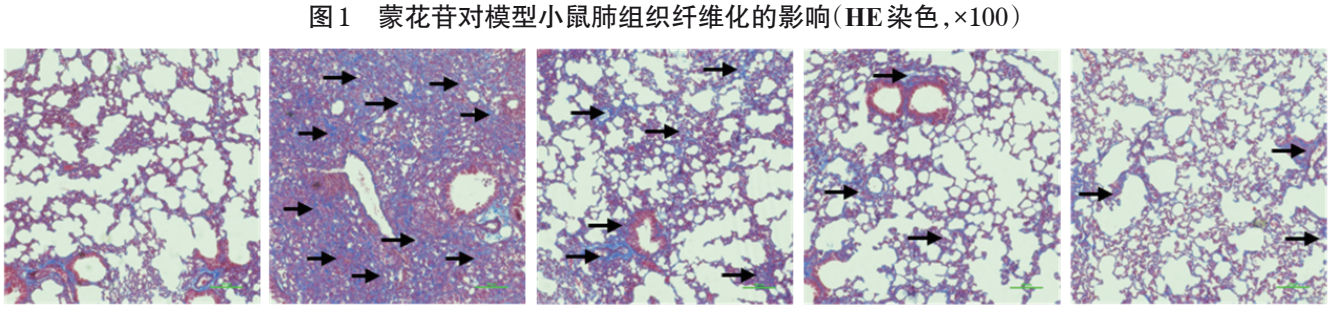
a：与正常组比较，$P<0.01$；b：与模型组比较，$P<0.05$；c：与模型组比较，$P<0.01$

3.1.4 蒙花苷对肺组织中ERK及炎症相关通路蛋白表达的影响 与正常组比较，模型组小鼠肺组织中α-SMA、TGF-β_1、Collagen Ⅰ和p-ERK1/2蛋白表达均显著上调（$P<0.01$）；与模型组比较，各给药组小鼠肺组织中上述蛋白表达均显著下调（$P<0.05$）。结果见图3、表4。



A.正常组 B.模型组 C.蒙花苷低剂量组 D.蒙花苷高剂量组 E.阳性对照组

图1 蒙花苷对模型小鼠肺组织纤维化的影响（HE染色，×100）



A.正常组 B.模型组 C.蒙花苷低剂量组 D.蒙花苷高剂量组 E.阳性对照组

图2 蒙花苷对模型小鼠肺组织纤维化的影响（Masson染色，×100）

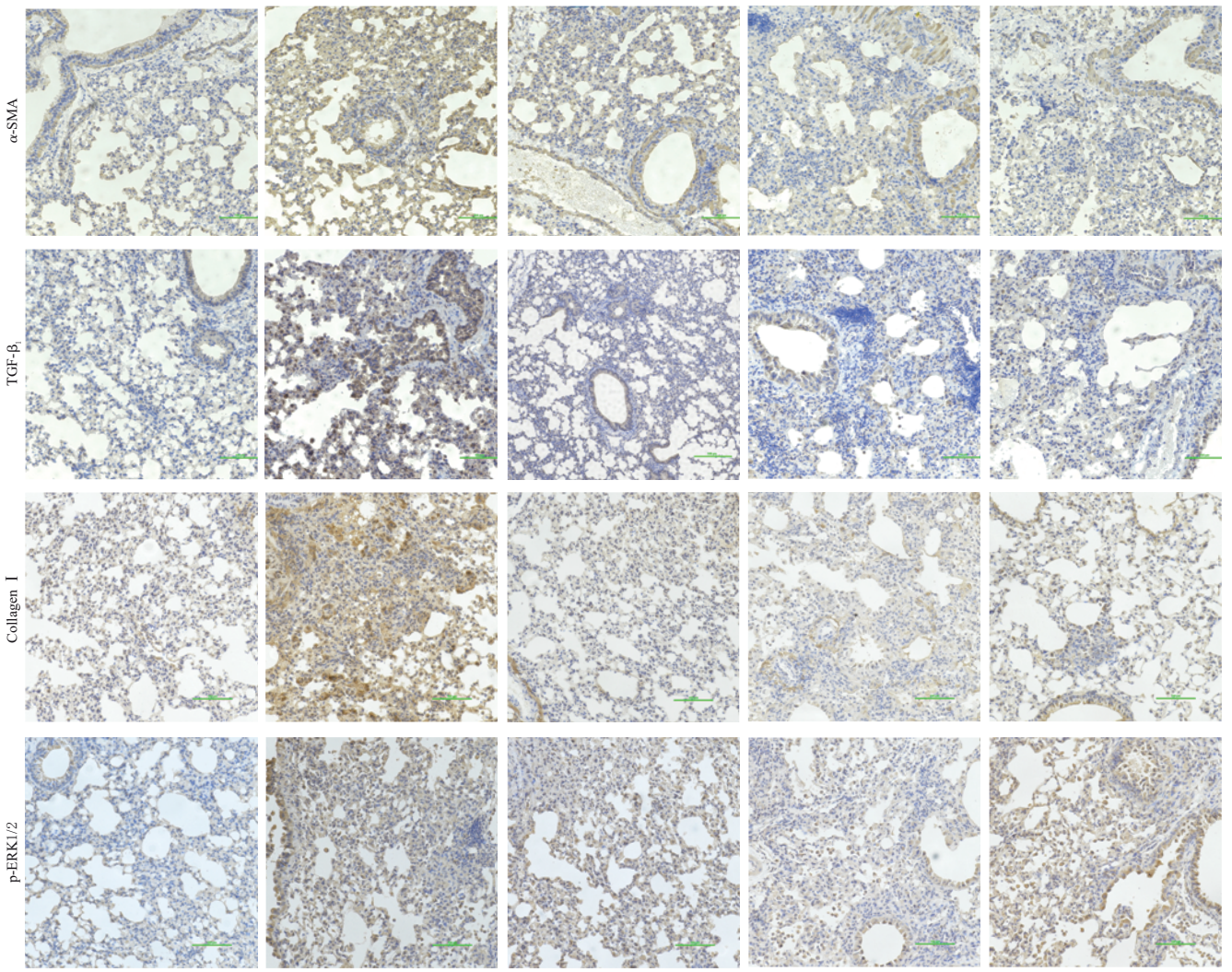


图3　各组小鼠肺组织中α-SMA、TGF-β$_1$、Collagen Ⅰ和p-ERK1/2蛋白表达的免疫组化图（×100）

表4　各组小鼠肺组织中ERK及炎症相关通路蛋白表达的光密度值测定结果（$\bar{x}\pm s$，$n=8$）

组别	α-SMA	TGF-β$_1$	Collagen Ⅰ	p-ERK1/2
正常组	0.13±0.01	0.12±0.01	0.16±0.01	0.15±0.02
模型组	0.22±0.01^a	0.17±0.01^a	0.26±0.01^a	0.20±0.01^a
蒙花苷低剂量组	0.19±0.02^b	0.16±0.01^b	0.16±0.01^b	0.16±0.01^b
蒙花苷高剂量组	0.17±0.01^b	0.14±0.01^b	0.15±0.01^b	0.13±0.01^b
阳性对照组	0.14±0.01^b	0.13±0.01^b	0.19±0.01^b	0.17±0.02^b

a：与正常组比较，$P<0.01$；b：与模型组比较，$P<0.05$

3.2　体外实验结果

3.2.1　蒙花苷对HFL1细胞形态的影响　与空白组比较，模型组HFL1细胞的密度变大，增殖明显，细胞形态从边界清晰、规则梭形变成边界模糊、扁平化梭形结构。与模型组比较，蒙花苷各浓度组细胞的密度变小，增殖明显受到抑制，细胞形态逐渐接近空白组，且呈浓度依赖性趋势，这说明蒙花苷可抑制TGF-β$_1$诱导的HFL1细胞的增殖和分化。结果见图4。

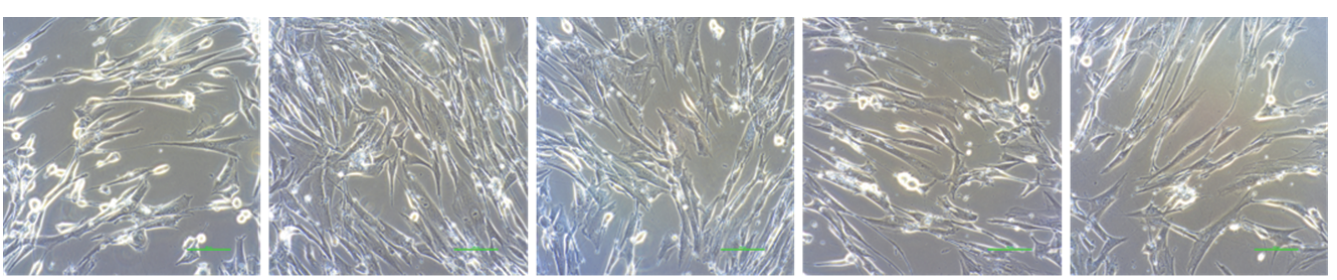


图4　各组HFL1细胞的形态学观察显微图（×100）

3.2.2　蒙花苷对HFL1细胞中α-SMA、Collagen Ⅰ及p-ERK1/2蛋白表达的影响　与空白组比较，模型组细胞中α-SMA、Collagen Ⅰ和p-ERK1/2蛋白表达均显著上调（$P<0.05$或$P<0.01$）；与模型组比较，蒙花苷高浓度组细胞中上述蛋白及蒙花苷中浓度组细胞中p-ERK1/2蛋白的表达均显著下调（$P<0.05$或$P<0.01$）。结果见图5、表5。

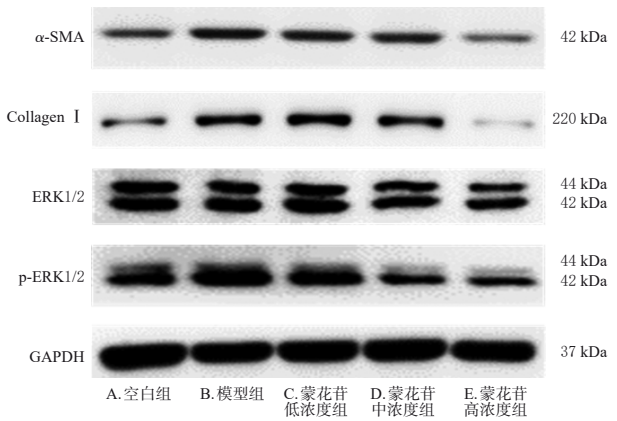


图5　各组细胞中α-SMA、Collagen Ⅰ、ERK1/2和p-ERK1/2蛋白表达的电泳图

表5　各组细胞中α-SMA、Collagen Ⅰ和p-ERK1/2蛋白表达水平测定结果（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

组别	α-SMA/GAPDH	Collagen Ⅰ/GAPDH	p-ERK1/2/ERK1/2
空白组	1.00±0.15	1.00±0.03	1.00±0.07
模型组	1.99±0.09[a]	2.11±0.14[b]	1.61±0.11[a]
蒙花苷低浓度组	1.57±0.16	2.15±0.03	1.19±0.07
蒙花苷中浓度组	1.57±0.16	1.94±0.17	0.83±0.03[c]
蒙花苷高浓度组	1.25±0.14[c]	0.55±0.23[d]	0.76±0.08[c]

a：与空白组比较，$P<0.05$；b：与空白组比较，$P<0.01$；c：与模型组比较，$P<0.05$；d：与模型组比较，$P<0.01$

4　讨论

慢性炎症反应是肺纤维化发病的主要机制之一，而胶原蛋白合成、致纤维化细胞因子释放、纤维沉积等也是目前抗肺纤维化研究的重要途径[17]。目前，临床常用吡非尼酮等化学药来延缓肺纤维化的进展，减少纤维化相关蛋白和细胞因子产生以及降低ECM的合成和积聚[18]，因此本研究选择吡非尼酮作为阳性药物进行对照研究。肺纤维化的进程与肺组织的炎症发生高度相关，TGF-β_1作为致纤维化的一个关键炎症因子，一直受到科学界的广泛关注[19]。在肺组织中，TGF-β_1能够刺激成纤维细胞促进ECM的合成和沉积，进而促进其他炎症因子（如TNF-α、IL-6等）的大量释放，而炎症因子可以介导纤维增生，并进一步活化炎症细胞，从而形成一系列连锁反应，产生级联放大效应，最终导致肺纤维化[19]。本研究结果表明，蒙花苷能够降低肺纤维化模型小鼠体内炎症因子TGF-β_1、TNF-α、IL-6的水平。此外，相比于模型组，蒙花苷给药组小鼠体质量、肺指数均有不同程度改善，说明其具有改善肺纤维化的效果。

在肺纤维化体内模型中，肌成纤维细胞会过度表达α-SMA并分泌ECM相关蛋白，尤其是Collagen Ⅰ蛋白，这会进一步造成ECM沉积，最终演化成纤维化组织[5]。因此，α-SMA和Collagen Ⅰ蛋白作为肺纤维化的标志性蛋白，常作为评判肺纤维化程度的重要指标。TGF-β_1是肺纤维炎症机制中的关键靶点，而ERK通路是TGF-β_1的下游信号通路。p-ERK1/2蛋白作为ERK通路的关键蛋白，在ERK通路中起到重要调控作用[13]。相关研究发现，p-ERK1/2蛋白表达增加会进一步诱导肺纤维化的发生[13]。本研究在体内实验中通过免疫组化染色发现，蒙花苷能够显著下调肺纤维化标志性蛋白α-SMA、Collagen Ⅰ的表达，降低小鼠肺组织中p-ERK1/2蛋白表达；而在体外实验中，Western blot结果也显示出了相同的趋势。因此，笔者推测蒙花苷可能是基于ERK通路起到改善肺纤维化的作用。

综上所述，本研究经过体内外实验证实了蒙花苷可能是通过调控ERK及炎症相关通路，抑制炎症因子释放来改善炎症浸润，从而发挥抗肺纤维化作用，但其具体作用机制仍有待进一步研究。

（利益冲突：所有作者均声明不存在任何利益冲突）

参考文献

[1] NOBLE P W, BARKAUSKAS C E, JIANG D H. Pulmonary fibrosis: patterns and perpetrators[J]. J Clin Invest, 2012, 122(8): 2756-2762.

[2] MAHER T M, BENDSTRUP E, DRON L, et al. Global incidence and prevalence of idiopathic pulmonary fibrosis [J]. Respir Res, 2021, 22(1): 197.

[3] 王彦君，王雪林，李欣泽，等. 中医药治疗特发性肺纤维化研究[J]. 中国中医基础医学杂志，2021，27(6)：1033-1035.

[4] LI L C, KAN L D. Traditional Chinese medicine for pulmonary fibrosis therapy: progress and future prospects[J]. J Ethnopharmacol, 2017, 198: 45-63.

[5] GAO Y, LU J, ZHANG Y, et al. Baicalein attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats through inhibition of miR-21[J]. Pulm Pharmacol Ther, 2013, 26(6): 649-654.

[6] JI Y, DOU Y N, ZHAO Q W, et al. Paeoniflorin suppresses TGF-β mediated epithelial-mesenchymal transition in pulmonary fibrosis through a Smad-dependent pathway[J]. Acta Pharmacol Sin, 2016, 37(6): 794-804.

[7] CHEN C, YANG S M, ZHANG M, et al. Triptolide mitigates radiation-induced pulmonary fibrosis via inhibition of axis of alveolar macrophages-NOXes-ROS-myofibroblasts [J]. Cancer Biol Ther, 2016, 17(4): 381-389.

[8] 广东省药品监督管理局. 广东省中药材标准：第三册[S]. 广州：广东科技出版社，2018：420.

（下转第344页）