

• 实验研究 •

补肺活血胶囊对小鼠肺纤维化作用及机制

李鹏, 刘怡, 王凤婵, 赵国静, 韩萍, 周佩夏, 叶海燕, 王坤, 胡海波, 陆学超*

青岛大学附属青岛市海慈医院 青岛市中医医院, 山东 青岛 266033

摘要: **目的** 探究补肺活血胶囊对小鼠肺纤维化的影响及作用机制。**方法** 90 只 C57BL/6J 小鼠随机分为对照组、模型组、NLRP3 抑制剂 (MCC950, 10 mg/kg) 组、补肺活血胶囊 (0.32、0.63、1.62 g/kg) 组, 每组 15 只小鼠。通过对小鼠气管内单次注射 2.5 mg/kg 的博来霉素来诱导肺纤维化, 对照组小鼠接受单次气管注射等体积的磷酸缓冲盐溶液 (PBS)。造模成功后第 1 天开始给药, 持续给药 21 d。统计小鼠每天的存活率和体质量, 采集小鼠肺泡灌洗液 (BALF) 并测定总细胞与总蛋白, 测定小鼠肺组织湿干质量比 (W/D) 与羟脯氨酸 (HYP); 采用苏木精-伊红 (HE) 染色和 Masson 染色观察肺组织病理学变化, 采用 qRT-PCR 检测上皮间质转化 (EMT) 相关蛋白[E-钙黏蛋白 (E-cad)、波形蛋白 (Vim)、 α -平滑肌肌动蛋白 (α -SMA)、转化生长因子 β 1 (TGF- β 1)] 的 mRNA 表达; 采用 Western blotting 检测 EMT 相关蛋白以及 Nod 样受体蛋白 3 (NLRP3) 通路相关蛋白[NLRP3、凋亡相关斑点样蛋白 (ASC)、mature-半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 (Caspase-1)、mature-白细胞介素 (IL)-1 β 、mature-IL-18] 表达。**结果** 相较于模型组, MCC950 与补肺活血胶囊干预后肺纤维化小鼠存活率明显提高, 体质量明显增加, 肺组织 W/D、BALF 总细胞与总蛋白、HYP 含量均明显降低 ($P < 0.05$ 、 0.01); 肺组织病理形态明显改善; 肺组织上皮细胞标志物 E-cad mRNA 及蛋白的表达增加, 间质细胞标志物 Vim、 α -SMA、TGF- β 1 mRNA 和蛋白的表达下降, NLRP3 信号通路中相关蛋白表达水平降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)。**结论** 补肺活血胶囊能通过抑制 NLRP3 通路介导的 EMT 改善博来霉素诱导的肺纤维化程度。

关键词: 补肺活血胶囊; 博来霉素; 肺纤维化; Nod 样受体蛋白 3; 上皮间质转化; 羟脯氨酸

中图分类号: R965; R974 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2024)02-0273-08

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2024.02.001

Effect and mechanism of Bufei Huoxue Capsules on pulmonary fibrosis in mice

LI Peng, LIU Yi, WANG Fengchan, ZHAO Guojing, HAN Ping, ZHOU Peixia, YE Haiyan, WANG Kun, HU Haibo, LU Xuechao

Qingdao Hiser Hospital Affiliated of Qingdao University, Qingdao Traditional Chinese Medicine Hospital, Qingdao 266033, China

Abstract: Objective To investigate the effect and mechanism of Bufei Huoxue Capsules on pulmonary fibrosis in mice. **Methods** A total of 90 C57BL/6J mice was randomly divided into control group, model group, NLRP3 inhibitor (MCC950, 10 mg/kg), and Bufei Huoxue Capsules (0.32, 0.63, and 1.62 g/kg) group, each group had 15 mice. Mice were given a single intratracheal injection of 2.5 mg/kg bleomycin to induce pulmonary fibrosis, mice in the control group received a single intratracheal injection of an equal volume of PBS. The drug was administered first day after successful modeling, and the whole administration process lasted for 21 d. The survival rate and body weight of mice were counted. Bronchoalveolar lavage fluid (BALF) was collected and the total cell count and total protein were determined. The wet/dry weight ratio (W/D) and hydroxyproline (HYP) of lung tissue were measured. The pathological changes of lung tissue were observed by hematoxylin and eosin (HE) staining and Masson trichrome staining. qRT-PCR was used to detect the mRNA expression of EMT-related proteins (E-cad, VIM, α -SMA, and TGF- β 1). Western blotting was used to detect the expression of EMT-related proteins and NLRP3 pathway-related proteins (NLRP3, ASC, mature-Caspase-1, mature-IL-1 β , mature-IL-18). **Results** Compared with the model group, the survival rate of pulmonary fibrosis mice after MCC950 and Bufei Huoxue Capsules intervention was significantly improved, the body weight was significantly increased, the W/D of lung tissue, the

收稿日期: 2023-11-27

基金项目: 山东省中医药科技项目 (2020Q074); 青岛市中医药科研项目 (2019-WJZD053)

作者简介: 李鹏, 男, 主治医师, 硕士, 研究方向为中西医结合防治呼吸系统疾病。E-mail: lipeng3402@163.com

*通信作者: 陆学超, 男, 主任医师, 博士, 研究方向为中西医结合防治呼吸系统疾病。E-mail: hospitalbreathing@163.com

total cell count and total protein and HYP content of BALF were significantly decreased ($P < 0.05, 0.01$), the pathological morphology of lung tissue was significantly improved, the expression of epithelial cell marker *E-cad* mRNA and protein in lung tissue was increased, the expression of mesenchymal cell marker *Vim*, α -SMA, *TGF- β 1* mRNA and protein was decreased, and the expression of related proteins in NLRP3 signaling pathway was decreased ($P < 0.05, 0.01$). **Conclusion** Bufo Huoxue Capsules can improve bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice by inhibiting NLRP3 pathway-mediated EMT.

Key words: Bufo Huoxue Capsules; bleomycin; pulmonary fibrosis; NLRP3; EMT; HYP

肺纤维化是许多间质性肺部疾病的终末结局,可导致呼吸困难或呼吸衰竭,确诊后平均预期寿命仅为 3 年^[1]。尽管当前有大量关于肺纤维化的研究,但通过化学药治疗肺纤维化的效果并不理想^[2]。面对逐年上涨的肺纤维化发病率,以其关键发病机制为出发点,着力于研发高效治疗药物对于改善肺纤维化患者预后,提高其生活质量具有重要的意义。

补肺活血胶囊由黄芪、赤芍、补骨脂组成,可益气活血、补肺固肾,常用于临床肺纤维化、慢性阻塞性肺疾病、重症肺炎等疾病的治疗。研究表明,补肺活血胶囊可以减少肺组织中炎症因子的分泌,改善肺炎性损伤及纤维化样变的程度^[3],一定程度上能延缓肺功能下降,改善临床症状^[4]。然而其具体的作用机制尚不明确。本研究拟通过博来霉素建立小鼠肺纤维化模型,并用补肺活血胶囊进行治疗。通过小鼠存活率、鼠肺泡灌洗液(BALF)总细胞与总蛋白、肺组织湿干质量比(W/D)与羟脯氨酸(HYP)和肺组织病理学变化研究补肺活血胶囊对肺纤维化小鼠的治疗作用,并基于 Nod 样受体蛋白 3(NLRP3)通路研究补肺活血胶囊对肺纤维化小鼠上皮间质转化(EMT)的影响,以期阐明补肺活血胶囊治疗肺纤维化的机制,为补肺活血胶囊临床应用治疗肺纤维化提供科学依据。

1 材料

1.1 动物

90 只 SPF 级健康雄性 C57BL/6 小鼠,体质量 20~22 g,购买于北京华阜康生物科技股份有限公司,动物许可证号 SCXK(京)2019-0008。每 5 只小鼠一笼,饲养于室温(21 ± 2)℃,相对湿度 50%~60%,明暗 12 h/12 h 的环境并使小鼠自由进食饮水。本研究经青岛市中医医院伦理委员会批准,审批号 2024HC01LS12。

1.2 药品与试剂

NLRP3 抑制剂 MCC950(货号 S8930,美国 Selleck 公司);博来霉素(货号 M2100,美国 AbMole 公司);补肺活血胶囊(规格 0.35 g/粒,批号 155532,广东雷允上药业有限公司);BCA 法微量蛋白检测

试剂盒(货号 W041-1-1,南京建成生物工程研究所);牛血清白蛋白(BSA,货号 W071-1-1,南京建成生物工程研究所);Masson 染液(货号 D026-1-3,南京建成生物工程研究所);苏木素-伊红(HE)染液(货号 D006-1-4,南京建成生物工程研究所);HYP 检测试剂盒(碱水解法,货号 A030-2-1,南京建成生物工程研究所);羊抗鼠 IgG-辣根过氧化物酶(HRP,货号 KS001,南京建成生物工程研究所);羊抗兔 IgG-HRP(货号 KS002,南京建成生物工程研究所);抗体: β -肌动蛋白(β -actin,货号 3700)、E-钙黏蛋白(E-cad,货号 14472)、波形蛋白(Vim,货号 3932)、 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA,货号 69319)、转化生长因子- β (TGF- β ,货号 3711)、NLRP3(货号 15101)、凋亡相关斑点样蛋白(ASC,货号 67824)、cleaved-半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶(Caspase-1,货号 89332)、mature-白细胞介素(IL)-1 β (货号 63124)、mature-IL-18(货号 57058),Cell Signaling Technology;试剂盒:总 RNA 提取试剂盒(货号#DP419)、cDNA 反转录试剂盒(货号#KR116-02)、SYBR 扩增试剂盒(货号#P205-02,天根生化科技(北京)有限公司)。

1.3 仪器

LP-5117 型多功能酶标仪(长春乐谱科技有限公司);PowerPAC Basic 电泳仪和 ChemiDoc XRS 凝胶成像自动分析仪(Bio-Rad 公司);H3-18KR 型高速冷冻离心机(湖南可成仪器设备有限公司);MDF-C8V(N)型-80℃冷冻冰箱(日本 SANYO 公司);LEPGEN-96 荧光定量 PCR 仪[乐普(北京)医疗器械股份有限公司]。

2 方法

2.1 造模、分组与给药

将 C57BL/6 小鼠随机分为对照组、模型组、NLRP3 抑制剂(MCC950)组及补肺活血胶囊低、中、高(0.32、0.63、1.26 g/kg)组,每组 15 只。通过对小鼠气管内单次注射 2.5 mg/kg 博来霉素来诱导肺纤维化。对照组小鼠接受单次气管内注射等体积的磷酸缓冲盐溶液(PBS)。在接受气管注射后

第 1 天开始, MCC950 组每天 ip 10 mg/kg MCC950, 补肺活血胶囊组每天分别 ig 0.32、0.63、1.26 g/kg 补肺活血胶囊。补肺活血胶囊剂量根据等效剂量换算公式(等效剂量=成人每日剂量/70×9.1)计算得出, 其中中剂量为人等效剂量, 低剂量为等效剂量的 1/2 倍, 高剂量为等效剂量的 2 倍。给药前确定小鼠体质量, 以便准确计算所需药物量。将胶囊中的细粉颗粒按照高剂量浓度溶于生理盐水, 之后使用生理盐水分别梯度稀释为中剂量和低剂量, 按照每只小鼠接受 0.2 mL 药物溶液进行配制。对照组与模型组每天分别 ig 等体积的生理盐水, 整个给药过程持续 21 d。给药过程中, 每天统计各组小鼠存活的数量。在接受气管注射后第 22 天, 小鼠以颈椎脱臼法被处死, 称质量并收集样本。

2.2 肺组织标本采集与病理学染色

小鼠处死后, 切开胸腔并充分暴露颈部气管。结扎右肺后, 用 4 ℃ 的 PBS 对左肺进行 3 次灌洗, 每次 0.5 mL, 回收的液体即为 BALF, 灌洗后的左肺摘下在-80 ℃ 冰箱保存。然后将 BALF 在 4 ℃ 下以 150×g 离心 5 min, 并将灌洗液的上清液储存在-80 ℃, 用总蛋白测定试剂盒分析总蛋白含量。将 BALF 样品的细胞颗粒重新悬浮在 PBS 中进行细胞计数。

BALF 收集完成后, 摘取结扎的右肺放入 4% 多聚甲醛固定, 取下叶称取湿质量 (W), 然后置于 60 ℃ 烘箱中烘干 72 h 后称取干质量 (D), 计算肺组织湿干质量比 (W/D)。剩余右肺嵌入石蜡包埋后, 制成 3 μm 的切片进行染色。进行苏木精-伊红 (HE) 染色和 Masson 染色, 通过光学显微镜观察结果以评估肺部炎症和胶原沉积的水平。采用 Szapiel 量化方法对 HE 染色进行评估^[5], 采用改良的 Ashcroft 量化方法对 Masson 染色进行评估^[6]。

2.3 肺组织 HYP 测定

精准称量 30 mg 肺组织, 使用生化试剂盒测定肺部胶原蛋白主成分 HYP 的水平。HYP 氧化后与二甲氨基苯甲醛反应显紫红色, 用酶标仪在 550 nm 波长处测定。

2.4 qRT-PCR 检测 EMT 相关蛋白的 mRNA 表达

使用总 RNA 提取试剂盒从肺组织及细胞中获得总 RNA。再使用反转录试剂盒获得 cDNA。使用 qPCR 法测定 *E-cad*、*Vim*、*α-SMA*、*TGF-β1* mRNA 表达量。引物序列见表 1, 使用 2^{-ΔΔCt} 法基于 β-actin 计算目标 mRNA 相对表达量。

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequence

基因名称	引物序列 (5'→3')	引物长度/bp
<i>E-cad</i>	上游: AACCCAAGCACGTATCAGGG	94
	下游: GAGTGTGGGGGCATCATCA	
<i>Vim</i>	上游: TGCTTCAAGACTCGGTGGAC	133
	下游: AAGCGCACCTTGTCGATGTA	
<i>α-SMA</i>	上游: GTACCACCATGTACCCAGGC	156
	下游: GCTGGAAGGTAGACAGCGAA	
<i>TGF-β1</i>	上游: ACTGGAGTTGTACGGCAGTG	123
	下游: GGGGCTGATCCCGTTGATTT	
<i>β-actin</i>	上游: CCCCTGAACCCTAAGGCCA	83
	下游: ATGGCTACGTACATGGCTGG	

2.5 Western blotting 检测 EMT 以及 NLRP3 信号通路相关蛋白表达

将肺组织及细胞放入含 1 mmol/L PMSF 的冰冷的 RIPA 缓冲液中进行超声均质提取总蛋白。使用 BCA 蛋白检测试剂盒测定上清液中的蛋白浓度。提取的蛋白质通过 SDS-PAGE 分离后电转到 PVDF 膜。使用 5% 脱脂奶粉溶液封闭膜 1 h, 随后用 *E-cad*、*VIM*、*α-SMA*、*TGF-β1*、*NLRP3*、*ASC*、*cleaved-Caspase-1*、*cleaved-IL-1β*、*cleaved-IL-18* 的抗体在 4 ℃ 下培养过夜。用 TBST 清洗 3 次孵育后的膜, 然后用 HRP 标记的二抗在室温下培养 1 h, 再次洗膜后经 ECL 化学发光显影, 最后使用 Image J 软件对条带进行量化分析。

2.6 统计学分析

采用 Excel 2019 和 SPSS Pro 在线数据分析平台进行数据分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 *t* 检验。

3 结果

3.1 补肺活血胶囊对肺纤维化小鼠存活率的影响

给药结束后, 对照组小鼠存活率为 100%, 模型组小鼠存活率为 47%, MCC950 和补肺活血胶囊干预可显著增加肺纤维化小鼠存活率。MCC950 组存活率为 67%, 补肺活血胶囊 0.32、0.63、1.26 g/kg 组存活率分别为 60%、67%、73%, 见图 1。

3.2 补肺活血胶囊对肺纤维化小鼠体质量、肺组织 W/D 的影响

与模型组相比, MCC950 组、补肺活血胶囊 1.26 g/kg 组体质量显著升高 ($P<0.01$); MCC950 组和补肺活血胶囊 0.63、1.26 g/kg 组肺组织 W/D 显著降低 ($P<0.05$ 、 0.01), 见图 2。

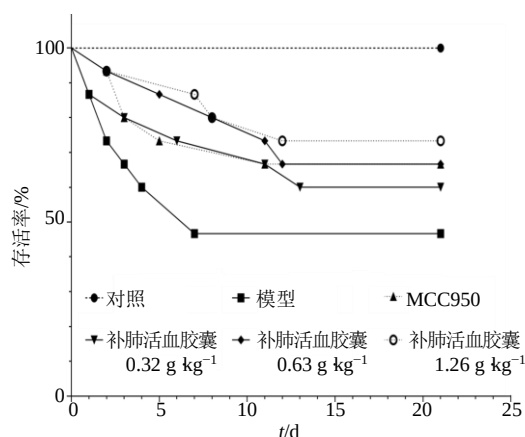
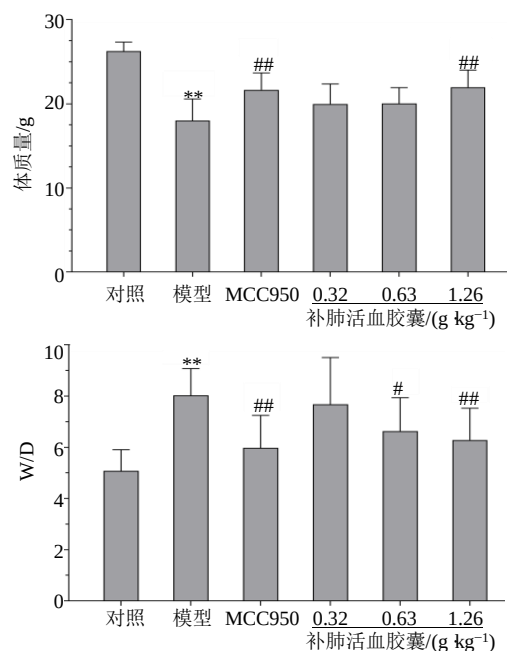


图 1 肺纤维化小鼠存活率 (n = 15)

Fig. 1 Survival rate of mice with pulmonary fibrosis (n = 15)



与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$.
** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs model group.

图 2 肺纤维化小鼠体质量和肺组织 W/D ($\bar{x} \pm s$, n = 15)

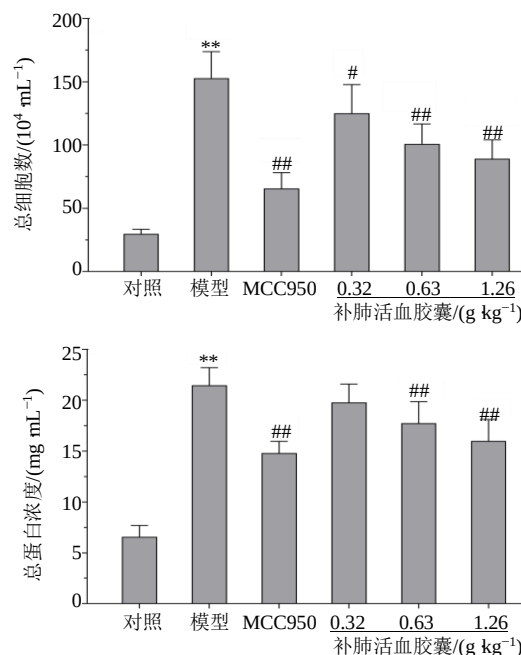
Fig. 2 Body mass and W/D of mice with pulmonary fibrosis ($\bar{x} \pm s$, n = 15)

3.3 补肺活血胶囊对肺纤维化小鼠 BALF 总细胞数和总蛋白的影响

与模型组相比, MCC950 组、补肺活血胶囊各剂量组 BALF 总细胞数显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01); MCC950 组和补肺活血胶囊 0.63、1.26 g/kg 组总蛋白浓度显著降低 ($P < 0.01$), 见图 3。

3.4 补肺活血胶囊对肺纤维化小鼠肺组织病理的影响

HE 染色显示, 对照组肺组织未发现肺炎性



与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$.

** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs model group.

图 3 BALF 总细胞数和总蛋白浓度 ($\bar{x} \pm s$, n = 15)

Fig. 3 Total cell count and total protein concentration of BALF ($\bar{x} \pm s$, n = 15)

渗出及纤维化病变, 肺泡结构清晰; 模型组肺部结构发生了扭曲, 肺间质细胞数量增加, 纤维组织增生、纤维化, 肺泡腔增大、融合; MCC950、补肺活血胶囊干预后, 肺纤维化小鼠肺组织病理化程度减轻, 肺组织结构完整性提升, 肺泡间隔厚度减少, 炎性细胞浸润减少。与模型组比较, MCC950 组和补肺活血胶囊各剂量组 Szapiel 评分显著降低 ($P < 0.01$), 见图 4。

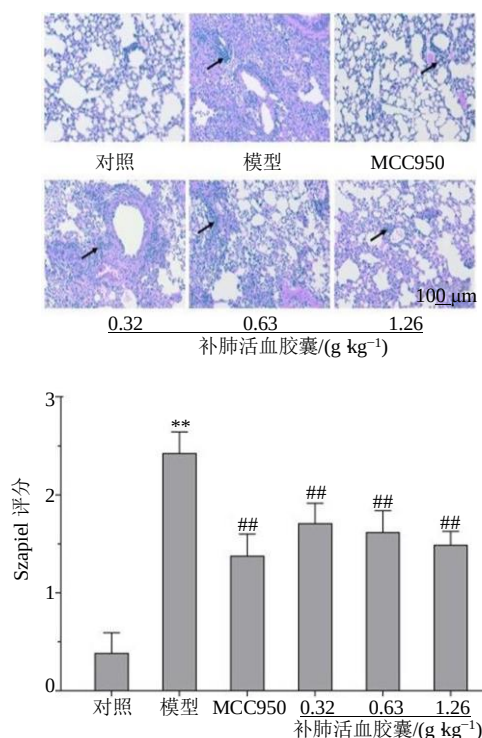
Masson 染色显示, 对照组小鼠肺组织结构形态正常; 模型组肺间质中存在明显的蓝色胶原蛋白沉积, 呈大片束状及片状分布, 肺组织纤维化程度严重; MCC950、补肺活血胶囊干预后肺纤维化小鼠肺组织中蓝色胶原蛋白沉积减少, 肺纤维化程度明显减轻。与模型组比较, MCC950 组和补肺活血胶囊各剂量组 Ashcroft 评分显著降低 ($P < 0.01$), 见图 5。

3.5 补肺活血胶囊对肺纤维化小鼠 HYP 的影响

与模型组比较, MCC950 组和补肺活血胶囊 0.63、1.26 g/kg 组 HYP 含量显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01), 见图 6。

3.6 补肺活血胶囊对 EMT 相关蛋白 mRNA 和蛋白表达的影响

qRT-PCR 结果显示, 与模型组相比, MCC950



与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: ## $P < 0.01$ 。

** $P < 0.01$ vs control group; ## $P < 0.01$ vs model group.

图 4 肺纤维化小鼠肺组织 HE 染色及 Szapiel 量化评分 ($\bar{x} \pm s$, $n = 15$)

Fig. 4 HE staining and Szapiel quantitative score of lung tissue of mice with pulmonary fibrosis ($\bar{x} \pm s$, $n = 15$)

组、补肺活血胶囊各剂量组中的 Vim、 α -SMA、TGF- β 1 mRNA 表达明显降低, E-cad mRNA 表达明显升高 ($P < 0.05$ 、 0.01), 见图 7。

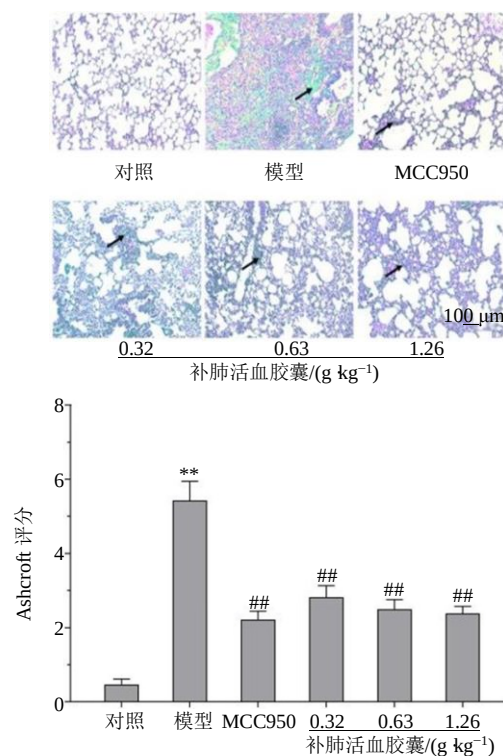
Western blotting 结果显示, 与模型组相比, MCC950 组、补肺活血胶囊各剂量组的 Vim、 α -SMA、TGF- β 1 蛋白表达明显降低, E-cad 表达水平明显升高 ($P < 0.05$ 、 0.01), 见图 8。

3.7 补肺活血胶囊对 NLRP3 信号通路表达蛋白的影响

与模型组相比, MCC950 组、补肺活血胶囊各剂量组的 NLRP3、ASC、mature-Caspase-1、mature-IL-1 β 、mature-IL-18 蛋白表达水平均明显降低 ($P < 0.05$ 、 0.01), 见图 9。

4 讨论

博来霉素作为一种化学治疗性抗生素, 被广泛应用于肺纤维化动物模型的制作^[11]。本研究通过博来霉素建立肺纤维化模型小鼠。MCC950 与补肺活血胶囊给药治疗后, 肺纤维化小鼠生存率明显提高, 体质量明显增加, 肺组织 W/D、BALF 总细胞与总蛋白、羟脯氨酸含量均明显降低, 肺纤维化进

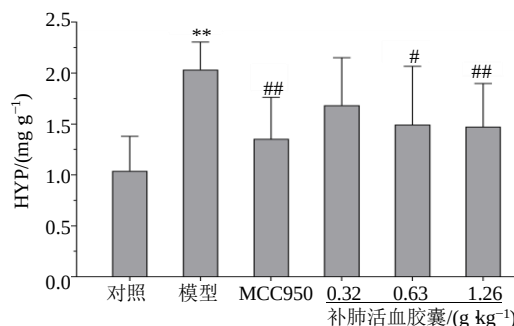


与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: ## $P < 0.01$ 。

** $P < 0.01$ vs control group; ## $P < 0.01$ vs model group.

图 5 肺纤维化小鼠肺组织 Masson 染色及 Ashcroft 量化评分 ($\bar{x} \pm s$, $n = 15$)

Fig. 5 Masson staining and Ashcroft quantitative score of lung tissue of mice with pulmonary fibrosis ($\bar{x} \pm s$, $n = 15$)



与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ 。

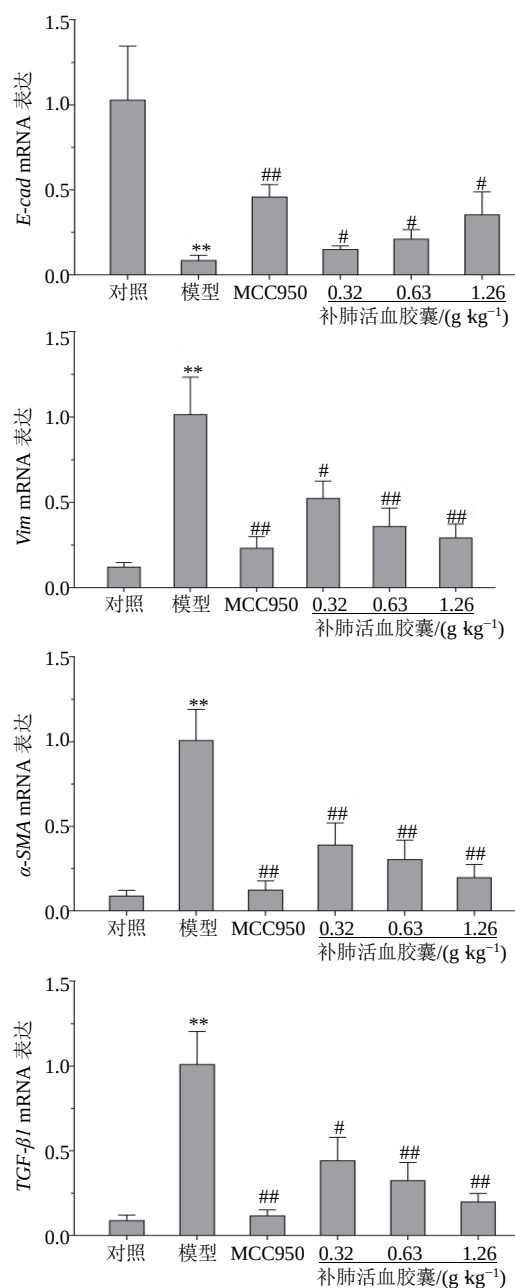
** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs model group.

图 6 肺纤维化小鼠 HYP 含量 ($\bar{x} \pm s$, $n = 15$)

Fig. 6 HYP content in mice with pulmonary fibrosis ($\bar{x} \pm s$, $n = 15$)

程明显改善, 补肺活血胶囊治疗效果明显。

后续本研究探讨了补肺活血胶囊对肺纤维化小鼠 EMT 的影响, 结果显示, 补肺活血胶囊干预后可提高肺纤维化小鼠肺组织 E-cad 表达, 降低 VIM、 α -SMA、TGF- β 1 表达。过度的 EMT 在肺纤维化发展中起到了关键性的作用。EMT 是上皮细胞



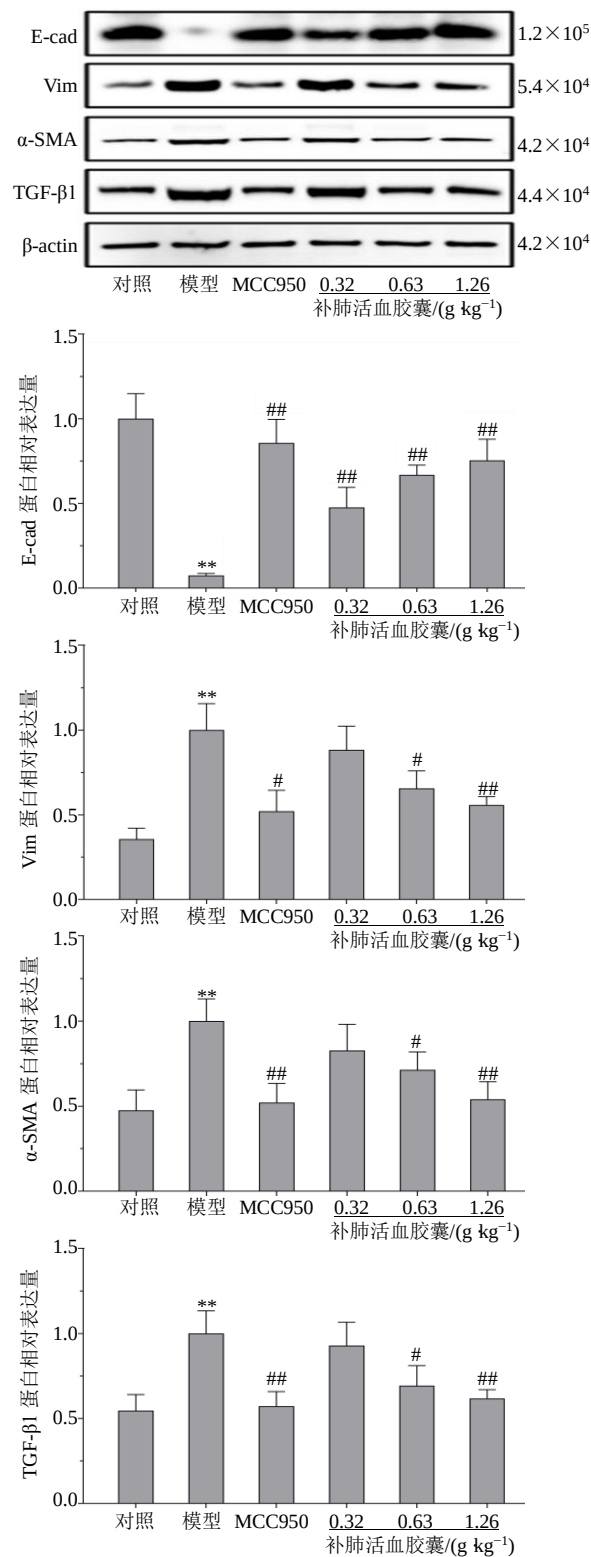
与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ 。

** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs model group.

图 7 补肺活血胶囊对 EMT 相关 mRNA 的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 15$)

Fig. 7 Effect of Bufei Huoxue Capsules on EMT-related mRNA ($\bar{x} \pm s$, $n = 15$)

表型的转变, 这个过程中上皮细胞失去其部分特征和标记从而获得间质细胞的标记, 在各种损伤刺激下分化的上皮细胞经过表型转化可形成大量的成纤维细胞以及肌成纤维细胞, 而肌成纤维细胞则可以通过细胞外基质 (ECM) 的过度积累促进肺纤维化的发展^[12]。在 EMT 过程中, 上皮细胞基因表达

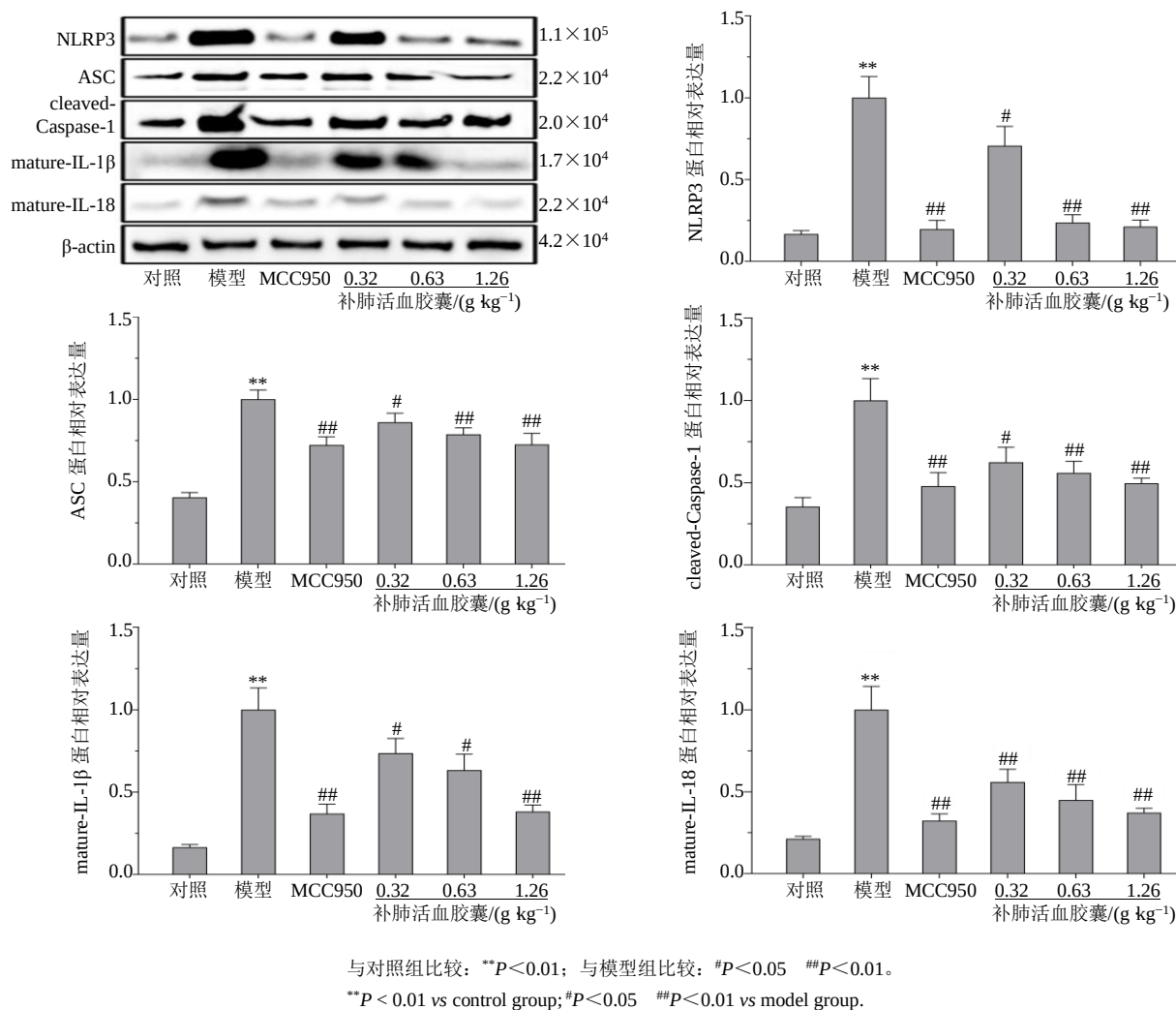


与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ 。

** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs model group.

图 8 补肺活血胶囊对 EMT 相关表达蛋白的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 15$)

Fig. 8 Effect of Bufei Huoxue Capsules on EMT-related expression proteins ($\bar{x} \pm s$, $n = 15$)

图 9 补肺活血胶囊对 NLRP3 信号通路表达蛋白的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 15$)Fig. 9 Effect of Bufe Huoxue capsule on NLRP3 signaling pathway ($\bar{x} \pm s$, $n = 15$)

受到抑制导致上皮细胞标记物如 E-cad 蛋白表达减少, 间质细胞基因表达激活导致间质细胞标记物如 Vim、 α -SMA、蛋白表达增加^[13], 因此可以通过检测相关蛋白以及 mRNA 的变化来表征 EMT 的发生发展。TGF- β 1 是 ECM 过度积累、成纤维细胞增殖和分化为肌成纤维细胞的主要诱导剂, 即肺纤维化中诱导 EMT 发生的关键因子, 抑制 TGF- β 1 的表达可改善 EMT 的发展^[14-15]。

近年来有许多研究证实 EMT 的促进可能与激活 NLRP3 炎症小体信号通路有关, 这种变化会加剧肿瘤细胞的侵袭与迁移, 而其在肺纤维化发生发展过程中所起的作用鲜有研究^[16-18]。NLRP3 炎症小体是由 NLRP3、ASC、Caspase-1 组成的多蛋白复合物, 当 NLRP3 被激活时会促进 NLRP3 炎症小体各组分 (NLRP3、ASC、Caspase-1) 的组装, 进而激活 pro-Caspase-1 形成具有活性的 cleaved-

Caspase-1, 对炎症因子 IL-1 β 和 IL-18 进行切割并使其成熟, mature-IL-1 β 可以刺激 TGF- β 1 合成, 而 TGF- β 1 是 EMT 发生发展的关键性因子, TGF- β 1 合成增加将加剧肺泡 EMT 进程, 从而加速肺纤维化形成, 抑制 NLRP3 可以明显缓解肺纤维化^[19-21]。本研究结果显示, 与模型组相比, 补肺活血胶囊可以下调 NLRP3 相关蛋白的表达, 下调肺纤维化小鼠体内炎症反应, 表明 NLRP3 途径可能是补肺活血胶囊抗肺纤维化的重要调节通路。MCC950 是一种有效的特异性 NLRP3 炎症小体小分子抑制剂, 抑制原理与其直接结合 NLRP3 中 NACHT 结构域的 Walker B 基序继而阻断 ATP 水解有关, 此外其对 NLRP1、NLRC4、AIM2 等炎症小体的激活没有影响^[22-23]。因此本研究选取 MCC950 作为阳性对照药物对比补肺活血胶囊对 NLRP3 的抑制作用, 结果显示 MCC950 可抑制 NLRP3 通路活化及 EMT 发

生,同时对肺纤维化小鼠具有治疗作用,而补肺活血胶囊与 MCC950 干预对肺纤维化小鼠 EMT 及治疗作用的影响无明显差异。

综上所述,通过补肺活血胶囊治疗后,肺纤维化小鼠生存率明显提高,体质量明显增加,肺组织 W/D、BALF 总细胞与总蛋白、HYP 含量均明显降低,肺纤维化进程明显改善。因此可以证实补肺活血胶囊可以通过调控 NLRP3 通路介导的 EMT 抑制减轻博来霉素诱导的肺纤维化程度。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Hettiarachchi S U, Li Y H, Roy J, *et al.* Targeted inhibition of PI3 kinase/mTOR specifically in fibrotic lung fibroblasts suppresses pulmonary fibrosis in experimental models [J]. *Sci Transl Med*, 2020, 12(567): eaay3724.
- [2] Yu D K, Xiang Y, Gou T T, *et al.* New therapeutic approaches against pulmonary fibrosis [J]. *Bioorg Chem*, 2023, 138: 106592.
- [3] 敬岳, 唐诗环, 金津, 等. 补肺活血胶囊对颗粒物致小鼠肺纤维化样变的影响 [J]. 世界中西医结合杂志, 2017, 12(6): 774-778.
- [4] 孟泳, 贺启萌, 任璐瑶. 补肺活血胶囊治疗特发性肺纤维化的临床研究 [J]. 中国临床医生杂志, 2020, 48(8): 995-997.
- [5] Szapiel S V, Elson N A, Fulmer J D, *et al.* Bleomycin-induced interstitial pulmonary disease in the nude, athymic mouse [J]. *Am Rev Respir Dis*, 1979, 120(4): 893-899.
- [6] Hübner R H, Gitter W, El Mokhtari N E, *et al.* Standardized quantification of pulmonary fibrosis in histological samples [J]. *BioTechniques*, 2008, 44(4): 507-511.
- [7] 陶章, 李惠萍. 不同剂量博来霉素致小鼠肺纤维化模型的比较 [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2009, 13(7): 1214-1218.
- [8] Bagnato G, Harari S. Cellular interactions in the pathogenesis of interstitial lung diseases [J]. *Eur Respir Rev*, 2015, 24(135): 102-114.
- [9] Derynck R, Muthusamy B P, Saeteurn K Y. Signaling pathway cooperation in TGF- β -induced epithelial-mesenchymal transition [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2014, 31: 56-66.
- [10] Varga J, Pasche B. Antitransforming growth factor-beta therapy in fibrosis: Recent progress and implications for systemic sclerosis [J]. *Curr Opin Rheumatol*, 2008, 20(6): 720-728.
- [11] Mi S, Li Z, Yang H Z, *et al.* Blocking IL-17A promotes the resolution of pulmonary inflammation and fibrosis via TGF- β 1-dependent and -independent mechanisms [J]. *J Immunol*, 2011, 187(6): 3003-3014.
- [12] Peng L, Wen L, Shi Q F, *et al.* Scutellarin ameliorates pulmonary fibrosis through inhibiting NF-kappaB/NLRP3-mediated epithelial-mesenchymal transition and inflammation [J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(11): 978.
- [13] Effendi W I, Nagano T. The crucial role of NLRP3 inflammasome in viral infection-associated fibrosing interstitial lung diseases [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(19): 10447.
- [14] Yang H L, Lin P Y, Vadivalagan C, *et al.* Coenzyme Qo defeats NLRP3-mediated inflammation, EMT/metastasis, and Warburg effects by inhibiting HIF-1 α expression in human triple-negative breast cancer cells [J]. *Arch Toxicol*, 2023, 97(4): 1047-1068.
- [15] Huang Y, Xu W, Zhou R. NLRP3 inflammasome activation and cell death [J]. *Cell Mol Immunol*, 2021, 18(9): 2114-2127.
- [16] Min L, Zhang S L, Feng Y, *et al.* NecroX-5 ameliorates bleomycin-induced pulmonary fibrosis via inhibiting NLRP3-mediated epithelial-mesenchymal transition [J]. *Respir Res*, 2022, 23(1): 128.
- [17] Aizawa E, Karasawa T, Watanabe S, *et al.* GSDME-dependent incomplete pyroptosis permits selective IL-1 α release under Caspase-1 inhibition [J]. *iScience*, 2020, 23(5): 101070.
- [18] Coll R C, Hill J R, Day C J, *et al.* MCC950 directly targets the NLRP3 ATP-hydrolysis motif for inflammasome inhibition [J]. *Nat Chem Biol*, 2019, 15(6): 556-559.
- [19] Zahid A, Li B, Kombe A J, *et al.* Pharmacological inhibitors of the NLRP3 inflammasome [J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 2538.

[责任编辑 高源]