

基于网络药理学及体外实验研究金莲花黄酮抑制肺纤维化的机制

王家才¹, 段星星¹, 张 波², 辛 杰², 陈虞超³, 郭生虎³, 李新朋^{2*}, 王 振^{1,2*}

1. 临沂大学化学化工学院, 山东 临沂 276000

2. 临沂大学医学院, 山东 临沂 276000

3. 宁夏农林科学院 农业生物技术研究中心, 宁夏 银川 750002

摘要: **目的** 基于网络药理学结合体外实验, 探究金莲花 *Trollius chinensis* 黄酮抑制肺纤维化的作用机制。 **方法** 通过 TCMSPP 数据库获取金莲花黄酮活性成分靶点, 同时采用 GeneCards 数据库获取肺纤维化的疾病靶点, 应用 Cytoscape 软件, 采用蛋白互作的方式, 筛选金莲花黄酮治疗肺纤维化的核心靶点, 并采用 Metascape 对核心靶点进行基因本体 (gene ontology, GO) 功能及京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路富集分析。转化生长因子- β 1 (transforming growth factor- β 1, TGF- β 1) 诱导 A549 细胞建立体外模型, 对网络药理学研究结果进行验证。 **结果** 筛选得到 2 个金莲花黄酮活性成分、153 个对应的蛋白靶点及 1444 个肺纤维化疾病靶点, 合并后得到 96 个核心靶点。Metascape 富集分析发现, 金莲花黄酮抑制肺纤维化与氧化应激密切相关, 与细胞因子受体结合、细胞因子活性、受体配体活性调节等有关。KEGG 通路分析显示涉及癌症途径、脂质与动脉粥样硬化、炎症反应途径等。体外实验结果表明, 金莲花黄酮具有良好的体外抗氧化活性, 明显抑制 TGF- β 1 诱导的上皮间充质转化和氧化应激反应 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001), 抑制信号转导分子 2/3 (signal transduction molecule 2/3, Smad2/3)、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 及核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 激活 ($P < 0.001$)。 **结论** 金莲花黄酮可以通过体外抗氧化活性阻断肺纤维化进程, 抑制肺纤维化发展。

关键词: 金莲花; 黄酮; 网络药理学; 肺纤维化; 氧化应激

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2023)07-2144-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.07.014

Mechanism of *Trollius chinensis* flavonoids on inhibiting pulmonary fibrosis based on network pharmacology and *in vitro* experiment

WANG Jia-cai¹, DUAN Xing-xing¹, ZHANG Bo², XIN Jie², CHEN Yu-chao³, GUO Sheng-hu³, LI Xin-peng², WANG Zhen^{1,2}

1. School of Chemistry and Chemical Engineering, Linyi University, Linyi 276000, China

2. Medical School of Linyi University, Linyi 276000, China

3. Agricultural Biotechnology Center, Ningxia Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Yinchuan 750002, China

Abstract: **Objective** To explore the mechanism of *Trollius chinensis* flavonoids on pulmonary fibrosis based on network pharmacology combined with *in vitro* experiment. **Methods** The active component targets of *T. chinensis* flavonoids were obtained through TCMSPP database, disease targets of pulmonary fibrosis were obtained through GeneCards database, and core targets of *T. chinensis* flavonoids in treatment of pulmonary fibrosis were screened by Cytoscape software and protein interaction. Metascape was used to perform gene ontology (GO) function and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) pathway enrichment analysis of core targets. A549 cells was induced by transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) to establish an *in vitro* model to verify the results of network pharmacology. **Results** Two flavonoid active components, 153 corresponding protein targets and 1444 pulmonary fibrosis

收稿日期: 2022-11-14

基金项目: 中央引导地方科技发展专项资金 (YDZX2021097); 宁夏自然科学基金资助项目 (2020AAC03296); 费县揭榜制组阁制项目 (2022-01); 山东省自然科学基金面上项目 (ZR2021MC149)

作者简介: 王家才, 硕士研究生, 研究方向为中药药理学。E-mail: wangjiacai9@163.com

*通信作者: 李新朋, 副教授, 研究方向为中药多糖活性评价。Tel: (0539)7258639 E-mail: lixinpeng513@126.com

王 振, 教授, 主要从事中药药理学与中药资源研究。E-mail: wangzhen@lyu.edu.cn

disease targets were obtained from the screening, and 96 core targets were obtained after the combination. Metascape enrichment analysis found that the inhibition of pulmonary fibrosis by *T. chinensis* flavonoids was closely related to oxidative stress, and was related to cytokine receptor binding, cytokine activity, receptor ligand activity regulation, etc. KEGG pathway analysis showed that it involved cancer pathway, lipid and atherosclerosis, inflammatory response pathway, etc. The results of *in vitro* experiments showed that *T. chinensis* flavonoids had good antioxidant activity *in vitro* and significantly inhibited TGF- β 1 induced epithelial-mesenchymal transformation and oxidative stress response ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), inhibited signal transduction molecule 2/3 (Smad2/3), mammalian target of rapamycin (mTOR) and nuclear factor- κ B (NF- κ B) activation ($P < 0.001$). **Conclusion** *T. chinensis* flavonoids can block the process of pulmonary fibrosis and inhibit the development of pulmonary fibrosis through antioxidant activity *in vitro*.

Key words: *Trollius chinensis* Bge.; flavonoids; network pharmacology; pulmonary fibrosis; oxidative stress

肺纤维化是一种常见的临床常见的慢性、进行性、不可逆性间质性肺疾病,病理上表现为大量间质细胞增生及细胞外基质沉积^[1]。确诊后,肺纤维化患者的 5 年平均生存率仅为 20%~30%,甚至低于某些癌症的生存率^[2]。我国肺纤维化患者约 60 万人,全球约为 300 万人,而且其发病率尚未得到有效控制,目前对大多数间质性肺疾病的治疗手段极为有限,可用药物稀少。全球范围内,治疗肺纤维化的主导药物为吡菲尼酮和尼达尼布,经过临床验证,二者可以有效抑制特发性肺纤维化,但潜在胃肠道反应、肝损伤、出血及不耐受等不良反应,而且在多种纤维化肺疾病中并不能延长患者寿命。据临床评估,这些药物可以有效抑制特发性肺纤维化,但它们有胃肠道反应、肝损伤和出血等潜在的不良反应^[3]。与此同时,受新型冠状病毒的影响,肺纤维化潜在危害加剧。《新冠肺炎确诊 1 年后的后遗症评估》中指出,在治愈后的患者中,最常见的肺部后遗症是肺部结节、肺部阴影、肺部纤维化以及支气管的扩张^[4]。考虑到肺纤维化是影响公众健康的严重问题,因此非常需要开发安全、有效的可用于治疗肺纤维化疾病的药物。

金莲花为毛茛科金莲花属植物金莲花 *Trollius chinensis* Bge. 的干燥花,始见于《本草纲目拾遗》,具有抗氧化、抗菌、抗病毒、抗炎、抗肿瘤等多种药理作用^[5-6]。对于肺纤维化的作用机制研究中证实氧化应激起到关键作用,而黄酮类成分具有较好的抗氧化活性。课题组前期研究证实金莲花黄酮可以有效抑制 PM2.5 诱导的大鼠肺纤维化^[7],但其具体作用机制并不清楚。网络药理学整体性、系统性的特点与中药整体观、辨证论治的特点相符,为中药的药理研究提供了新的思路,为中西医临床前研究之间的结合创造了一种可行途径^[8]。本研究通过网络药理学方法,研究金莲花黄酮抑制肺纤维化的作用机制,利用体外细胞实验对筛选出的潜在作用

靶点进行验证,旨在揭示金莲花黄酮抑制肺纤维化的作用机制。

1 材料

1.1 细胞

人肺癌 A549 细胞购自北京中科质检生物技术有限公司。

1.2 药物

金莲花采摘于宁夏银川地区,由宁夏农林科学院提供,经宁夏农林科学院郭生虎教授鉴定为毛茛科植物金莲花 *T. chinensis* Bge. 的干燥花。

1.3 药品与试剂

芦丁对照品(批号 AF21020854)购自成都埃法生物科技有限公司;乙醇(批号 YD20210421)购自天津市永大化学试剂有限公司;邻苯三酚(批号 C10377201)、水杨酸(批号 C10368917)、FeSO₄(批号 C10293075)、H₂O₂(批号 C10265196)、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH)购自上海麦克林生化有限公司;Tris-HCl 缓冲液(批号 20180807)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)检测试剂盒(批号 20211111)、丙二醛(malonylaldehyde, MDA)检测试剂盒(批号 20211117)、超氧化物阴离子荧光探针试剂盒(批号 20220214)、CCK-8 试剂(批号 20210413)、胰蛋白酶(批号 20210623)、RIPA 裂解液(批号 20210521)购自北京索莱宝生物科技有限公司;转化生长因子- β 1(transforming growth factor- β 1, TGF- β 1, 批号 100-21-10)购自 Peprotech 公司;E-cadherin 抗体(批号 18q6272, 稀释比例 1:1000)、I 型胶原蛋白(collagen-1)抗体(批号 26u3150, 稀释比例 1:1000)、 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)抗体(批号 22p5934, 稀释比例 1:1000)、波形蛋白 Vimentin 抗体(批号 26t9913, 稀释比例 1:1000)、核因子 E2 相关因子 2(nuclear factor erythroid-2-related factor 2, Nrf2)抗体(批号

65m9929, 稀释比例 1:1000)、Kelch 样环氧氯丙烷相关蛋白 1 (Kelch-like ECH-associated protein 1, Keap1) 抗体 (批号 85d1712, 稀释比例 1:1000)、血红素氧化酶-1 (heme oxygenase-1, HO-1) 抗体 (批号 80w1044, 稀释比例 1:1000)、醌氧化还原酶-1 (quinine oxidoreductase-1, NQO-1) 抗体 (批号 85t0195, 稀释比例 1:1000)、信号转导分子 2/3 (signal transduction molecule 2/3, Smad2/3) 抗体 (批号 85v7735, 稀释比例 1:1000)、p-Smad2/3 抗体 (批号 88d5492, 稀释比例 1:1000)、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 抗体 (批号 61b4725, 稀释比例 1:1000)、蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt) 抗体 (批号 34d5362, 稀释比例 1:1000)、p-Akt 抗体 (批号 20t9742, 稀释比例 1:500)、 β -actin 抗体 (批号 12w2944, 稀释比例 1:3000)、山羊抗兔 IgG 二抗 (批号 56j9958, 稀释比例 1:5000)、山羊抗鼠 IgG 二抗 (批号 19z2345, 稀释比例 1:5000) 购自 Affinity Biosciences 公司; 核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 抗体 (批号 20220210, 稀释比例 1:500) 购自武汉基因美生物科技有限公司。

1.4 仪器

Synergy HTX/SILFITA 型全波长多功能酶标仪 (伯腾仪器有限公司); Forma 3111 型细胞培养箱 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); 荧光显微镜 (日本 Olympus 公司); SW-CJ-2FD 型超净工作台 (上海苏州安泰空气技术有限公司); Mini PROTEAN 型蛋白电泳仪、Mini Trans-Blot 蛋白转印系统、ChemiDoc 超高灵敏度化学发光成像系统 (美国 Bio-Rad 公司); ALK-R3000-S 型数显圆周摇床 (赛洛捷克有限公司); 全自动高速冷冻离心机 (美国 Sigma 公司); SHZ-88-1 型台式水浴恒温震荡器 (江苏太仓鹿河生化仪器厂)。

2 方法

2.1 网络药理学研究

2.1.1 药物成分及靶点筛选 通过 TCMSP 数据库 (<http://tcmsp.com>) [9], 以“金莲花”为关键词, 以“口服生物利用度 (oral bioavailability, OB) $\geq 30\%$ ”“类药性 (drug-likeness, DL) ≥ 0.18 ”为筛选条件, 获得活性成分和靶点信息, 筛选其中黄酮的成分 [10]。利用 Uniprot 数据库 (<https://www.uniprot.org/>) 进行蛋白名称和基因名称的转换 [11]。

2.1.2 金莲花黄酮“活性成分-靶点”网络的构建

将筛选后的金莲花成分进行筛选, 提取黄酮成分, 分别将 2 个金莲花黄酮成分标记为玄参黄酮和五羟黄酮, 分别将 2 个黄酮各自对应的靶点进行汇总。随后, 使用 Cytoscape 3.9.1 软件构建金莲花黄酮“活性成分-靶点”网络, 进行可视化 [12]。

2.1.3 肺纤维化疾病靶点获取 借助 GeneCards 和 Drugbank 数据库, 以“pulmonary fibrosis”为关键词, 筛选相关基因 [13]。将各数据库筛选后的基因对应的靶点进行汇总、整体后与药物靶点合并, 筛选重复靶点。

2.1.4 蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络的构建及分析 运用 Venny 插件, 获取金莲花黄酮的药物靶点和肺纤维化靶点的 PPI 信息, 并获取其共有靶点。将共有靶点导入 Cytoscape 3.9.1 软件进行可视化分析, 并对共有靶点进行相关性分析, 得到核心靶点 [13]。

2.1.5 基因本体 (gene ontology, GO) 功能及京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路富集分析 运用 Metascape 进行 GO 功能分析和 KEGG 信号通路富集分析, GO 功能分析包括生物过程 (biological process, BP)、分子功能 (molecular function, MF)、细胞组成 (cellular component, CC)。

2.2 金莲花黄酮提取及含量测定

取干燥金莲花粉碎, 过筛, 称取 100 g, 加入 10 倍量的 70%乙醇溶液, 加热回流提取 2 h, 滤过后取滤液, 减压浓缩, 得粗黄酮。按 1:4 的料液比加入 95%乙醇沉淀, 取滤液浓缩, 冷冻干燥, 得金莲花黄酮提取物 [14]。以芦丁为对照品, 分光光度法测定金莲花提取液中的总黄酮含量 [15], 计算提取率。

2.3 金莲花黄酮体外抗氧化活性测试

2.3.1 超氧阴离子自由基清除能力测定 采用邻苯三酚比色法测定金莲花黄酮的超氧阴离子自由基清除能力。向各试管中加入 0.1 mol/L 的 Tris-HCl 缓冲液 4.5 mL, 后分别加入质量浓度为 10、20、50、100、250、500、1000 μ g/mL 的金莲花黄酮溶液各 1 mL, 加入蒸馏水 2.4 mL, 摇匀后室温静置 3 min 后加入 10 mmol/L 的邻苯三酚溶液 0.1 mL 终止反应, 蒸馏水调零, 在 325 nm 下测定其吸光度 (A) 值 [16], 计算超氧阴离子自由基清除率。

$$\text{超氧阴离子自由基清除率} = 1 - A_i / (A_j - A_0)$$

A_0 为水代替黄酮时测得的 A 值, A_i 为不同质量浓度待测样品测得的 A 值, A_j 为水代替邻苯三酚时不同质量浓度待测样品测得的底本 A 值

2.3.2 羟基自由基清除率测定 采用 FeSO_4 -水杨酸法测定羟基自由基清除率。配制 6 mmol/L 乙醇-水杨酸溶液、6 mmol/L FeSO_4 、8.8 mmol/L H_2O_2 ，在比色管中依次加入 1 mL 6 mmol/L FeSO_4 、1 mL 蒸馏水或样品溶液（10、20、50、100、250、500、1000 $\mu\text{g/mL}$ ），1 mL 6 mmol/L H_2O_2 ，混匀后室温放置 10 min，后加入 6 mmol/L 乙醇-水杨酸，摇匀，37 $^\circ\text{C}$ 水浴加热 15 min 后取出，蒸馏水为参比溶液调零后，于 510 nm 处测定其 A 值^[16]。

$$\text{羟基自由基清除率} = 1 - (A_x - A_{x0})/A_0$$

A_0 为 FeSO_4 +蒸馏水+ H_2O_2 +水杨酸测得的 A 值， A_x 为 FeSO_4 +样品+ H_2O_2 +水杨酸测得的 A 值， A_{x0} 为 FeSO_4 +样品+蒸馏水+水杨酸测得的 A 值

2.3.3 DPPH 自由基清除能力测定 采用 DPPH-乙醇法测定金莲花黄酮的 DPPH 自由基清除能力^[16]。依次向试管中加入不同质量浓度（10、20、50、100、250、500、1000 $\mu\text{g/mL}$ ）样品溶液 0.500 mL，DPPH 溶液 3 mL，摇匀后室温静置 30 min，用蒸馏水调零，测定其在 517 nm 处的 A 值。

$$\text{DPPH 自由基清除率} = 1 - A_i/A_0$$

A_0 为蒸馏水， A_i 为样品

2.4 体外细胞实验

2.4.1 细胞毒性测试 A549 细胞用含 10%胎牛血清的 F12K 培养基，于 37 $^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养，待细胞融合度达到 80%~90%时进行传代培养。将 A549 细胞以 2000 个/孔接种于 96 孔板中，设置 6 个复孔，培养 24 h，待其生长密度约为 80%时，加入不同质量浓度（100、200、400、600、800 $\mu\text{g/mL}$ ）黄酮培养 24 h 后，加入 CCK-8 溶液，于恒温箱孵育 1 h 后用酶标仪测定 450 nm 处的 A 值^[17]。

2.4.2 细胞实验浓度筛选 将 A549 细胞以每孔 2000 个接种于 96 孔板中，设置 6 个复孔，培养 24 h，待其生长密度约为 80%时，分别加入 10 ng/mL TGF- β 1 及不同质量浓度（100、200、400、600、800 $\mu\text{g/mL}$ ）黄酮，培养 24 h 后加 CCK-8 溶液，于恒温箱中孵育 1 h 后用酶标仪测定 450 nm 处的 A 值^[18]。

2.4.3 实验分组 A549 细胞以 1×10^6 个/孔接种于 6 孔板，培养 24 h，设置对照组（含有细胞培养液）、模型组（含有 10 ng/mL TGF- β 的细胞培养液）和不同质量浓度（200、400、600 $\mu\text{g/mL}$ ）金莲花黄酮组（含 10 ng/mL TGF- β 和不同质量浓度药物的细胞培养液）。

2.4.4 上皮间充质转化标志物表达 收集细胞，加

入 RIPA 裂解液提取蛋白，冰上裂解 30 min 后，4 $^\circ\text{C}$ 、12 000 $\times g$ 离心 10 min，取上清。使用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度后，加入上样缓冲液，100 $^\circ\text{C}$ 煮沸 10 min 使蛋白变性。蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳，转至 PVDF 膜，加入 5%脱脂牛奶，室温封闭 2 h 后，分别加入 E-cadherin、collagen-1、 α -SMA、Vimentin 和 β -actin 抗体，4 $^\circ\text{C}$ 孵育过夜；洗涤后加入二抗，室温孵育 1 h，加入 ECL 发光液显影，用 Image J 软件分析条带灰度值^[19-20]。

2.4.5 抗氧化因子表达 收集细胞，按照试剂盒说明书测定 SOD 活性及 MDA 含量，观察各组氧化应激表达水平^[20]；按照 DHE 试剂盒说明书，通过流式细胞仪检测各组细胞中活性氧（reactive oxygen species，ROS）水平，评价氧化应激表达水平^[21]；通过 Western blotting 检测氧化应激因子 Nrf2、Keap1、HO-1、NQO-1 蛋白表达。

2.4.6 网络药理学潜在靶点检测 收集细胞，提取蛋白后，通过 Western blotting 检测 mTOR、Smad2/3、p-Smad2/3、NF- κ B 蛋白表达。

2.4.7 统计学分析 数据使用 Graphpad Prism 8.0 软件处理，采用单因素方差分析进行组间统计。

3 结果

3.1 网络药理学分析

通过网络药理学分析发现金莲花中具有可成药的黄酮主要为玄参黄酮（JLH-1）和五羟黄酮（JLH-2），其潜在作用靶点为 143 个（图 1-A）。通过 GeneCards 和 Drug bank 数据库收集肺纤维化潜在作用靶点 1444 个，药物靶点与疾病靶点进行合集分析，二者共同靶点为 96 个（图 1-B）。PPI 网络的构建及分析发现其潜在靶点为蛋白激酶 B1（protein kinase B1，AKT1）、肿瘤坏死因子（tumor necrosis factor，TNF）、肿瘤抑制蛋白（tumor protein p53，TP53）、血管内皮细胞生长因子受体 A（vascular endothelial growth factor receptor A，VEGFA）、白细胞介素-6（interleukin-6，IL-6）、IL-1B（图 1-C）。

运用 Metascape 进行 BP、MF、CC 富集分析，发现潜在作用靶点主要 BP 集中在无机物应激反应、氧化应激、活性氧等，MF 主要集中在细胞因子及其受体（图 2-A）。KEGG 富集分析发现主要集中在癌症、脂质和动脉粥样硬化（图 2-B）。

3.2 金莲花黄酮体外抗氧化活性

金莲花通过 60%乙醇提取后，混有一定量多糖，

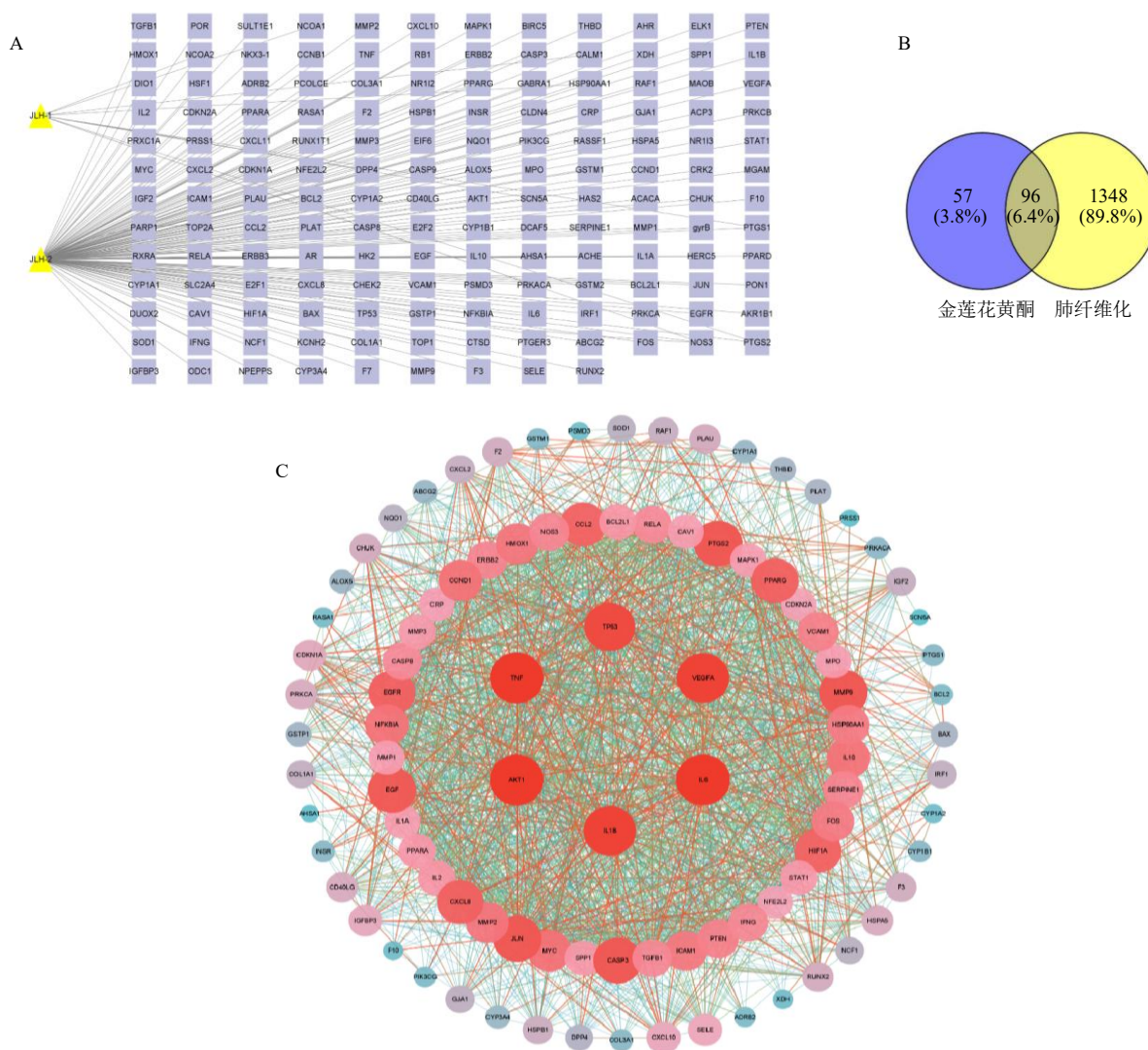


图 1 金莲花黄酮潜在作用靶点 (A)、肺纤维化与金莲花黄酮靶点 Venn 图 (B) 和 PPI 网络 (C)

Fig. 1 Potential targets of *T. chinensis* flavonoids (A), Venn diagram of targets of pulmonary fibrosis and *T. chinensis* flavonoids (B) and PPI network (C)

后经乙醇沉淀，除去多糖，纯化后冻干，3 批次金莲花黄酮提取率分别为 68.44%、71.24%、71.33%。体外抗氧化活性测试结果（图 3）显示，随着金莲花黄酮质量浓度的升高，其抗氧化能力逐渐增强。当质量浓度超过 500 $\mu\text{g/mL}$ 时，其超氧阴离子自由基清除率达到 60% 以上，羟基自由基清除率超过 80%，而 DPPH 自由基清除率超过 90%，表现出良好的抗氧化活性。

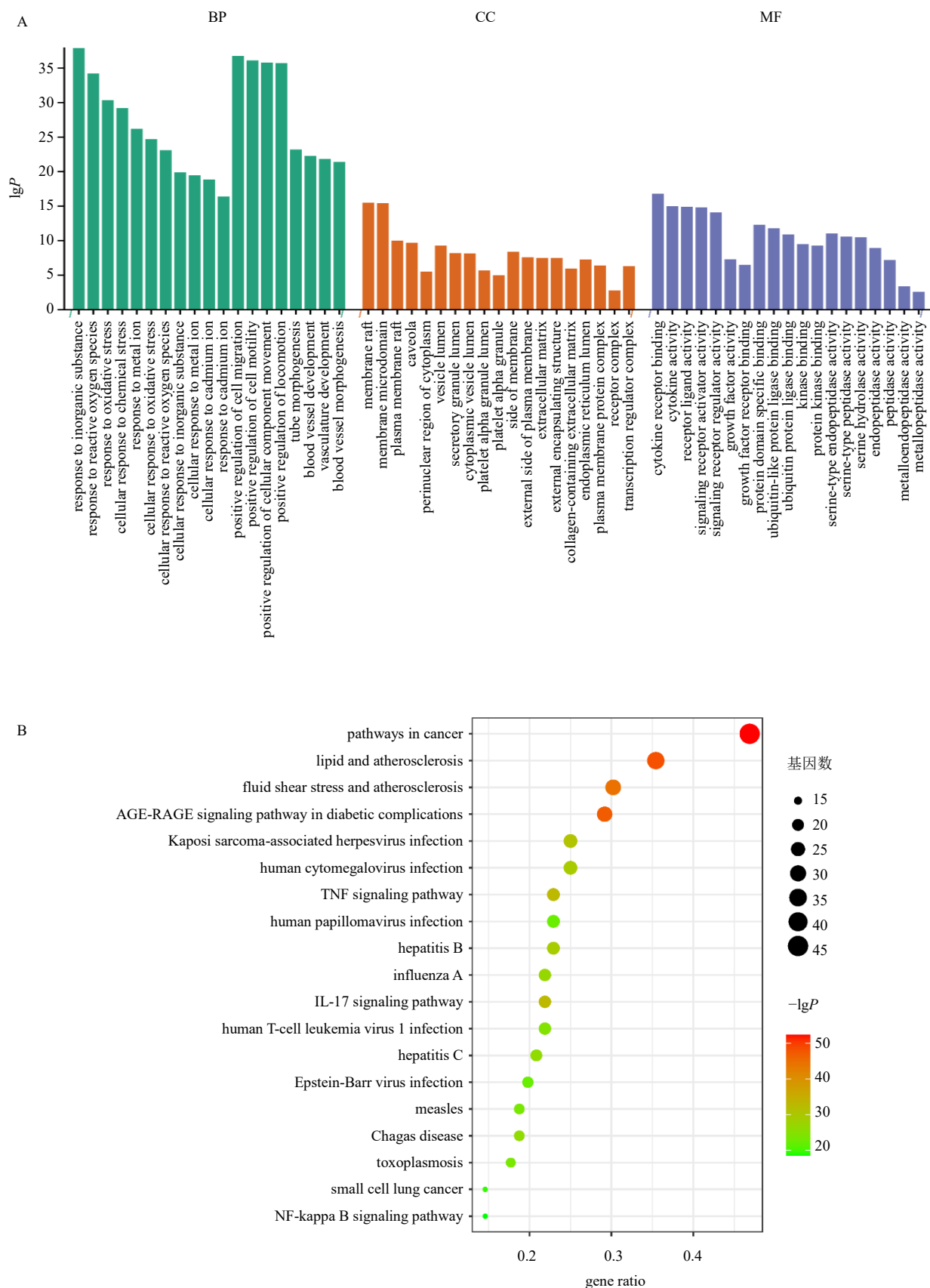
3.3 细胞毒性及药物剂量筛选

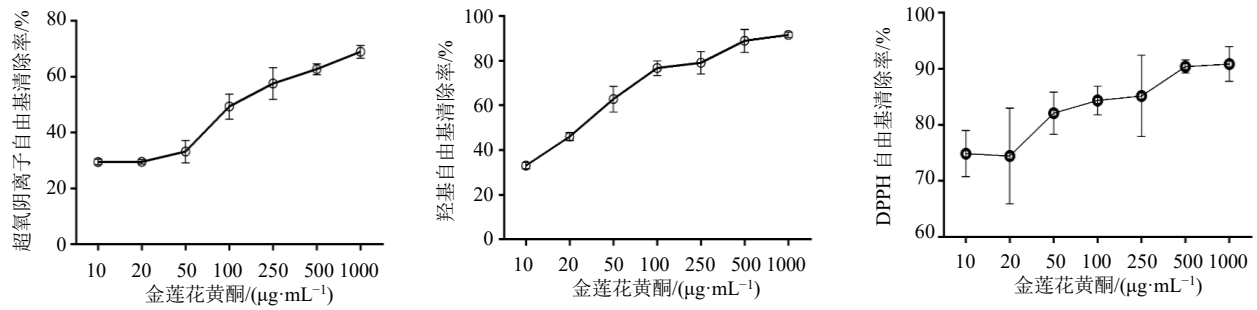
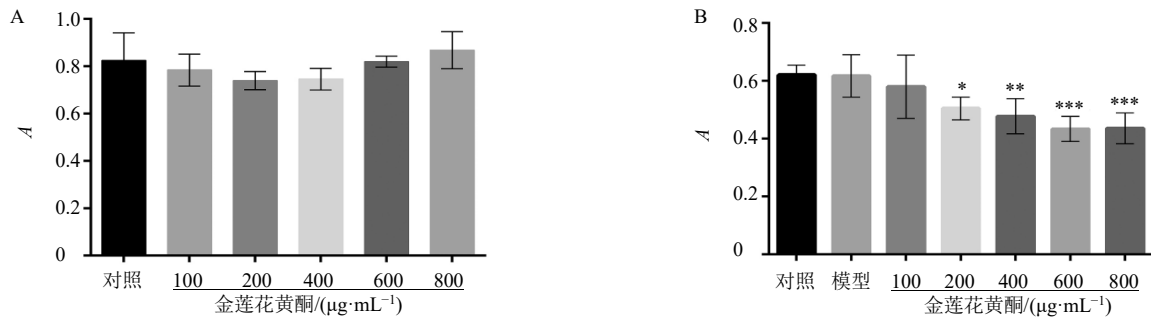
将金莲花黄酮作用于 A549 细胞，通过 CCK-8 法测试其活力，如图 4 所示，100~800 $\mu\text{g/mL}$ 金莲花黄酮对 A549 细胞活性无明显影响，说明在此质量浓度范围内并未表现出毒性作用。A549 细胞经过

TGF- β 1 诱导后，给予不同质量浓度金莲花黄酮进行干预，发现 200~800 $\mu\text{g/mL}$ 金莲花黄酮显著抑制 A549 细胞活性 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001)，而 600、800 $\mu\text{g/mL}$ 作用强度相近，选择 200、400、600 $\mu\text{g/mL}$ 作为金莲花黄酮后续实验剂量。

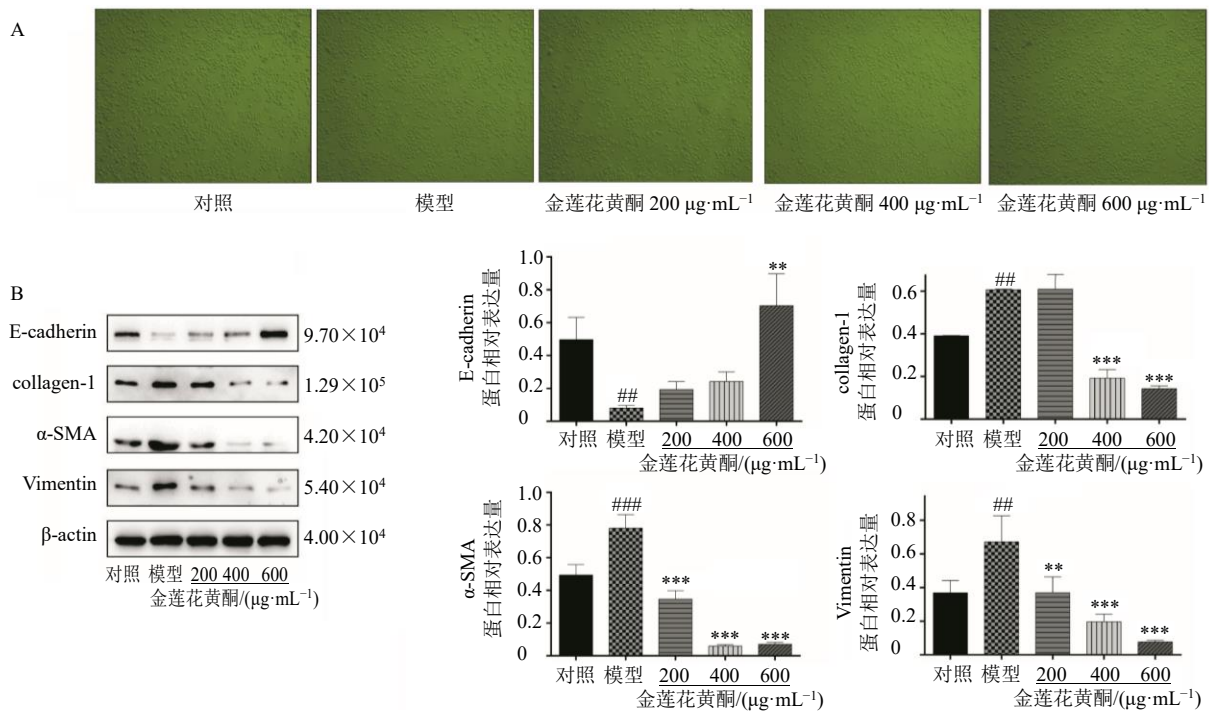
3.4 金莲花黄酮抑制 TGF- β 1 诱导的上皮间充质转化

如图 5-A 所示，TGF- β 1 诱导后 A549 细胞发生明显的转分化，与对照组比较，模型组细胞形态呈现纺锤状，而金莲花干预后细胞状态更加偏向于对照组，且出现剂量相关性，600 $\mu\text{g/mL}$ 金莲花黄酮作用效果优于 200、400 $\mu\text{g/mL}$ 组。通过 Western blotting 检测细胞中上皮间充质转化标志物蛋白表达，如图 5-B 所示，与对照组比较，模型组 E-cadherin



图 3 金莲花黄酮的超氧阴离子自由基、羟基自由基和 DPPH 自由基清除能力 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)Fig. 3 Superoxide anion radical, hydroxyl radical and DPPH radical scavenging ability of *T. chinensis* flavonoids ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$, 下图同
 * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs model group, same as below figures

图 4 金莲花黄酮对正常 A549 细胞 (A) 和 TGF- β 1 诱导的 A549 细胞 (B) 活力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)Fig. 4 Effect of *T. chinensis* flavonoids on viability of normal A549 cells (A) and A549 cells induced by TGF- β 1 (B) ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

A-各组细胞形态 ($\times 400$) B-各组细胞上皮间充质转化相关蛋白表达 与对照组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$, 下图同

A-cell morphology in each group ($\times 400$) B-expressions of epithelial-mesenchymal transformation related protein of cells in each group # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ vs control group, same as below figures

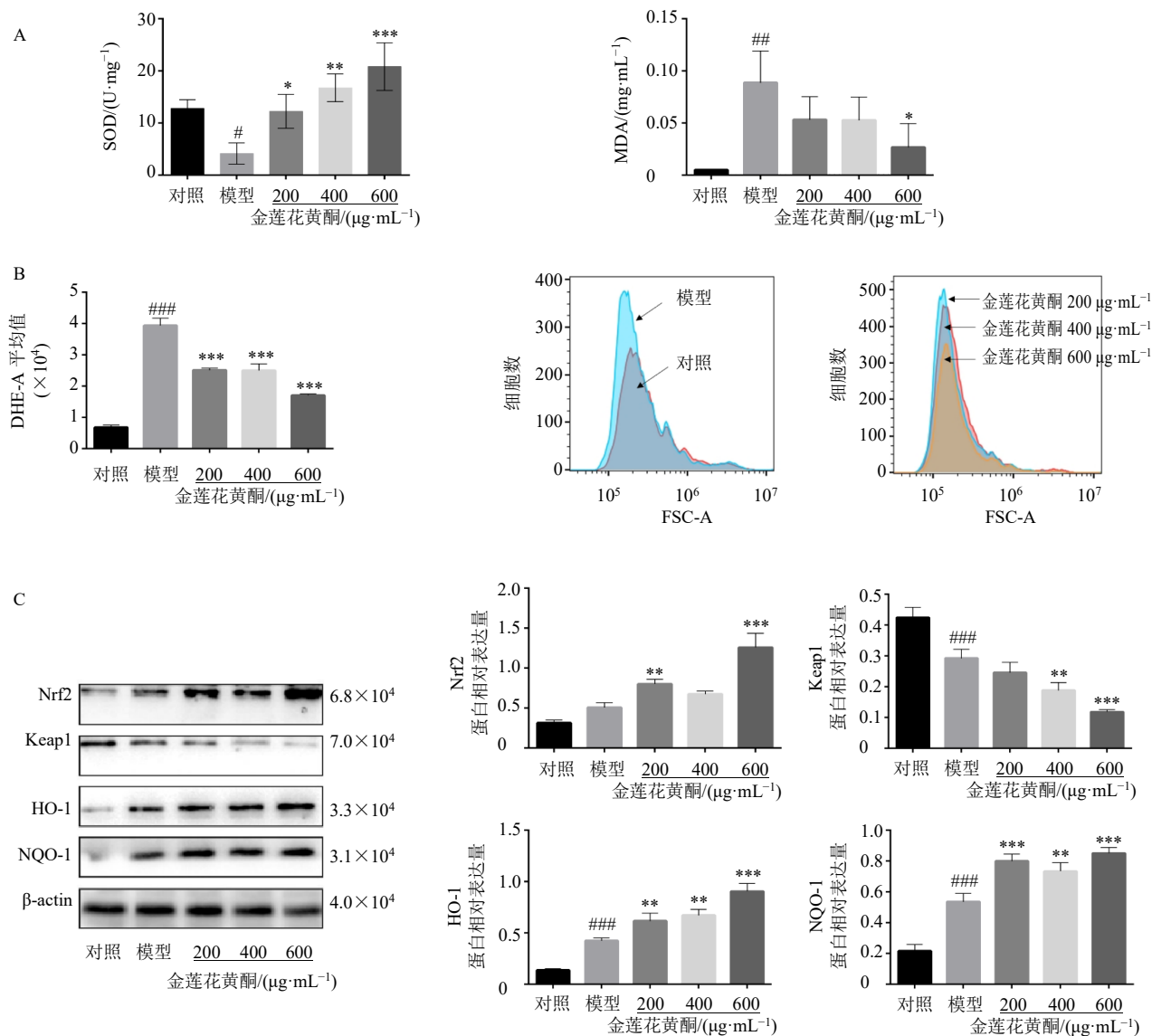
图 5 金莲花黄酮抑制 TGF- β 1 诱导的上皮间充质转化 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Fig. 5 *T. chinensis* flavonoids inhibited epithelial-mesenchymal transformation induced by TGF- β 1 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.01$), collagen-1、 α -SMA、Vimentin 蛋白表达水平均显著升高 ($P < 0.01$ 、 0.001); 与模型组比较, 600 $\mu\text{g/mL}$ 金莲花黄酮组 E-cadherin 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.01$), 400、600 $\mu\text{g/mL}$ 金莲花黄酮组 collagen-1 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.001$), 金莲花黄酮各剂量组 α -SMA、Vimentin 蛋白表达水平均显著降低 ($P < 0.01$ 、 0.001)。

3.5 金莲花黄酮抑制 TGF- β 1 诱导的氧化应激反应

如图 6-A 所示, 与对照组比较, 模型组细胞中 SOD 活性明显降低 ($P < 0.05$), MDA 水平明显升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 金莲花黄酮各剂量

组 SOD 活性明显升高 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001), 600 $\mu\text{g/mL}$ 金莲花黄酮组 MDA 水平明显降低 ($P < 0.05$), 表明金莲花黄酮可以明显改善 TGF- β 1 诱导的氧化应激。ROS 检测结果 (图 6-B) 也证实了这一结果, 模型组 ROS 信号强度明显增强 ($P < 0.001$), 各给药组 ROS 信号强度明显减弱 ($P < 0.001$)。Western blotting 检测氧化应激相关蛋白表达, 如图 6-C 所示, 与对照组比较, 模型组 Keap1 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.001$), Nrf2 蛋白表达水平升高, 受 Nrf2 调控的 HO-1 和 NQO-1 蛋白表达水平均显著升高 ($P < 0.001$); 与模型组比较, 400、



A-各组细胞 SOD 活性和 MDA 水平 B-各组细胞 ROS 水平 C-各组细胞氧化应激相关蛋白表达

A-SOD activity and MDA level of cells in each group B-ROS level of cells in each group C-oxidative stress related protein expressions of cells in each group

图 6 金莲花黄酮抑制 TGF- β 1 诱导的氧化应激反应 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 6 *T. chinensis* flavonoids inhibited oxidative stress reaction induced by TGF- β 1 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

600 $\mu\text{g/mL}$ 金莲花黄酮组 Keap1 蛋白表达水平进一步显著降低 ($P < 0.01$ 、 0.001)，200、600 $\mu\text{g/mL}$ 金莲花黄酮组 Nrf2 蛋白表达水平均进一步显著升高 ($P < 0.01$ 、 0.001)，各给药组 HO-1 和 NQO-1 蛋白表达水平均进一步显著升高 ($P < 0.01$ 、 0.001)。

3.6 结合网络药理学检测潜在作用靶点

结合网络药理学靶点预测，随后对 Akt 及 p-Akt

进行检测 (图 7) 发现，与对照组比较，模型组 p-Akt 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.001$)，说明 Akt 被激活，金莲花黄酮则可以抑制其激活 ($P < 0.001$)。随后在对纤维化经典信号通路进行检测时发现，模型组 p-Smad2/3、mTOR 及 NF- κB 同样被激活 ($P < 0.001$)，金莲花黄酮可以抑制 p-Smad2/3、mTOR 及 NF- κB 激活 ($P < 0.001$)。

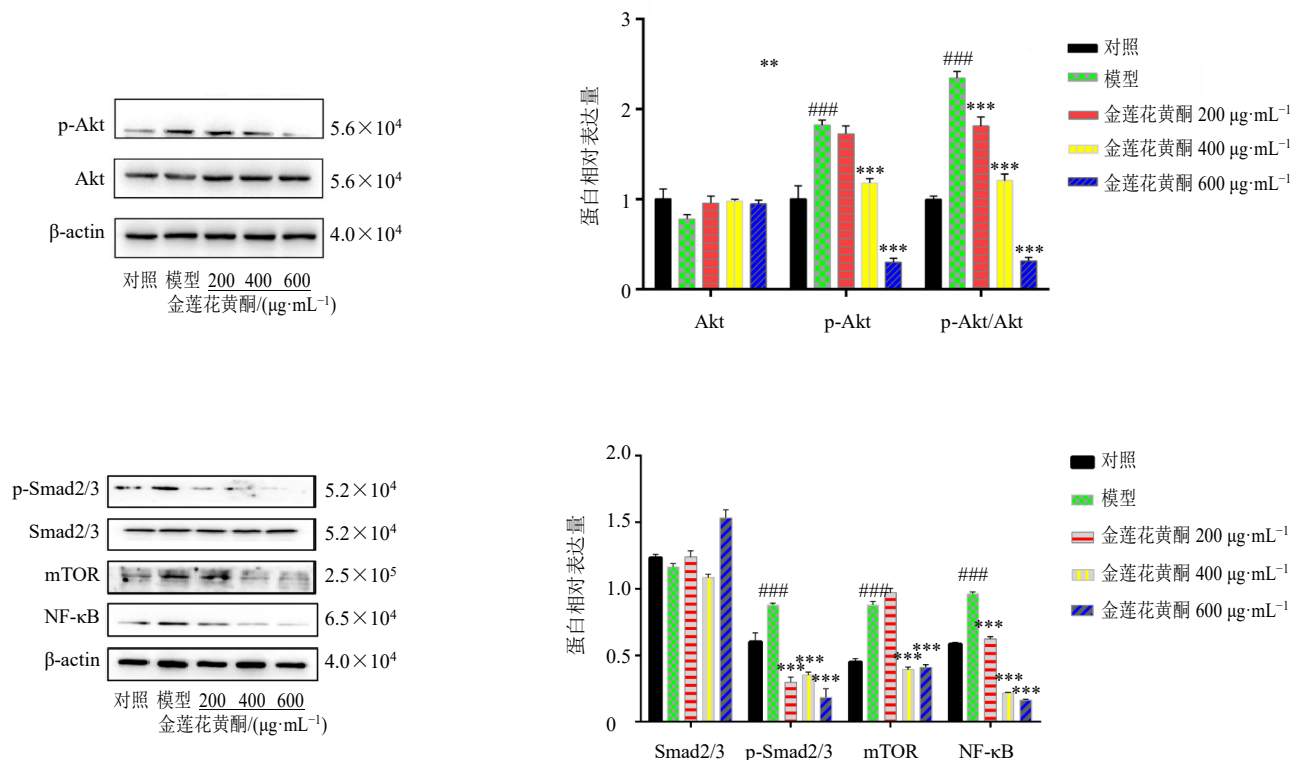


图 7 金莲花黄酮对 TGF- β 1 诱导的 A549 细胞 p-Akt、Akt、p-Smad2/3、Smad2/3、mTOR 和 NF- κB 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 7 Effect of *T. chinensis* flavonoids on p-Akt, Akt, p-Smad2/3, Smad2/3, mTOR and NF- κB protein expressions in A549 cells induced by TGF- β 1 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

4 讨论

在正常情况下，Nrf2 位于胞质中，与其特异性抑制性受体 Keap1 结合，无活性且 Keap1 可促进 Nrf2 的泛素化降解过程，因此 Nrf2 表达较低^[22]。但在氧化应激作用下，Nrf2 与 Keap1 发生解偶联，转移入核，通过与小分子肌腱纤维蛋白异二聚体化，从而启动，调控 NQO1、HO-1 等抗氧化酶基因的表达^[23]。Nrf2/Keap1 信号通路对肺纤维化的影响越来越受到关注，研究表明，Nrf2/Keap1 信号通路上调 HO-1、NQO1 等抗氧化物的表达，调控体内氧化应激水平，降低肺纤维化作用进程，减少胶原的合成，保护肺部组织，提高细胞抗性，抑制成纤维细胞转分化为肌成纤维细胞^[24-25]。

此外，磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)/Akt 信号通路被证实直接参与 II 型肺泡上皮细胞的上皮间充质转化发生，促进肺纤维化发展^[26]。PI3K/Akt 信号通路能使受体酪氨酸激酶活化，从而使细胞质上的 PI3K 易位至细胞膜，通过调控下游 mTOR 及 ROS 等参与肺纤维化^[27-28]。此外，PI3K/Akt 信号通路激活与 NF- κB 信号通路密切相关^[29]。NF- κB 在肺纤维化早期的高表达与 PI3K/Akt 信号通路激活相关，Akt 能通过磷酸化激活 NF- κB 抑制因子 (inhibitor of NF- κB , I κB) 激酶，导致 I κB 与 NF- κB 分离，激活 NF- κB 信号通路，诱导目的基因表达，产生炎症反应，加重肺纤维化的进程^[30]。

本研究首先借助网络药理学,分析金莲花黄酮与肺纤维化的潜在靶点,通过分析筛选出金莲花黄酮作用肺纤维化的作用靶点,与此同时,KEGG 分析显示金莲花黄酮作用肺纤维化最有可能的潜在作用机制为氧化应激,潜在作用靶点为 AKT1、TNF、TP53、VEGFA、IL-6、IL-1B。随后,本研究结合体外细胞模型进行验证。实验结果显示,金莲花黄酮在体外具有良好的抗氧化作用,作用细胞有效质量浓度为 200、400、600 $\mu\text{g/mL}$,而且显示出质量浓度相关性,且不存在细胞毒性。金莲花黄酮可以有效抑制 TGF- β 1 诱导后上皮间充质转化标志物的表达。氧化应激检测也证实了金莲花黄酮具有良好的抗氧化作用,金莲花黄酮能够增强 SOD 活性,降低 MDA 水平,流式细胞仪检测 ROS 表达结果发现,当细胞出现上皮间充质转化时,ROS 表达明显增强,而金莲花黄酮可以有效降低 ROS 表达,说明金莲花黄酮可以降低细胞内氧化应激水平。

在对氧化应激经典通路 Keap1/Nrf-2 信号通路检测时发现,当细胞出现上皮间充质转化时,二者进行解离,Keap1 表达逐渐降低,Nrf2 逐渐增强,受 Nrf2 调控的 HO-1 与 NQO-1 表达也出现差异性变化,说明金莲花黄酮可以作用 Keap1/Nrf2 信号通路,发挥抗氧化作用,进而抑制上皮间充质转化,这与网络药理学预测潜在作用机制相对应。随后,在对潜在作用靶点进行检测时发现 Akt-1 表现出明显的差异性。而 PI3K/Akt/mTOR 信号通路与肺纤维化的发生与发展息息相关,随后对 mTOR 的检测结果也证实了推测。

本研究结果证明金莲花黄酮具有良好的抗氧化活性,并且对于 TGF- β 1 诱导的 A549 细胞上皮间充质转化具有明显的抑制作用,其作用机制及作用靶点通过网络药理学进行验证,检测结果也验证了网络药理学的分析结果。基于这一发现,在后期的实验设计中将重点探索金莲花黄酮在动物体内抑制肺纤维化的药效作用以及其潜在作用机制。本研究不仅为网络药理学在中药防治肺纤维化研究中的必要性提供有力的证据,也为金莲花黄酮开发提供了基础数据,与现代实验手段相结合,丰富了中药在临床上的应用可能性。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] Lederer D J, Martinez F J. Idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *N Engl J Med*, 2018, 378(19): 1811-1823.

[2] Shenderov K, Collins S L, Powell J D, et al. Immune dysregulation as a driver of idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *J Clin Invest*, 2021, 131(2): e143226.

[3] Flaherty K R, Wells A U, Cottin V, et al. Nintedanib in progressive fibrosing interstitial lung diseases [J]. *N Engl J Med*, 2019, 381(18): 1718-1727.

[4] Zhou F Y, Tao M H, Shang L R, et al. Assessment of sequelae of COVID-19 nearly 1 year after diagnosis [J]. *Front Med*, 2021, 8: 717194.

[5] 孙萍, 李新朋, 薛涛, 等. 金莲花药理作用及临床应用研究进展 [J]. 中国药房, 2022, 33(4): 507-512.

[6] 甄会, 郑兆晔, 邹婷, 等. 金莲花软胶囊治疗急性咽炎(外感风热证)多中心临床研究 [J]. 药物评价研究, 2020, 43(5): 870-874.

[7] 叶倩云, 马龙, 叶晓燕, 等. 阿尔泰金莲花总黄酮对 PM2.5 致大鼠肺纤维化的防治作用研究 [J]. 毒理学杂志, 2020, 34(2): 119-125.

[8] 牛明, 张斯琴, 张博, 等. 《网络药理学评价方法指南》解读 [J]. 中草药, 2021, 52(14): 4119-4129.

[9] Ru J L, Li P, Wang J N, et al. TCMSP: A database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines [J]. *J Cheminform*, 2014, 6(1): 13.

[10] Zhang L L, Han L, Wang X M, et al. Exploring the mechanisms underlying the therapeutic effect of *Salvia miltiorrhiza* in diabetic nephropathy using network pharmacology and molecular docking [J]. *Biosci Rep*, 2021, 41(6): BSR20203520.

[11] Consortium U. Reorganizing the protein space at the Universal Protein Resource (UniProt) [J]. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40: D71-D75.

[12] Doncheva N T, Morris J H, Gorodkin J, et al. Cytoscape StringApp: Network analysis and visualization of proteomics data [J]. *J Proteome Res*, 2019, 18(2): 623-632.

[13] Bai L L, Chen H, Zhou P, et al. Identification of tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) inhibitor in rheumatoid arthritis using network pharmacology and molecular docking [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 690118.

[14] 苏志伟, 田鹤, 马英丽, 等. 金莲花中总黄酮提取工艺的研究 [J]. 中草药, 2007, 38(6): 850-851.

[15] 杨天寿, 李居安, 魏锋, 等. 金莲花的薄层鉴别及其总黄酮含量测定 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(24): 91-93.

[16] 王家辉, 刘杉杉, 张鑫, 等. 牛蒡不同部位多糖的抗氧化与抗凝血活性研究 [J]. 食品工业科技, 2020, 41(6): 305-310.

[17] Dong H D, Xue T, Liu Y J, et al. Low molecular weight fucoidan inhibits pulmonary fibrosis *in vivo* and *in vitro* via antioxidant activity [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2022,

- 2022: 7038834.
- [18] Li X P, Li X H, Zhang Q B, *et al.* Low molecular weight fucoidan and its fractions inhibit renal epithelial mesenchymal transition induced by TGF- β 1 or FGF-2 [J]. *Int J Biol Macromol*, 2017, 105(Pt 2): 1482-1490.
- [19] Xu J G, Wang Y, Wang Z, *et al.* Fucoidan mitigated diabetic nephropathy through the downregulation of PKC and modulation of NF- κ B signaling pathway: *In vitro* and *in vivo* investigations [J]. *Phytother Res*, 2021, 35(4): 2133-2144.
- [20] Zhang B, Yuan Y L, Xin J, *et al.* Study of water- and organic-soluble extracts from *Trichosanthes* on type 1 diabetes mellitus [J]. *J Diabetes Res*, 2022, 2022: 3250016.
- [21] Li Y S, Xia J W, Jiang N X, *et al.* Corin protects H₂O₂-induced apoptosis through PI3K/AKT and NF- κ B pathway in cardiomyocytes [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 97: 594-599.
- [22] 赵萍, 高建. Nrf2/Keap1/ARE 信号通路与难治性呼吸系统疾病研究进展 [J]. *中国药理学通报*, 2015, 31(11): 1488-1492.
- [23] Li J C, Lu K M, Sun F L, *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.
- [24] Dong Z X, Yin E G, Yang M J, *et al.* Role and mechanism of Keap1/Nrf2 signaling pathway in the regulation of autophagy in alleviating pulmonary fibrosis [J]. *Comput Intell Neurosci*, 2022, 2022: 3564871.
- [25] Li H X, Wu M Y, Guo C Y, *et al.* Tanshinone II_A regulates Keap1/Nrf2 signal pathway by activating Sestrin2 to restrain pulmonary fibrosis [J]. *Am J Chin Med*, 2022, 50(8): 2125-2151.
- [26] Wang J C, Hu K L, Cai X Y, *et al.* Targeting PI3K/AKT signaling for treatment of idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2022, 12(1): 18-32.
- [27] Liu M W, Su M X, Tang D Y, *et al.* Ligustrazin increases lung cell autophagy and ameliorates paraquat-induced pulmonary fibrosis by inhibiting PI3K/Akt/mTOR and hedgehog signalling via increasing miR-193a expression [J]. *BMC Pulm Med*, 2019, 19(1): 35.
- [28] Hu X T, Xu Q Y, Wan H X, *et al.* PI3K-Akt-mTOR/PFKFB₃ pathway mediated lung fibroblast aerobic glycolysis and collagen synthesis in lipopolysaccharide-induced pulmonary fibrosis [J]. *Lab Invest*, 2020, 100(6): 801-811.
- [29] Song L B, Xiong H P, Li J, *et al.* Sphingosine kinase-1 enhances resistance to apoptosis through activation of PI3K/Akt/NF- κ B pathway in human non-small cell lung cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2011, 17(7): 1839-1849.
- [30] Han X, Wang S M. Deficiency of Psgl-1 accelerates bleomycin (BLM)-induced lung fibrosis and inflammation in mice through activating PI3K/AKT [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 491(2): 558-565.

[责任编辑 李亚楠]