

莪术油通过抑制铁死亡减轻博来霉素诱导的小鼠肺纤维化的机制研究

王殷彤^{1,2}, 王成功³, 贾思凝³, 俞文秀¹, 王方岩⁴, 姜程曦^{3*}, 程锦国^{2*}

1. 温州医科大学附属第二学院, 浙江 温州 325000

2. 温州医科大学附属第一学院, 浙江 温州 325000

3. 温州医科大学药学院, 浙江 温州 325000

4. 温州医科大学基础医学院, 浙江 温州 325000

摘要: 目的 探究莪术油是否通过抑制铁死亡减轻博来霉素诱导的小鼠肺纤维化及作用机制。方法 40 只雄性 C57BL/6 小鼠分为对照组、模型组和莪术油低、高剂量 (3.25、13.00 mg/kg) 组。小鼠气管插管注射博来霉素 (3 mg/kg) 制备肺纤维化模型, 造模 7 d 后开始给药, 给药组连续 14 d 隔日 ip 莪术油。给药结束后, 通过各组小鼠体质量和肺干湿质量比评估小鼠一般情况; 采用苏木素-伊红 (HE) 和 Masson 染色观察肺组织病理变化; 检测血清中炎症因子水平和肺组织中羟脯氨酸 (hydroxyproline, HYP)、氧化应激水平; Western blotting 检测肺组织中肺纤维化和铁死亡相关蛋白表达。结果 与模型组比较, 莪术油组小鼠体质量增长 ($P < 0.05$), 肺水肿程度减轻, 肺组织损伤情况好转, 胶原纤维沉积减少; 肺组织氧化产物丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 及 HYP 水平减少 ($P < 0.05$ 、 0.01), 还原酶谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 活性增加 ($P < 0.05$); 血清中炎症因子水平明显降低 ($P < 0.01$); 肺组织纤维化相关蛋白 I 型胶原蛋白 (collagen I)、 α -平滑肌肌动蛋白 (α -smooth muscle actin, α -SMA) 和波形蛋白 (vimentin) 表达下调 ($P < 0.05$ 、 0.01), 谷胱甘肽过氧化物酶 4 (glutathione peroxidase 4, GPX4) 蛋白表达上调 ($P < 0.01$), 转铁蛋白受体 1 (transferrin receptor 1, TFR1) 和二价金属转运蛋白 1 (divalent metal transporter 1, DMT1) 蛋白表达下调 ($P < 0.05$ 、 0.01)。结论 莪术油能够通过抑制铁死亡, 改善氧化应激, 抑制炎症水平, 减轻博来霉素诱导的小鼠肺纤维化。

关键词: 肺纤维化; 莪术油; 铁死亡; 氧化应激; 炎症因子

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)16-5274-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.16.016

Mechanism of Zedoary Turmeric Oil on attenuating bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice through inhibition of ferroptosis

WANG Yin-tong^{1,2}, WANG Cheng-gong³, JIA Si-ning³, YU Wen-xiu¹, WANG Fang-yan⁴, JIANG Cheng-xi³, CHENG Jin-guo²

1. The Second Affiliated College of Wenzhou Medical University, Wenzhou 325000, China

2. The First Affiliated College of Wenzhou Medical University, Wenzhou 325000, China

3. School of Pharmacy, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325000, China

4. School of Basic Medicine, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325000, China

Abstract: Objective To explore whether Zedoary Turmeric Oil (莪术油) can alleviate bleomycin induced pulmonary fibrosis in mice by inhibiting ferroptosis and the specific mechanism. **Methods** A total of 40 C57BL/6 male mice were divided into control group, model group, and Zedoary Turmeric Oil low-and high-dose (3.25, 13.00 mg/kg) groups. The model of pulmonary fibrosis was established by injecting bleomycin (3 mg/kg) through tracheal intubation in mice. The drug was administered 7 d after the model was established. The drug group was given Zedoary Turmeric Oil every other day for 14 consecutive days. After administration, the general condition of mice was evaluated by comparing their body weight and lung dry wet weight ratio in each group; Pathological changes of

收稿日期: 2023-03-07

基金项目: 温州市新型冠状病毒肺炎疫情防控应急攻关项目 (ZY202003)

作者简介: 王殷彤 (1997—), 女, 硕士研究生, 主要从事中医药防治纤维化的基础和临床研究。

*通信作者: 程锦国, 男, 主任医师, 博士生导师, 主要从事中医药防治肾脏病的基础和临床研究。E-mail: wzwsjcjg@163.com

姜程曦, 男, 研究员, 主要从事中药质量研究。E-mail: jiangchengxi@126.com

lung tissue was observed by HE and Masson staining; Levels of inflammatory factors in serum and hydroxyproline (HYP) and oxidative stress levels in lung tissue were detected; Western blotting was used to detect the expressions of pulmonary fibrosis and ferroptosis related proteins in lung tissue. **Results** Compared with model group, the body weight of mice in Zedoary Turmeric Oil group was increased ($P < 0.05$), the degree of pulmonary edema was reduced, the damage of lung tissue was improved, and the deposition of collagen fibers was reduced; The levels of oxidation products malondialdehyde (MDA) and HYP in lung tissue were decreased ($P < 0.05, 0.01$), and the activity of glutathione (GSH) was increased ($P < 0.05$); The levels of inflammatory factors in serum were significantly reduced ($P < 0.01$); Expressions of protein associated with pulmonary fibrosis collagen I, α -smooth muscle actin (α -SMA) and vimentin in lung tissue were down-regulated ($P < 0.05, 0.01$), glutathione peroxidase 4 (GPX4) protein expression was up-regulated ($P < 0.01$), transferrin receptor 1 (TFR1) and divalent metal transporter 1 (DMT1) protein expressions were down-regulated ($P < 0.05, 0.01$). **Conclusion** Zedoary Turmeric Oil can alleviate bleomycin induced-pulmonary fibrosis in mice by inhibiting ferroptosis, improving oxidative stress and inhibiting inflammation.

Key words: pulmonary fibrosis; Zedoary Turmeric Oil; ferroptosis; oxidative stress; inflammatory factors

特发性肺纤维化 (idiopathic pulmonary fibrosis, IPF) 是一种慢性、高死亡率的间质性肺病, 由于成纤维细胞过度积聚, 细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 广泛沉积, 最终导致肺泡结构受损, 肺功能逐渐下降。IPF 的预后较差, 患者的生活质量受到严重的影响, 并且由于继发性呼吸衰竭通常在诊断后 2~5 年内死亡^[1-2]。吡非尼酮和尼达尼布在 2014 年被指南推荐用于 IPF 的临床治疗, 但这 2 种药物的价格高昂, 且无法彻底逆转纤维化^[3-4]。因此探索经济并且可以有效延缓或治疗肺纤维化的药物尤为重要。

莪术油是莪术 *Curcumae Rhizoma* 的提取物, 价格经济实惠, 其主要成分包括莪术醇、莪术二酮、莪术酮、榄香烯等, 具有抗肿瘤、抗菌、抗血栓形成等多种药理作用^[5-7]。研究表明, 莪术醇可下调肺纤维化大鼠肺组织中转生长因子- β 1 (transforming growth factor- β 1, TGF- β 1) 和纤溶酶原激活剂抑制剂-1 的表达, 缓解博来霉素引起的大鼠肺纤维化^[8], 但其具体作用机制尚不明晰。铁死亡作为一种新的细胞死亡形式, 与铁代谢紊乱、脂质过氧化积累、谷胱甘肽过氧化物酶 4 (glutathione peroxidase 4, GPX4)、谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 缺乏有关, 参与了纤维化的形成^[9-10]。研究表明, 泛素样含 PHD 和环指域 1 (ubiquitin-like with PHD and ring finger domains 1, Uhrf1) 可通过调节 GPX4 和铁死亡抑制蛋白 1 (ferroptosis suppressor protein 1, FSP1) 的水平, 从而促进肺纤维化; 通过使用铁死亡抑制剂, 抑制铁的累积能够缓解由博来霉素诱导的小鼠肺纤维化, 提示铁死亡在肺纤维化的发生发展中可能扮演着重要的角色^[11-12]。本研究拟采用莪术油对博来霉素诱导的小鼠肺纤维化模型进行干预

治疗, 以明确莪术油对肺纤维化的疗效, 并通过检测 GPX4、转铁蛋白受体 1 (transferrin receptor 1, TFR1)、二价金属转运蛋白 1 (divalent metal transporter 1, DMT1) 等铁死亡关键蛋白, 进一步阐述其作用机制。

1 材料

1.1 动物

40 只 SPF 级健康雄性 C57BL/6 小鼠, 体质量 20~25 g, 6~8 周龄, 购自浙江维通利华实验动物技术有限公司, 许可证号 SYXK (浙) 2021-0020。动物饲养于温州医科大学实验动物中心, 温度 20~25 °C, 相对湿度 40%~70%, 人工昼夜明暗交替 12 h/12 h, 自由进食饮水。动物实验通过温州医科大学实验动物伦理审查会审查 (批准号 wyd2022-0635)。

1.2 药品与试剂

莪术油 (批号 5190513) 受赠于合肥未来药物开发有限公司, 含牻牛儿酮 ($C_{15}H_{22}O$) 8.2%、呋喃二烯 ($C_{15}H_{20}O$) 10.5%, 符合《中国药典》2020 年版规定; 博来霉素 (批号 410730, 进口药品注册证号 H20171103) 由日本化药株式会社生产, 购自温州医科大学附属第一医院; 苏木素-伊红 (HE) 染色试剂盒 (批号 G1340)、Masson 染色试剂盒 (批号 G1120) 购自北京索莱宝科技有限公司; PVDF 膜 (批号 IPVH00010、ISEQ00010) 购自美国 Millipore 公司; 兔抗 β -actin 抗体 (批号 ab8227)、兔抗 Tubulin 抗体 (批号 ab210797)、兔抗 I 型胶原蛋白 (collagen I) 抗体 (批号 ab260043)、兔抗 α -平滑肌肌动蛋白 (α -smooth muscle actin, α -SMA) 抗体 (批号 ab124964)、兔抗 GPX4 抗体 (批号 ab125066)、兔抗 TFR1 抗体 (批号 ab214039)、HRP 标记的山羊抗兔二抗 (批号 ab205718)、Alexa Fluor® 488 标记

的山羊抗兔 IgG 二抗(批号 150077)、封固剂 DAPI(批号 ab104139)购自英国 Abcam 公司;兔抗波形蛋白(vimentin)抗体(批号 5741)购自美国 CST 公司;兔抗 DMT1(批号 NBP1-91840)购自美国 Novus 公司;小鼠白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)ELISA 试剂盒(批号 JL20268)、小鼠肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)ELISA 试剂盒(批号 JL10484)、小鼠 IL-1 β ELISA 试剂盒(批号 JL18442)购自上海江莱生物科技有限公司;GSH 测定试剂盒(批号 A006-1-1)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)测定试剂盒(批号 A003-1-2)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)测定试剂盒(批号 A001-3-2)、羟脯氨酸(hydroxyproline, HYP)测定试剂盒(批号 A030-2-1)购自南京建成生物工程研究所。

1.3 仪器

165-8001 型电泳仪、转膜仪(美国 Bio-Rad 公司);JS-M6P 型凝胶成像系统(上海培清科技生物公司);TGL-16gR 型低温离心机(上海安亭科学仪器厂);BSA224S 型电子分析天平(赛多利斯公司);SpectraMax 190 型全波长酶标仪(美国 Molecular Devices 公司);80i 型正置荧光显微镜(日本 Nikon 公司);HistoCore Arcadia 型石蜡包埋机、RM2235 型石蜡切片机(德国 Leica 公司)。

2 方法

2.1 动物分组、造模及给药

小鼠适应性喂养 1 周后,随机分为对照组(10 只)和造模组(30 只)。小鼠 ip 2%戊巴比妥钠(45 mg/kg)麻醉,固定后灯光下寻找气管,插入留置针。造模组小鼠通过气管插管注射博来霉素(3 mg/kg)^[13],对照组注射生理盐水。造模完成后立即旋转小鼠,使博来霉素或生理盐水可以均匀分布肺中。待小鼠苏醒后,观察一般情况。根据课题组前期研究,以莪术油推荐成人每日最佳使用量换算作为低剂量,为了更好评估有效剂量的范围,以 4 倍临床剂量作为高剂量。将 30 只造模组小鼠随机分为模型组和莪术油低、高剂量(3.25、13.00 mg/kg)组。造模 7 d 后开始给药,给药组连续 14 d 隔日 ip 莪术油,对照组和模型组 ip 等体积生理盐水,第 21 天处死小鼠。

2.2 样本收集

末次给药 2 h 后,腹主动脉采血后处死小鼠,取血清用于 ELISA 检测。小鼠乙醇局部消毒,沿前中线剪开胸腔,暴露气管和心肺器官。用手术线结

扎右肺,取右肺上叶保存,余下置于液氮中保存用于后续实验。分离气管后,用眼科剪在气管上端剪一“Y”形小口,插入留置针,左肺中打入 4%多聚甲醛固定液,直至左肺饱满,结扎左肺剪下,固定后进行石蜡包埋。

2.3 小鼠体质量及肺干湿质量比测定

每天记录小鼠体质量,给药结束后,取右肺上叶,称定质量后,80 °C 烘箱中烘烤 72 h,直至质量恒定,称定质量,计算肺干湿质量比,用于反映肺组织含水量。

2.4 肺组织病理学观察

取固定后的肺组织,梯度乙醇脱水、透明、浸蜡后进行石蜡包埋,切片(厚度 4 μ m),脱蜡至水,进行 HE 和 Masson 染色,脱水,中性胶封片,于显微镜下观察肺组织病理变化。

2.5 免疫荧光法检测肺组织 collagen I 和 GPX4 蛋白表达

取固定后的肺组织,梯度乙醇脱水、透明、浸蜡后进行石蜡包埋,切片(厚 4 μ m),脱蜡至水,抗原修复后加入 0.2%牛血清白蛋白,室温封闭 30 min,滴加 collagen I(1:500)、GPX4(1:200)抗体,4 °C 过夜孵育。室温复温 1 h 后,加入荧光二抗避光孵育 1 h。DAPI 复染 10 min 后,滴加防荧光淬灭剂封片。正置荧光显微镜下观察并拍照。DAPI 紫外激发波长 330~380 nm,发射波长 420 nm,发蓝光;FITC 激发波长 465~495 nm,发射波长 515~555 nm,发绿光。

2.6 肺组织中氧化应激指标及 HYP 含量测定

按照试剂盒说明书检测各组小鼠肺组织中 GSH、MDA、SOD 和 HYP 含量。

2.7 血清中炎症因子水平检测

按照试剂盒说明书检测各组小鼠血清中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 含量。

2.8 Western blotting 检测肺组织 collagen I、 α -SMA、vimentin、GPX4、TFR1、DMT1 蛋白表达

取各组小鼠肺组织,按照 50:1 的比例加入 RIPA 裂解液和蛋白酶抑制剂,提取组织蛋白。BCA 法进行蛋白定量测定蛋白浓度,变性后的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%脱脂奶粉,室温封闭 1 h;分别加入 collagen I 抗体(1:500)、 α -SMA 抗体(1:10 000)、vimentin 抗体(1:1000)、GPX4 抗体(1:5000)、TFR1 抗体(1:5000)、DMT1 抗体(1:

1000)、Tubulin 抗体(1:1000)和 β -actin 抗体(1:1000), 4 °C 孵育过夜; 洗膜后, 加入 HRP 标记山羊抗兔 IgG 抗体, 室温孵育 1 h, 洗膜。滴加 ECL 曝光液, 放入曝光机中成像, 用 Image J 图像软件分析对条带灰度。

2.9 统计学分析

所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 以 Graphpad prism 9 统计软件进行分析处理, 多组间比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA), 再通过 Tukey's 检验来校正。

3 结果

3.1 莪术油缓解肺纤维化小鼠体质量减轻及肺水肿

如图 1-A 所示, 造模 7 d 后, 对照组小鼠体质量增加, 造模组小鼠体质量均下降; 给药后, 与模型组比较, 莪术油低剂量组小鼠体质量显著增长 ($P < 0.05$)。如图 1-B 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠肺干湿质量比显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 莪术油低剂量组小鼠肺干湿质量比显著降低 ($P < 0.05$)。

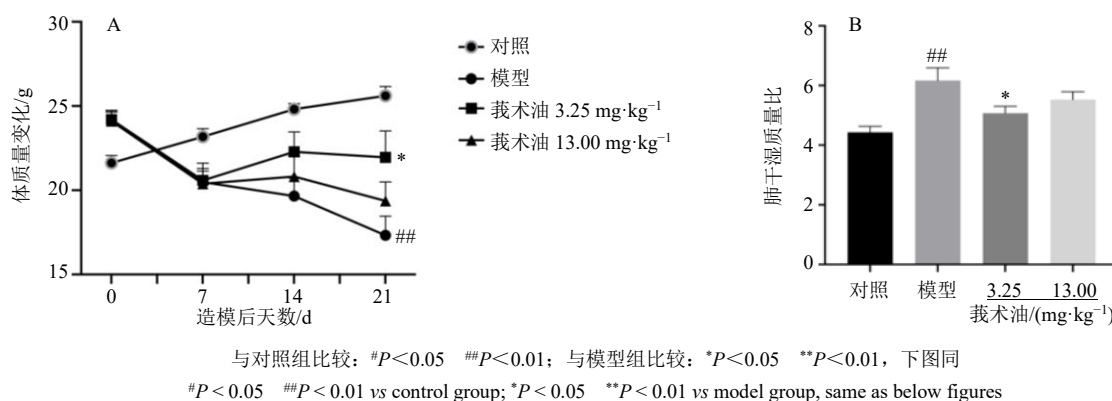


图 1 莪术油对肺纤维化小鼠体质量 (A) 和肺干湿质量比 (B) 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

Fig. 1 Effect of Zedoary Turmeric Oil on body weight (A) and lung dry-wet weight ratio (B) in mice with pulmonary fibrosis ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

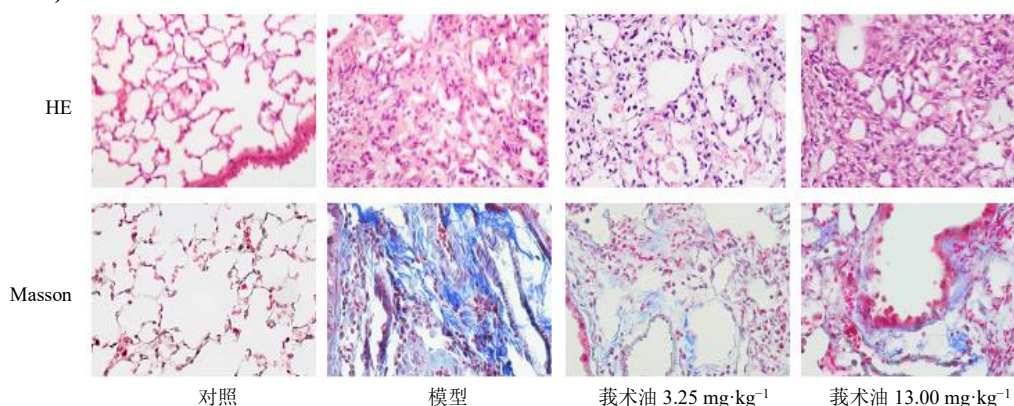


图 2 莪术油对肺纤维化小鼠肺组织病理变化的影响 (×400)

Fig. 2 Effect of Zedoary Turmeric Oil on pathological changes in lung tissue of mice with pulmonary fibrosis (×400)

3.2 莪术油减少肺纤维化小鼠肺组织纤维化改变和胶原沉积

如图 2 所示, HE 染色结果表明, 对照组小鼠肺组织结构清晰完整, 肺泡和肺泡间隔正常, 未见明显的病理性改变, 未见胶原沉积。模型组小鼠的肺组织结构排列紊乱, 肺泡壁显著增厚, 肺泡不完整甚至不可见, 肺泡腔内有大量的纤维组织团聚集, 间质部分可见肌成纤维细胞增生, 同时伴有炎性浸润。与模型组相比, 莪术油组肺泡结构更加完整, 炎性细胞浸润程度更轻, 纤维化改变更少。Masson 染色结果表明, 与对照组相比, 模型组小鼠肺组织中存在明显的间质内蓝色条索样胶原纤维沉积, 伴随肺泡壁增厚和肺纹理紊乱。与模型组相比, 莪术油组肺组织内的胶原沉积有一定程度减少。

3.3 莪术油减少肺纤维化小鼠肺组织中纤维化相关蛋白表达

如图 3 所示, Western blotting 结果显示, 与对照组比较, 模型组肺组织中 collagen I、 α -SMA、vimentin 蛋白表达均明显升高 ($P < 0.05, 0.01$); 与模型组比

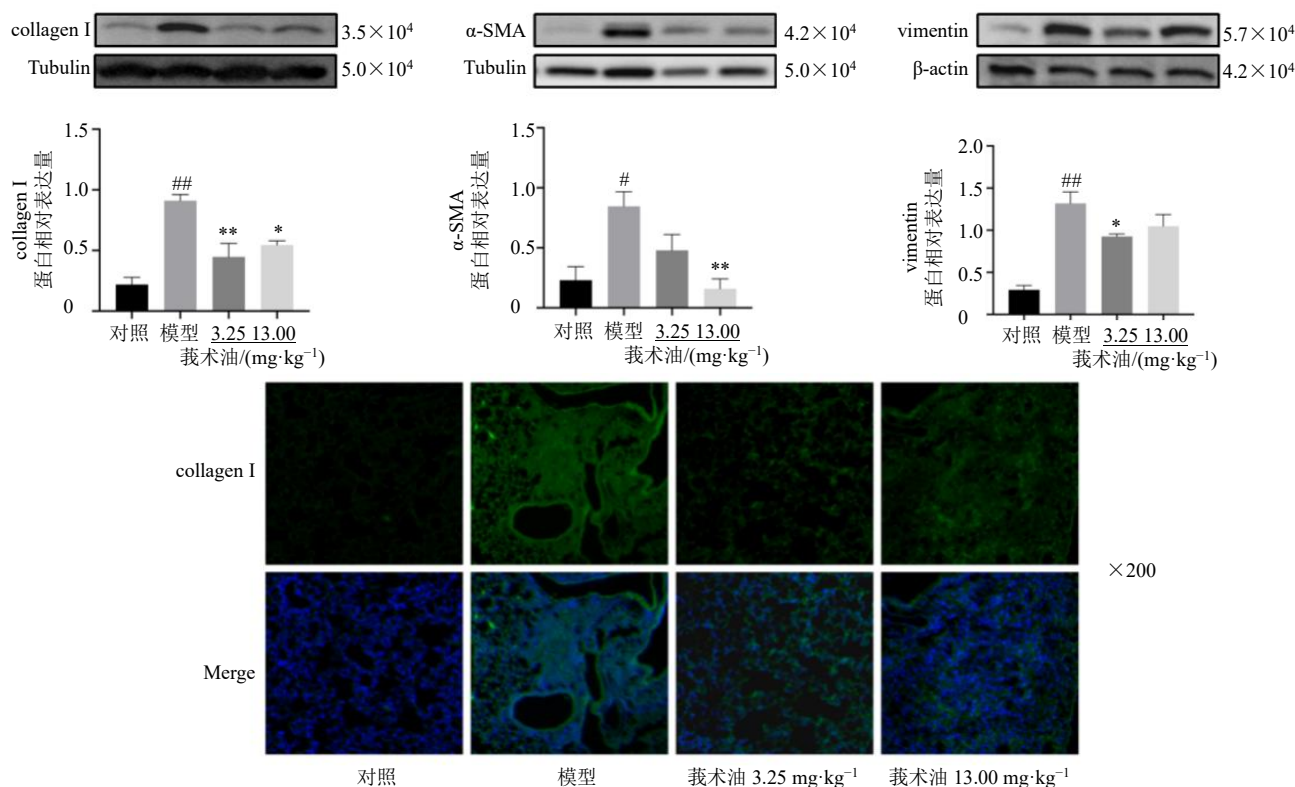


图3 莪术油对肺纤维化小鼠肺组织中 collagen I、α-SMA 和 vimentin 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 3 Effect of Zedoary Turmeric Oil on collagen I, α-SMA and vimentin protein expressions in lung tissue of mice with pulmonary fibrosis ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

较, 莪术油各剂量组 collagen I 蛋白表达显著降低, 莪术油低剂量组 vimentin 蛋白表达显著下调 ($P < 0.05$), 莪术油高剂量组 α-SMA 蛋白表达显著下调 ($P < 0.01$)。免疫荧光染色结果与 Western blotting 结果一致, 与对照组比较, 模型组 collagen I 阳性表达增加; 与模型组比较, 莪术油组 collagen I 阳性表达减少。

3.4 莪术油降低肺纤维化小鼠血清中 IL-1β、IL-6、TNF-α 水平

如图 4 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠血清

中 IL-1β、IL-6、TNF-α 水平均显著升高 ($P < 0.05$, 0.01); 与模型组比较, 莪术油低剂量组小鼠血清中 IL-1β、IL-6、TNF-α 水平均显著降低 ($P < 0.01$)。

3.5 莪术油改善肺纤维化小鼠氧化应激及减少 HYP

如图 5 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠肺组织中 MDA 和 HYP 含量显著升高 ($P < 0.01$), GSH 含量显著降低 ($P < 0.01$), SOD 活性呈降低趋势; 与模型组比较, 莪术油各剂量组 GSH 含量显著升

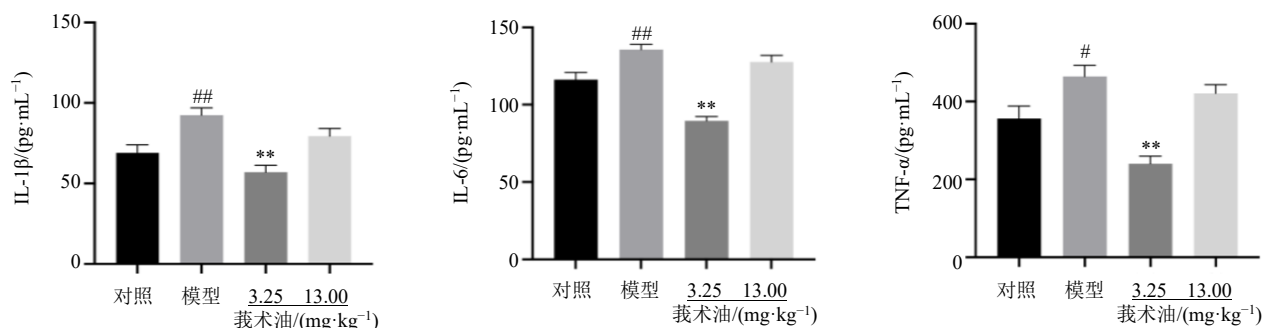


图4 莪术油对肺纤维化小鼠血清中炎症因子水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

Fig. 4 Effect of Zedoary Turmeric Oil on levels of inflammatory factors in serum of mice with pulmonary fibrosis ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

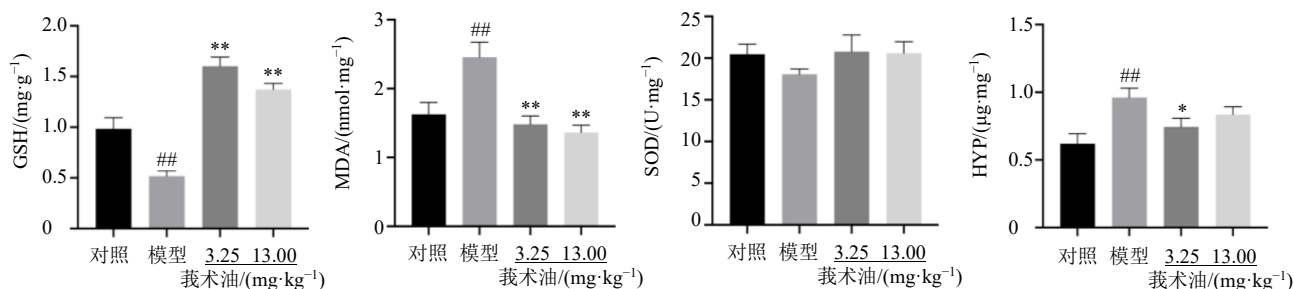


图 5 莪术油对肺纤维化小鼠肺组织中氧化应激指标和 HYP 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 5 Effect of Zedoary Turmeric Oil on contents of oxidative stress indexes and HYP in lung tissue of mice with pulmonary fibrosis ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

高 ($P < 0.01$), MDA 含量显著降低 ($P < 0.01$), SOD 活性呈升高趋势; 莪术油低剂量组 HYP 含量显著降低 ($P < 0.05$)。

3.6 莪术油抑制肺纤维化小鼠肺组织中铁死亡相关蛋白表达

如图 6 所示, 与对照组比较, 模型组肺组织中 GPX4 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.01$), TFR1 和

DMT1 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05, 0.01$); 与模型组比较, 莪术油各剂量组 GPX4 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.01$), TFR1 和 DMT1 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05, 0.01$)。免疫荧光染色结果与 Western blotting 结果一致, 与对照组比较, 模型组 GPX4 阳性表达减少; 与模型组比较, 莪术油组 GPX4 阳性表达增加。

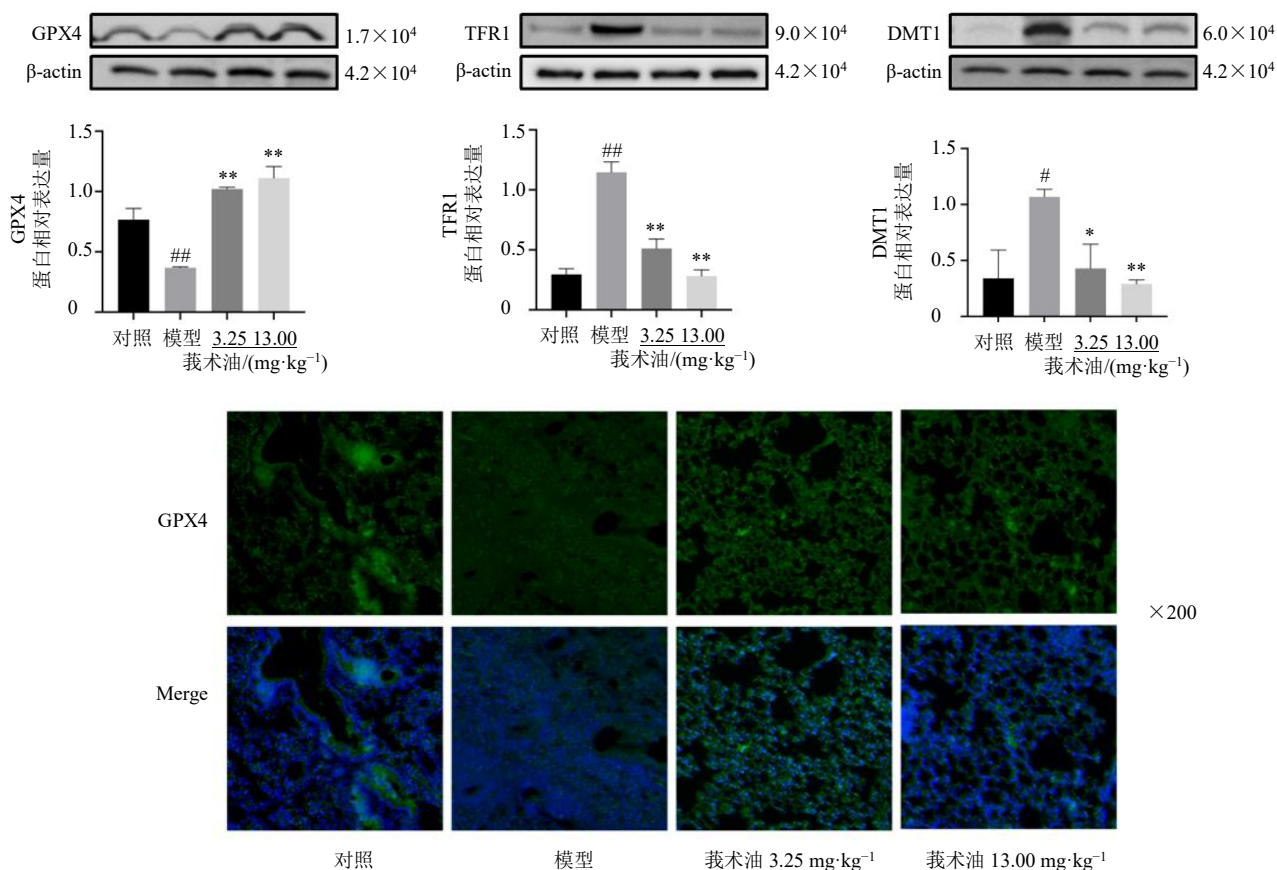


图 6 莪术油对肺纤维化小鼠肺组织中 GPX4、TFR1 和 DMT1 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 6 Effect of Zedoary Turmeric Oil on GPX4, TFR1 and DMT1 protein expressions in lung tissue of mice with pulmonary fibrosis ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

4 讨论

肺纤维化是一种慢性间质性肺病，主要特征为 ECM 的过度表达和沉积、肌成纤维细胞形成的纤维灶累积以及肺重塑异常^[14]。上皮-间充质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 是间充质细胞产生和 ECM 过度分泌的重要途径之一，最终可能导致肺纤维化的发生^[15]。EMT 的过程主要表现为上皮黏附蛋白下调和间质细胞标记物 α -SMA 上调，同时包括纤连蛋白、vimentin、collogen I、collogen III、collogen IV 等的生成^[16]。莪术为姜科姜黄属植物，其性温，味辛、苦，归肝、脾经，其功效为破血祛瘀行气、消肿止痛。莪术油是从莪术中提取的挥发油，临床常用于抗炎、抗肿瘤治疗^[17]。本课题组前期研究已证实莪术提取物对脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 引起的小鼠急性肺损伤有一定的改善作用^[18]，但对博来霉素诱导的小鼠肺纤维化是否有改善作用及其作用机制尚未明确。

铁死亡是一种新型程序性细胞死亡，其特征为细胞内铁过载和活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 积累^[19]。铁离子是脂质过氧化物积累和铁死亡过程所必需的。因此，参与铁离子结合、转运、解离和储存的蛋白在铁死亡的调节中起着重要作用。 Fe^{3+} 与转铁蛋白结合后通过膜上的 TFR 进入细胞。随后，细胞中的 Fe^{3+} 被前列腺六跨膜上皮抗原 3 (six-transmembrane epithelial antigen of prostate 3, STEAP3) 还原为 Fe^{2+} ， Fe^{2+} 通过 DMT1 或锌-铁调节蛋白家族 8/14 (zinc-iron regulatory protein family 8/14, ZIP8/14) 释放到细胞质中。这些相关蛋白的异常表达或功能障碍会使细胞内铁离子浓度失衡，导致铁过载。GPX4 可减弱脂质过氧化物的毒性并维持双层脂质细胞膜稳定性，表明它是铁死亡的中枢调节因子^[20]。GPX4 表达降低导致细胞内脂质过氧化物累积，最终引起铁死亡^[21]。研究发现，肺纤维化和肺损伤的诱导剂博来霉素和 LPS 可以诱导肺上皮细胞发生铁死亡。铁死亡抑制剂利普罗他汀-1 (liproxstatin-1, Lip-1) 可通过减少脂质过氧化，抑制铁死亡缓解博来霉素或 LPS 诱导的肺纤维化症状。TGF- β 刺激上调人肺成纤维 MRC-5 细胞和小鼠原代肺成纤维细胞中 TFR1 的表达，导致细胞内 Fe^{2+} 增加，从而促进成纤维细胞向肌成纤维细胞的转化^[12]。还有研究发现，一些化合物和传统中药证实了铁死亡与纤维化之间存在联系^[22-23]。表明铁死亡在肺纤维化的发生和发展中起着重要作用。因此，

通过抑制铁死亡来缓解肺纤维化具有较高的创新性和实际应用价值。

本研究采用博来霉素诱导建立小鼠肺纤维化模型，造模 7 d 后隔日给予不同剂量莪术油治疗，给药 14 d 后，收集小鼠肺组织用于后续实验。实验结果表明，莪术油改善了博来霉素引起的小鼠体质量减轻和肺干湿质量比增加。进一步，HE 染色结果表明，与模型组相比，莪术油治疗组小鼠肺组织结构更加完整，炎性细胞浸润程度更轻，肺脏纤维化改变减少；Masson 染色结果表明，与模型组相比，莪术油治疗组小鼠肺组织中胶原明显减少。肺泡上皮细胞向成纤维细胞，以及成纤维细胞向肌成纤维细胞的转化在肺纤维化的发病机制中起着至关重要的作用。本研究结果显示，模型组小鼠肺组织 collagen I、 α -SMA、vimentin 蛋白表达上调，且肺组织中 collagen I 沉积增多，表明博来霉素诱导的小鼠肺纤维化中有 EMT 发生；莪术油治疗减少了肺泡上皮细胞向成纤维细胞，及成纤维细胞向肌成纤维细胞的转化，下调了这些相关蛋白的表达。表明莪术油可以通过调节 EMT，抑制上皮细胞转化或成纤维细胞转化从而改善肺纤维化。HYP 为胶原纤维所特有，因此可以通过检测 HYP 的含量，从而评估纤维化程度。结果表明，莪术油治疗组可以在一定程度上改善小鼠肺组织中的纤维化程度。

研究表明，肺纤维化的发展与多种炎症因子相关，肺纤维化极易出现 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的过表达，高水平的 TNF- α 增加胶原沉积，导致肺损伤^[24]；IL-1 β 和 IL-6 通过激活 TGF- β 信号通路诱导 EMT 发生^[25-26]。结果显示，博来霉素诱导的小鼠肺组织中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平提高，而经过莪术油干预后肺纤维化小鼠血清中相关炎症因子有所减少，其中莪术油低剂量组的下调作用明显，说明低剂量莪术油可能通过降低与纤维化相关的炎症因子水平，达到改善博来霉素诱导的小鼠肺纤维化的目的。研究证实，氧化应激促进了肺纤维化的产生，在肺纤维化的过程中，氧化应激水平提高，大量 ROS 产生，肺泡上皮细胞发生铁死亡，促进了成纤维细胞转化和肌成纤维细胞分化，引起了 ECM 过表达和过量沉积，最终导致了纤维化的产生^[27]。结果显示，肺纤维化的产生会引起氧化应激相关产物 (MDA)、还原酶 (GSH、SOD) 的活性改变，通过莪术油治疗可以下调 MDA 表达、上调 GSH 表达。说明莪术油可以改善博来霉素诱导的小鼠肺纤维化组织中的

氧化损伤程度。Western blotting 法检测铁死亡相关蛋白表达, 结果表明, 与模型组相比, 莪术油给药治疗后 GPX4 表达上调, TFR1 和 DMT1 表达下调, 免疫荧光染色结果与 Western blotting 一致。说明莪术油减轻肺纤维化小鼠纤维化程度可能是通过抑制铁死亡实现的。莪术油作为一种中草药, 具有天然、经济、易获取等优势, 可以为肺纤维化患者提供有效的治疗选择。此外, 最新的研究结果表明, 雷公藤可以通过调节核因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor E2 related factor 2, Nrf2) /血红素氧合酶-1 (heme oxygenase-1, HO-1) 通路抑制铁死亡, 从而减轻百草枯所致的急性肺损伤和肺纤维化^[28], 与本实验结论相吻合。证明了中草药的多成分、多靶点特性也为肺纤维化的个体化治疗提供了新的思路和方法。

综上, 本研究发现博来霉素通过促进炎症因子释放, 诱导氧化失衡, 从而激活铁死亡引起小鼠肺组织发生 ECM 沉积, 纤维化形成。莪术油干预后改善肺组织的炎症状态, 重建氧化还原平衡状态, 上调肺组织中 GPX4, 下调 TFR1 和 DMT1 的表达从而抑制铁死亡, 减少胶原沉积, 最终减轻博来霉素诱导的小鼠肺纤维化。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Gross T J, Hunninghake G W. Idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *N Engl J Med*, 2001, 345(7): 517-525.
- [2] Noble P W, Barkauskas C E, Jiang D H. Pulmonary fibrosis: Patterns and perpetrators [J]. *J Clin Invest*, 2012, 122(8): 2756-2762.
- [3] King T E Jr, Jr B, Castro-Bernardini S, et al. A phase 3 trial of pirfenidone in patients with idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *N Engl J Med*, 2014, 370(22): 2083-2092.
- [4] Richeldi L, du Bois R M, Raghu G, et al. Efficacy and safety of nintedanib in idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *N Engl J Med*, 2014, 370(22): 2071-2082.
- [5] Chen K D, Li G P, Cui H R, et al. Systems pharmacology and GC-MS metabolomics reveal the efficacy and mechanisms of zedoary oil on acute liver injury induced by oxidative stress [J]. *Phytomedicine*, 2022, 104: 154295.
- [6] 孔红芳, 袁书同, 袁飞龙, 等. 莪术油注射液化学成分、药理作用和临床应用的研究进展 [J]. *中草药*, 2023, 54(12): 4053-4060.
- [7] 姜程曦, 郭月琴, 张淑君, 等. 莪术油注射液协同治疗新型冠状病毒肺炎 (COVID-19) 可行性浅析 [J]. *中草药*, 2020, 51(11): 3062-3069.
- [8] 顾燕兰, 张雅琴, 孙钢. 莪术醇对大鼠肺纤维化模型的干预作用及对 TGF- β 1 和 PAI-1 表达的影响 [J]. *中医药导报*, 2019, 25(10): 27-31.
- [9] Xie Y, Hou W, Song X, et al. Ferroptosis: Process and function [J]. *Cell Death Differ*, 2016, 23(3): 369-379.
- [10] Gong Y, Wang N, Liu N G, et al. Lipid peroxidation and GPX4 inhibition are common causes for myofibroblast differentiation and ferroptosis [J]. *DNA Cell Biol*, 2019, 38(7): 725-733.
- [11] Liu Y, Cheng D M, Wang Y, et al. UHRF1-mediated ferroptosis promotes pulmonary fibrosis via epigenetic repression of GPX4 and FSP1 genes [J]. *Cell Death Dis*, 2022, 13(12): 1070.
- [12] Pei Z, Qin Y F, Fu X H, et al. Inhibition of ferroptosis and iron accumulation alleviates pulmonary fibrosis in a bleomycin model [J]. *Redox Biol*, 2022, 57: 102509.
- [13] Lazo J S, Hoyt D G, Sebti S M, et al. Bleomycin: A pharmacologic tool in the study of the pathogenesis of interstitial pulmonary fibrosis [J]. *Pharmacol Ther*, 1990, 47(3): 347-358.
- [14] Chapman H A. Epithelial-mesenchymal interactions in pulmonary fibrosis [J]. *Annu Rev Physiol*, 2011, 73: 413-435.
- [15] Kim K K, Kugler M C, Wolters P J, et al. Alveolar epithelial cell mesenchymal transition develops *in vivo* during pulmonary fibrosis and is regulated by the extracellular matrix [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(35): 13180-13185.
- [16] Lederer D J, Martinez F J. Idiopathic Pulmonary Fibrosis [J]. *N Engl J Med*, 2018, 378(19): 1811-1823.
- [17] 魏巍, 王冰瑶. 莪术及其主要成分的药理作用研究进展 [J]. *药物评价研究*, 2022, 45(10): 2154-2160.
- [18] Wu Y Z, Zhang Q, Wei X H, et al. Multiple anti-inflammatory mechanisms of Zedoary Turmeric Oil Injection against lipopolysaccharides-induced acute lung injury in rats elucidated by network pharmacology combined with transcriptomics [J]. *Phytomedicine*, 2022, 106: 154418.
- [19] Stockwell B R, Friedmann Angeli J P, Bayir H, et al. Ferroptosis: A regulated cell death nexus linking metabolism, redox biology, and disease [J]. *Cell*, 2017, 171(2): 273-285.
- [20] Xu W T, Deng H M, Hu S, et al. Role of ferroptosis in lung diseases [J]. *J Inflamm Res*, 2021, 14: 2079-2090.
- [21] Kim S, Kang S W, Joo J, et al. Characterization of ferroptosis in kidney tubular cell death under diabetic conditions [J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12(2): 160.
- [22] Zhang Z L, Guo M, Li Y J, et al. RNA-binding protein

- ZFP36/TTP protects against ferroptosis by regulating autophagy signaling pathway in hepatic stellate cells [J]. *Autophagy*, 2020, 16(8): 1482-1505.
- [23] Kong Z Y, Liu R, Cheng Y R. Artesunate alleviates liver fibrosis by regulating ferroptosis signaling pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 109: 2043-2053.
- [24] Shao S Q, Qu Z Y, Liang Y W, *et al.* Igaratimod decreases bleomycin-induced pulmonary fibrosis in association with inhibition of TNF- α in mice [J]. *Int Immunopharmacol*, 2021, 99: 107936.
- [25] Epstein Shochet G, Brook E, Bardenstein-Wald B, *et al.* TGF- β pathway activation by idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) fibroblast derived soluble factors is mediated by IL-6 trans-signaling [J]. *Respir Res*, 2020, 21(1): 56.
- [26] Zhang W J, Chen S J, Zhou S C, *et al.* Inflammasomes and fibrosis [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 643149.
- [27] Otoupalova E, Smith S, Cheng G, *et al.* Oxidative stress in pulmonary fibrosis [J]. *Compr Physiol*, 2020, 10(2): 509-547.
- [28] Song C Y, Feng M X, Li L, *et al.* *Tripterygium wilfordii* Hook. f. ameliorates paraquat-induced lung injury by reducing oxidative stress and ferroptosis via Nrf2/HO-1 pathway [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2023, 252: 114575.

[责任编辑 李亚楠]

更正声明

作者李云、刘天宇、袁恒杰、李正翔于《中草药》2023 年 54 卷 15 期发表的《基于网络药理学和实验验证探讨甘草防治非酒精性脂肪肝病及肥胖的作用机制》一文，由于作者疏忽，发表时第一作者所属单位遗漏，且单位顺序颠倒。经全体作者签字，并由作者所在单位盖章同意，更正如下：

原作者及单位：

李 云¹，刘天宇²，袁恒杰¹，李正翔^{1*}

1. 天津医科大学总医院 药剂科，天津 300052
2. 天津医科大学总医院 消化科，天津 300052

更正后作者及单位为：

李 云^{1,2}，刘天宇¹，袁恒杰²，李正翔^{2*}

1. 天津医科大学总医院 消化科，天津 300052
2. 天津医科大学总医院 药剂科，天津 300052

特此告知并诚挚地向读者致歉。