

• 药理与临床 •

基于空间代谢组学探究川贝母抗肺纤维化的作用机制 (II)

秦善博^{1,2}, 谭 鹏^{1*}, 郝 露¹, 谢俊杰², 林俊芝³, 张 磊¹, 赵军宁¹

1. 四川省中医药科学院, 国家中医药管理局中药质量生物评价重点实验室, 四川 成都 610041

2. 成都大学食品与生物工程学院, 四川 成都 610106

3. 成都中医药大学附属医院, 代谢性疾病中医药调控四川省重点实验室, 四川 成都 610075

摘要: **目的** 利用空间代谢组学技术结合常规药理实验探究川贝母 *Fritillariae Cirrhosae Bulbus* 抗肺纤维化的作用机制。**方法** 60 只 SD 大鼠随机分为空白组、模型组及川贝母高、中、低剂量组, 每组 12 只。除空白组外, 均采用气管注射博来霉素建立大鼠肺纤维化模型, 川贝母高、中、低剂量组连续 28 d 给 0.36、0.18、0.09 g/kg 川贝母粉的水溶液, 空白组和模型组给等体积蒸馏水。末次给药后对大鼠肺组织样本进行苏木素-伊红和 Masson 染色病理分析, 并采用空气动力辅助解吸电喷雾离子化质谱成像技术对空白组和川贝母中剂量组大鼠肺组织纤维化区域进行空间代谢组学分析, 基于代谢组学分析结果结合生物信息学筛选出相关性强的信号通路, 并通过检测常规药理指标对川贝母在上皮-间质转化方面的作用机制进行验证。采用 ELISA 法测定血清中转化生长因子- $\beta 1$ (transforming growth factor- $\beta 1$, TGF- $\beta 1$) 的含量, 采用羟脯氨酸测定试剂盒测定肺组织中羟脯氨酸含量, 采用 Western blotting 法测定肺组织中 Smad 2/3、p-Smad 2/3、E-钙黏蛋白 (E-cadherin)、 α -平滑肌肌动蛋白 (α -smooth muscle actin, α -SMA)、蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt)、p-Akt 表达。**结果** 空间代谢组学分析出 71 个差异代谢物及其空间信息, 并富集出精氨酸脯氨酸、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 信号通路等 8 条代谢途径。与模型组相比, 给药川贝母后, 大鼠肺组织中炎症细胞浸润和纤维组织增生现象减少, 胶原蛋白纤维下降; 血清中 TGF- $\beta 1$ 和肺组织中羟脯氨酸含量降低 ($P < 0.05$), 肺组织中 Smad 2/3 磷酸化水平和 α -SMA 蛋白表达水平降低 ($P < 0.05$), E-cadherin 蛋白表达水平升高 ($P < 0.05$)。**结论** 川贝母粉能够在一定程度上改善博来霉素诱导的大鼠肺纤维化, 其作用机制可能是通过调控上皮-间质转化、抑制细胞外基质沉积等相关途径实现的。

关键词: 川贝母; 肺纤维化; 空间代谢组学; 上皮-间质转化; 细胞外基质**中图分类号:** R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2024)02-0479-10**DOI:** 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.02.013**Mechanism of *Fritillariae Cirrhosae Bulbus* against pulmonary fibrosis based on spatial metabolomics (II)**QIN Shanbo^{1,2}, TAN Peng¹, HAO Lu¹, XIE Junjie², LIN Junzhi³, ZHANG Lei¹, ZHAO Junning¹

1. Key Laboratory of Biological Evaluation of TCM Quality of the State Administration of Traditional Chinese Medicine, Sichuan Academy of Chinese Medicine Sciences, Chengdu 610041, China

2. College of Food and Bioengineering, Chengdu University, Chengdu 610106, China

3. Traditional Chinese Medicine Regulating Metabolic Diseases Key Laboratory of Sichuan Province, Hospital of Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, China

Abstract: Objective To investigate the mechanism of Chuanbeimu (*Fritillariae Cirrhosae Bulbus*, FCB) anti-pulmonary fibrosis based on spatial metabolomics technology combined with conventional pharmacological experiments. **Methods** Sixty SD rats were randomly allocated into control group, model group, and high-, medium-, and low-dose FCB groups, with 12 rats in each group. Apart

收稿日期: 2023-08-11**基金项目:** 四川省科技厅重点研发项目 (2022YFS0429); 四川省国际港澳台科技创新合作项目 (2023YFH0104); 四川省中医药管理局项目 (2023MS496); 四川省科研院所基本科研项目 (2022JDKY0036)**作者简介:** 秦善博, 硕士研究生, 主要从事药食两用中药材大健康产品研究。E-mail: 1193023297@qq.com***通信作者:** 谭 鹏, 副研究员, 博士, 主要从事中药质量标准 and 品质评价研究。E-mail: 410578772@qq.com

from the control group, all groups were subjected to tracheal injections of bleomycin to establish a rat model of pulmonary fibrosis. The high-, medium-, and low-dose FCB groups received gavage administration of 0.36, 0.18, and 0.09 g/kg FCB powder solution, respectively, for 28 consecutive days. The control and model groups were administered an equivalent volume of distilled water by gavage. After the final administration, pathological analysis of rat lung tissue samples was conducted using hematoxylin-eosin and Masson staining. Furthermore, spatial metabolomics analysis of the fibrotic areas in rat lung tissues from both the control group and the medium-dose FCB group was performed using aerosol-assisted desorption electrospray ionization mass spectrometry imaging. Based on the results of the metabolomics analysis, signal pathways with strong relevance were identified through bioinformatics screening. The mechanism of FCB on epithelial-mesenchymal transition was then validated by measuring standard pharmacological indices. The content of transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) in serum was measured using ELISA method. The content of hydroxyproline in lung tissues was determined using a hydroxyproline assay kit. Additionally, the expression levels of proteins such as Smad 2/3, p-Smad 2/3, E-cadherin, α -smooth muscle actin (α -SMA), protein kinase B (Akt) and p-Akt in lung tissues were quantified using Western blotting analysis. **Results** In the spatial metabolomic analysis, a total of 71 differential metabolites were identified along with their spatial information, which were enriched in eight metabolic pathways including arginine-proline metabolism and mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling pathway. Compared to the model group, after administration of FCB, there was a reduction in inflammatory cell infiltration and fibrotic tissue proliferation in rat lung tissues, as well as a decline in collagen fiber content. The contents of TGF- β 1 in serum and hydroxyproline in lung tissues were decreased ($P < 0.05$). Moreover, there was a decrease in the phosphorylation level of Smad2/3 and expression level of α -SMA in lung tissues ($P < 0.05$), while the expression level of E-cadherin was increased ($P < 0.05$). **Conclusion** FCB can improve bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats to some extent. The possible mechanism might be realized through regulating pathways associated with epithelial-mesenchymal transitions and inhibiting the deposition of extracellular matrix.

Key words: *Fritillariae Cirrhosae Bulbus*; pulmonary fibrosis; spatial metabolomics; epithelial-interstitial transitions; extracellular matrix

肺纤维化是一种慢性、进行性的肺部疾病，临床治疗难度大^[1-2]。流行病学调查显示，近 10 年来肺纤维化的发病率逐渐上升，尤其是在老年人中更为普遍^[3-4]。现代医学研究显示，纤维化可被描述为一种不合理的损伤修复形式，持续性的肺泡上皮细胞损伤、修复异常、成纤维细胞的增殖和细胞外基质的积累会导致肺结构紊乱和肺纤维化的形成。虽然特发性肺纤维化的发病机制尚不完全清楚，但已有大量研究表明，肺泡上皮-间质转化（epithelial-mesenchymal transitions, EMT）在肺纤维化的形成和发展中具有重要作用^[5-7]。目前，临床治疗肺纤维化的药物非常少，主要有吡非尼酮和尼达尼布等，但这些药物的疗效和安全性并不令人满意^[7-8]。

近年来，传统中医药在抗肺纤维化方面取得了一定进展，相关研究报道逐渐增多^[9-11]。川贝母 *Fritillariae Cirrhosae Bulbus* 自古以来是临床化痰止咳和消痈散结良药，现代临床也用于改善肺纤维化。然而，川贝母的药理作用机制研究非常薄弱，现有文献报道主要集中在“止咳化痰”方面^[12-13]，关于川贝母抗肺纤维化的研究几乎一片空白^[14]。随着临床抗肺纤维化需求的增多，开展川贝母在抗肺纤维化方面的药理作用机制研究对于支撑其在临床科学合理用药提供实验证据支撑是非常必要的。空间代谢组学是一

种基于质谱成像技术的代谢组学分析方法，与现有常规代谢组学分析方法相比，该方法具备原位定性和定量分析化合物的能力，并保留化合物的空间维度信息，能够获得样本特定区域目标物的空间分布谱图，从而深入挖掘代谢物在样本中的空间分布情况和代谢过程中的差异变化^[15-17]。课题组前期研究表明川贝母对博来霉素诱导的大鼠肺纤维化确有一定的改善作用，但其作用机制尚不完全清楚，因此课题组进一步采用空间代谢组学研究其抗肺纤维化可能的作用机制，并用药理实验指标进行验证，以期探寻川贝母抗肺纤维化的药理作用机制提供一些参考。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 60 只，体质量（180±10）g。所有大鼠均由四川省中医药科学院动物实验中心提供，合格证号 SCXK（川）2018-19，所有大鼠均经动物检验检疫合格。动物于温度 22~26℃、相对湿度 35%~50% 的环境下饲养。动物实验经四川省中医药科学院伦理委员会批准[批准号 SYLL（2022）-017]。

1.2 药材

川贝母采自四川省广元市，经四川省中医药科学院谭鹏副研究员鉴定为百合科植物太白贝母 *Fritillaria taipaiensis* P. Y. Li 的干燥鳞茎。

1.3 药品与试剂

硫酸博来霉素(批号 TB002314)、改良 Masson 三色染色液(批号 0420A22)购自合肥博美生物科技有限责任公司; 4%甲醛固定液(批号 22192875)购自武汉博士德生物公司; 化学发光试剂盒(批号 H31500-1)购自天地人和生物科技有限公司; 牛血清白蛋白(批号 4240GR250)购自德国 BIOFROXX 公司; TMEDA(批号 CAS110-18-9)购自 KESHI 公司; 大鼠转化生长因子- β 1 (transforming growth factor- β 1, TGF- β 1) ELISA 试剂盒(批号 ZC-37645)购自上海茁彩生物科技有限公司; 总蛋白测定试剂盒(批号 A045-2-2)、羟脯氨酸(hydroxyproline, HYP)测定试剂盒(批号 A030-2-1)均购自南京建成生物工程研究所; Cryo-Gel 冷冻切片包埋剂购自德国 Leica 公司; 0.5%伊红染液水溶液、苏木素染色液购自美国 Sigma 公司; 靛蓝染色液购自上海启中信息有限公司; α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)一抗(批号 700068)、E-钙黏蛋白(E-cadherin)一抗(批号 201283)、 β -肌动蛋白(β -actin)一抗(批号 700068)、HRP 标记的山羊抗鼠二抗(批号 511103)、HRP 标记的山羊抗兔二抗(批号 511203)均购自成都正能生物技术有限公司; Smad 2 蛋白一抗(批号 A16912)购自武汉爱博泰克生物科技有限公司; Smad 3 蛋白一抗(批号 NB10056479ss)购自美国 NOVUS 公司; 磷酸化 Smad 2 (p-Smad 2)一抗(批号 ab188334)、磷酸化 Smad 3 (p-Smad 3)一抗(批号 ab52903)均购自英国 Abcam 公司; 蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt)一抗(批号 60203-2-Ig)、磷酸化 Akt (p-Akt)一抗(批号 66444-1-Ag)、 α -SMA 一抗(批号 201283)均购自美国 Proteintech 公司。

1.4 仪器

空气动力辅助解吸电喷雾离子化质谱成像平台(北京维科托科技有限公司); Q-Exactive Orbitrap 质谱仪、MK3 型酶标仪、Superfrost Plus 型正电荷防脱载玻片(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); JT-12S 型自动脱水机(武汉俊杰电子有限公司); BMJ-A 型组织包埋机、PHY-III 型病理组织漂烘仪(常州市中威电子仪器有限公司); RS36 型全自动染色机(常州派斯杰医疗设备有限公司); Panoramic 250 型数字切片扫描仪(匈牙利 3DHISTECH 公司); KZ-II 型高通量组织匀浆仪、KZ-III-F 型高速低温组织研磨仪(武汉赛维尔生物科技有限公司); D3024R

型台式高速冷冻型微型离心机(美国 SCILOGEX 公司); 61006-9Q 型凝胶成像系统(上海勤翔科学仪器有限公司); SW-CJ-1D 型超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司); K5800C 型超微量核酸蛋白分析仪(北京凯奥科技发展有限公司); SpectraMAX Plus384 型酶标仪(美谷分子仪器有限公司); DZKW-4 型电子恒温水浴锅(北京中兴伟业仪器有限公司); UV752N 型紫外可见分光光度计(上海佑科仪器仪表有限公司); Leica CM 1950 型冷冻切片机(德国 Leica 公司)。

2 方法

2.1 药物制备

取干燥太白贝母, 粉碎成细粉, 过 5 号筛, *ig* 时按大鼠体质量称取川贝母粉, 用 4 mL 无菌水溶解后充分摇匀, 形成川贝母粉混悬液, 快速 *ig*。

2.2 动物模型的制备及给药

60 只 SPF 级雄性 SD 大鼠适应性饲养 7 d, 随机挑选 50 只大鼠经气管软骨环间隙一次性向气管内缓慢注射含硫酸博来霉素(5 mg/kg)的无菌水。造模 14 d 后剔除死亡老鼠, 将剩下存活大鼠分为模型组、川贝母高剂量组(FCB-H)、川贝母中剂量组(FCB-M)和川贝母低剂量组(FCB-L), 每组 8 只。大鼠的给药剂量参考《中国药典》2020 年版推荐正常成人 1~2 g 计算, 川贝母低、中、高剂量组大鼠每日剂量分别按照人-鼠等效量的 0.5、1、2 倍给药。从造模后第 15 天开始 *ig* 川贝母粉, 高、中、低剂量组分别按每日 0.36、0.18、0.09 g/kg 剂量连续 *ig* 28 d。空白组大鼠同上法注入无菌水, 空白组和模型组正常饮食饮水。

2.3 大鼠样本收集与处理

2.3.1 血清样本收集与处理 末次给药 30 min 后, 称量体质量, *ip* 戊巴比妥钠, 麻醉后仰卧固定于动物解剖台, 切开腹腔, 用不含抗凝剂的采血管, 于腹主动脉取血, 室温放置 2 h, 然后置于 4 °C、2 570 r/min (离心半径 12 cm) 冷冻离心 10 min 后分离血清, 用于血清细胞因子含量检测。

2.3.2 肺组织样本收集与处理 切取部分左肺置于 4%多聚甲醛溶液中固定 24 h 以上, 石蜡包埋切片, 用于苏木素-伊红(HE)、Masson 染色分析。另切取部分左肺, 置于包埋盒底部, 将组织周边涂满包埋胶, 锡箔纸包裹置于-80 °C 保存, 用于空间代谢组学分析。另切取部分左肺和右肺迅速放入-70 °C 液氮中冻存, 用于生化检测和 Western blotting 分析。

2.4 空间代谢组学分析

对模型组和 FCB-M 组大鼠肺组织进行空间代谢组学分析。使用切片器对已固定的大鼠肺组织进行纵向切割,并随后进行 HE 染色。在确定肺纤维化区域的基础上,对该区域相邻的肺组织进一步切片,用于后续质谱成像扫描分析。分析时,将切片取出后,迅速置于真空干燥器中干燥 30 min。质谱成像平台控制程序软件设置扫描参数: X 轴扫描速度为 0.2 mm/s, Y 轴步进间距为 0.1 mm,每行延迟时间为 7 s,扫描区域的 X 轴扫描长度为 10 mm, Y 轴扫描长度为 10 mm。数据采集使用 Xcalibur 4.4.16 软件,依据样本尺寸、步进间距、扫描速度等设定数据采集序列。采用正离子 Full MS 扫描模式,喷雾电压 +5 kV,传输管电压 ± 0 V,毛细管温度 350 $^{\circ}\text{C}$,扫描范围 m/z 70~1 000,分辨率 60 000,喷雾气压力 0.6 MPa,喷雾角度 60° ,喷雾距切片距离 0.7 mm,喷雾距传输管距离 3 mm,传输管距锥孔距离 10 mm,抽气体积流量 45 L/min。

2.5 肺组织差异代谢物的筛选

将质谱原始数据 (raw) 通过 imzMLConverter version 1.3.0 软件转换为 imzML 格式,随后导入到 Cardinal 软件包 (<https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/Cardinal.html>) 中进行背景扣除、峰值对齐及峰值筛选处理。使用 SmetDB 数据库和 pySM 注释框架对通过高分辨质谱成像获得的数据进行代谢物的定性注释。定性标准包括物质峰空间分布得分高于 0.9、同位素空间强度得分高于 0.1、同位素空间分布得分高于 0.1。在此基础上,依据 HE 染色图,将大鼠肺组织切片分为纤维化区域和非纤维化区域,并选择模型组和 FCB-H 组肺组织纤维化区域进行对比分析。通过对选取区域质谱数据进行峰数据提取、缺失值填充等处理获得相对定量数据。采用有监督的正交偏最小二乘法判别分析 (orthogonal partial least squares-discriminant analysis, OPLS-DA) 获得的 VIP 值 ($\text{VIP} > 1$)、 T 检验的 P 值 ($P < 0.05$) 以及差异倍数 (fold change, FC) 来筛选组间差异代谢产物。采用京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG, <https://www.kegg.jp/>) 对筛选出的差异代谢物进行代谢通路富集分析。

2.6 检测血清及肺组织中相关细胞因子含量

准确称取肺组织质量,加入 9 倍体积的生理盐水,冰水浴条件下机械匀浆,2 500 r/min 离心 10 min,取上清液用生理盐水按 1:9 稀释成 1%组织

匀浆,用试剂盒测定 HYP 含量,使用 ELISA 试剂盒测定大鼠血清中 TGF- β 1 含量。

2.7 Western blotting 检测肺组织中相关蛋白表达

使用 Minute 动物组织总蛋白提取试剂盒处理肺组织,按照试剂盒说明书进行制样。收集含有总蛋白的样品液并使用 BCA 法测定蛋白浓度。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。随后,将膜在室温下用 5%脱脂牛奶封闭 90 min。分别加入 Smad 2、Smad 3、p-Smad 2、p-Smad 3、Akt、p-Akt、E-cadherin 和 α -SMA 一抗,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 4 h;加入二抗,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h;加入增强化学发光试剂进行过氧化物酶标记,采用 Chemi Analysis 软件测定蛋白条带灰度值,计算目的蛋白相对表达量。

2.8 统计学分析

实验数据均由 IBM SPSS Statistics 2.0 进行统计分析,两组间比较采用 Student's t 检验,多组间统计学差异采用单因素方差分析。

3 结果

3.1 川贝母对大鼠肺组织炎症及纤维化的影响

如图 1 所示,病理切片 HE 染色结果显示,空白组大鼠的肺部结构和肺泡构造完好清晰,无明显的炎症细胞浸润和纤维组织增生,几乎未见病理性变化。模型组大鼠的肺泡构造紊乱,间质部位出现大量炎症细胞浸润和纤维组织增生,部分胶原形成了致密的红色胶原沉积,表现出较为明显的纤维化病变。与模型组比较,川贝母各剂量组大鼠肺组织中炎症细胞浸润情况有所减少,胶原纤维相对较少。Masson 染色结果显示,空白组大鼠肺组织结构正常,肺泡完整清晰,未见明显的炎症细胞浸润,少量蓝色胶原纤维沉积(大鼠肺部靠近支气管部位有少量纤维化为正常现象)。与空白组比较,模型组大鼠的肺泡构造紊乱,肺组织受到严重破损,存在大量炎症细胞浸润,蓝色胶原纤维沉积较多,纤维化程度严重。与模型组比较,川贝母各剂量给药组大鼠的肺部蓝色胶原纤维沉积和炎症细胞浸润明显减少,纤维化程度均有所减轻。

3.2 空间代谢组学分析结果

3.2.1 肺组织空间代谢组学轮廓分析结果 运用空气动力辅助解吸电喷雾离子化质谱成像技术对大鼠肺组织样本进行空间代谢组学分析。在正离子模式下对肺组织扫描分析后,对扫描数据进行空间收缩质心聚类分析,然后进行 K-means 聚类,共识别出 12 个不同的代谢物簇,见图 2-A。值得注意的是,其中一些特定簇的分布与纤维化区域表现出了明显

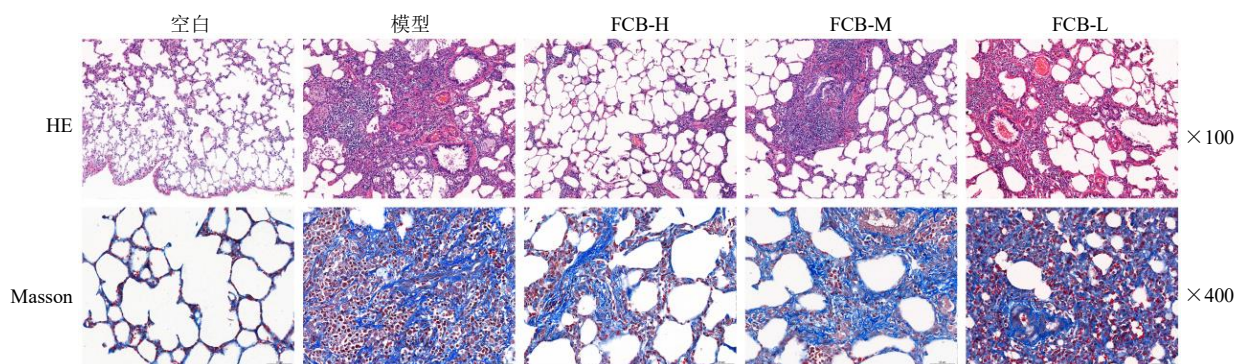
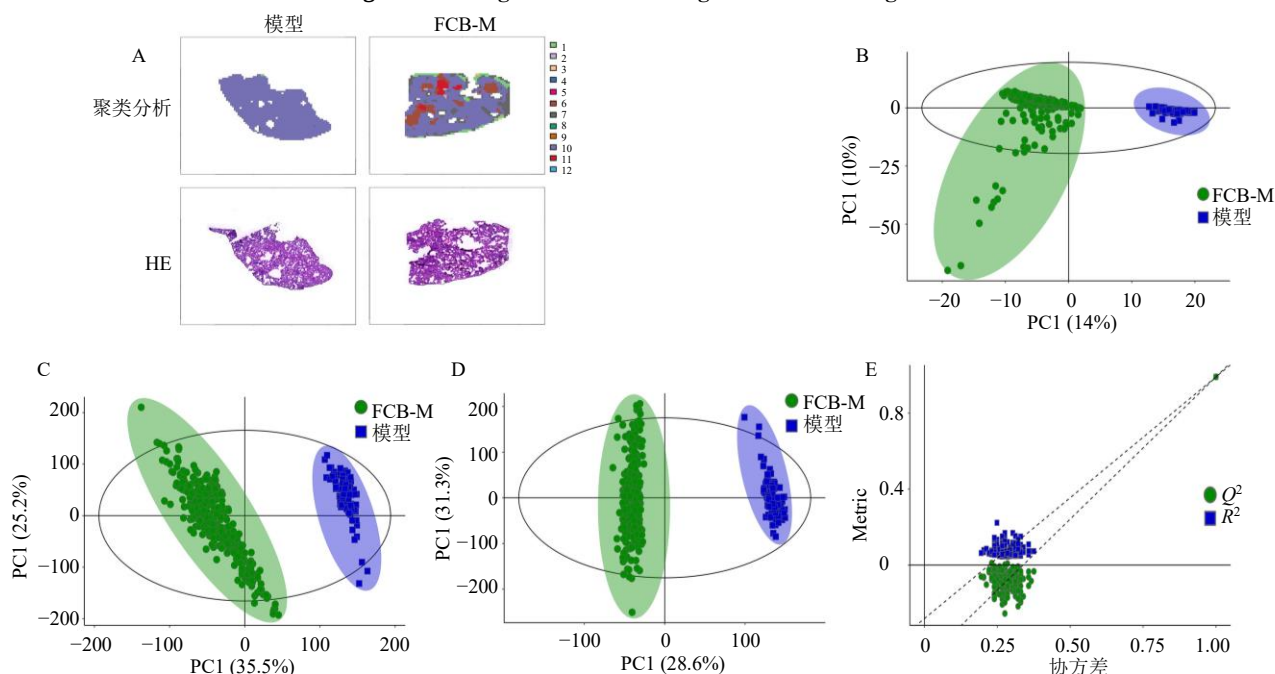


图 1 大鼠肺组织病理切片染色结果

Fig. 1 Pathological section staining results of rat lung tissue



A-聚类分析图 (代谢物共分为 12 簇); B-PCA 图; C-PLS-DA 图; D-OPLS-DA 图; E-Permutation 图。

A-cluster analysis diagram (metabolites are divided into 12 clusters); B-PCA diagram; C-PLS-DA diagram; D-OPLS-DA diagram; E-Permutation diagram.

图 2 不同肺组织样本的空间代谢组学分析结果

Fig. 2 Spatial metabolomics analysis results of different lung tissue samples

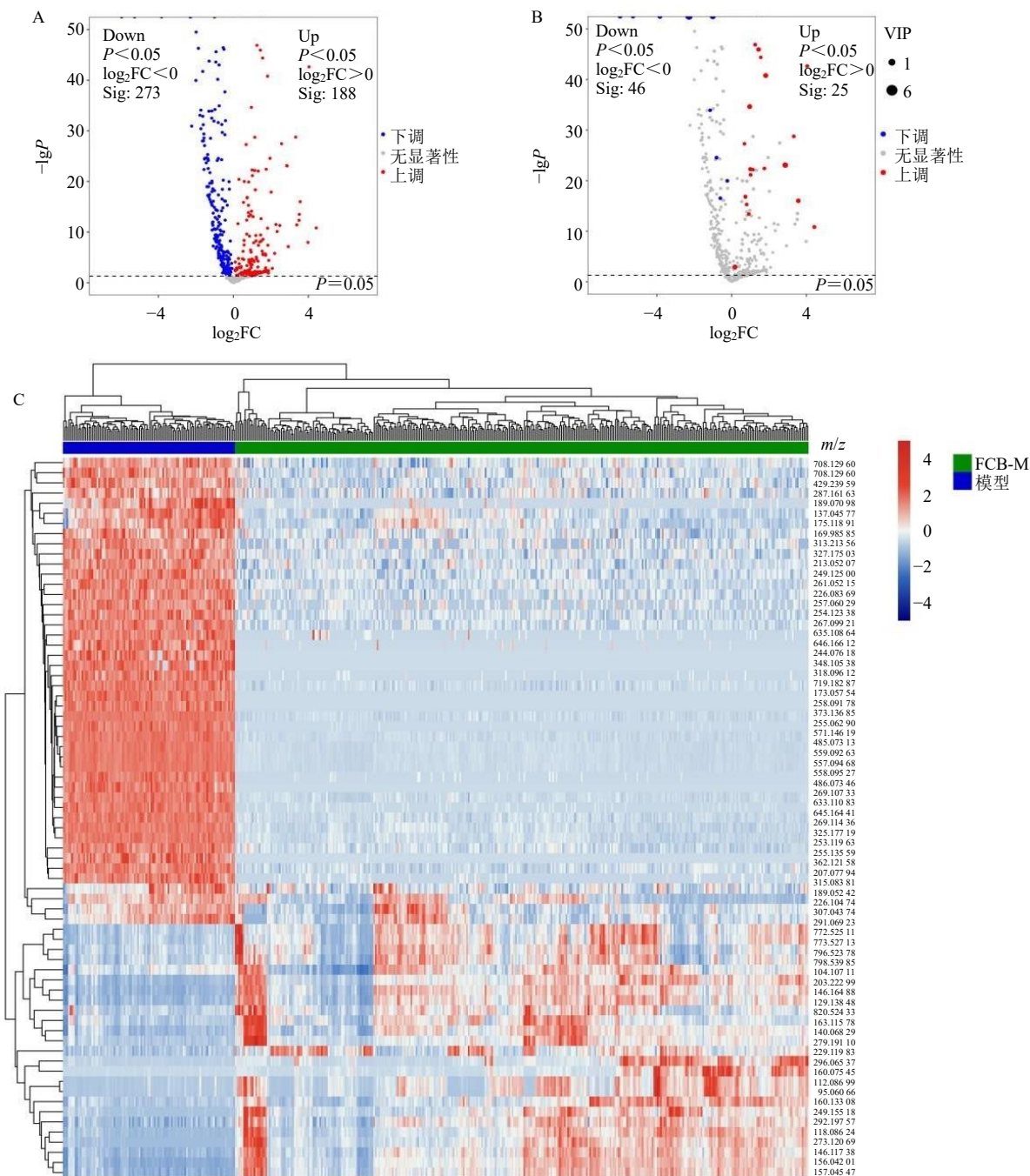
的相关性。通过 HE 染色图分析,确定模型组和 FCB-M 组肺组织上纤维化病灶区域,用于代谢组学对比分析。分别采用有监督的主成分分析 (principal component analysis, PCA)、偏最小二乘判别分析 (partial least squares-discriminant analysis, PLS-DA) 及 OPLS-DA 进行多元数据分析。PCA 结果显示,模型组和 FCB-M 组的样本在无监督模式下表现出良好的聚类特性,且两者之间存在显著的区别,见图 2-B。同样,PLS-DA 的结果展示了模型组与 FCB-M 组之间的明显分离,且模型的解释率 R^2_Y (cum) 和预测率 Q^2 (cum) 均接近 1,表明模型具有良好的预测能力,见图 2-C。OPLS-DA 结果显示,模型

组和 FCB-M 样本在得分图上具有显著差异,见图 2-D。根据 OPLS-DA 模型得到变量权重值 (variable importance of projection, VIP) 用于后续潜在的生物标记物的寻找。为防止模型出现过拟合现象,采取了 7 轮交叉验证以及 200 次响应排序检验的方法来评估模型的性能。 R^2 和 Q^2 的值从左至右均低于最右侧的原始值,且 Q^2 与 Y 轴在负半轴上交叉,表明实验的模型没有出现拟合现象,预测能力表现良好,见图 2-E。

3.2.2 相关差异代谢物筛选结果 基于 OPLS-DA 的 V-plots 得分图,选取 $VIP > 1$ 且 $P < 0.05$ 的指标,筛选出模型组与给药组间比较分析出的显著差异的

代谢产物,共筛选并鉴定出 71 种差异代谢物(图 3-A、B)。图中,红点表示实验组中显著上调的代谢产物,蓝点表示显著下调的代谢产物,灰点则代表不显著的代谢产物,筛选后的差异代谢物热图见图 3-C。与模型组比较,FCB-M 组肺组织纤维化区域中,精胺、亚精胺等 25 个代谢物显著上调,*L*-精氨酸、2-甲氧基雌二醇等 46 个差异代谢物显著下调。

3.2.3 差异代谢通路分析结果 利用模型组和 FCB-M 组比较筛选得到的 71 个差异代谢物的 KEGG ID 进行通路富集分析。应用超几何检验,在显著性差异表达代谢物中显著富集的通路条目,共富集到 8 条可能的代谢通路,代谢通路气泡图见图 4,结合课题组前期的实验结果及文献报道,从中筛选出 4 条可能与肺纤维化相关的代谢通路,分别为



A-火山图; B-VIP 及 P 值筛选的火山图; C-差异代谢物热图。

A-volcano diagram; B-volcano diagram screened by VIP and P value; C-heat map of differential metabolites.

图 3 差异代谢物筛选分析

Fig. 3 Differential metabolites screening analysis

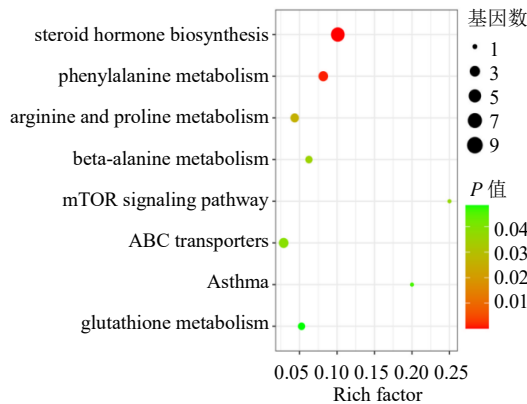


图 4 差异代谢通路富集气泡图

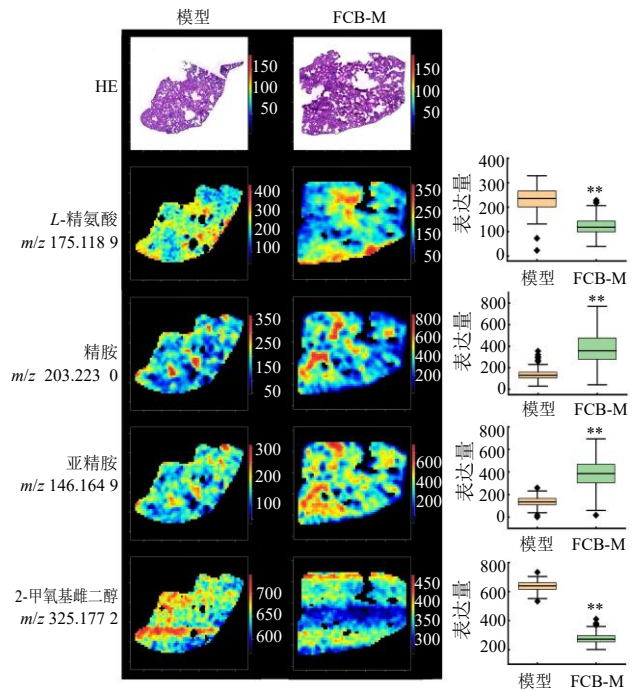
Fig. 4 Enriched bubble diagram of differential metabolic pathways

精氨酸和脯氨酸代谢途径、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 信号通路、谷胱甘肽代谢途径、类固醇激素生物合成途径。这些途径中共涉及 13 个关键的差异代谢物, 其中 *L*-精氨酸 (m/z 175.118 9)、精胺 (m/z 203.223 0)、亚精胺 (m/z 146.164 9) 和 2-甲氧基雌二醇 (m/z 325.177 2) 4 个内源性差异代谢物在大鼠肺组织上的质谱成像图见图 5。

3.3 川贝母对大鼠血清中 TGF- β 1 及肺组织中 HYP 水平的影响

如图 6 所示, 与空白组比较, 模型组大鼠血清中 TGF- β 1 和肺组织中 HYP 含量均明显升高 ($P < 0.01$); 连续 28 d 不同剂量川贝母粉后, 与模型组

比较, FCB-H 组大鼠血清中 TGF- β 1 显著降低 ($P < 0.05$), FCB-H、FCB-M 组肺组织中 HYP 含量显著降低 ($P < 0.05$)。结果表明, 川贝母粉能够调控博来霉素诱导的肺纤维化大鼠体内 TGF- β 1 和 HYP 的表达。

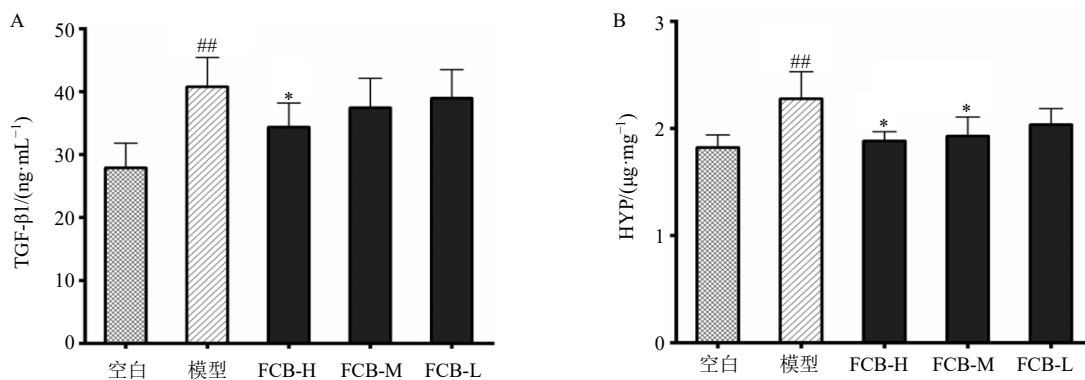


与模型组比较: ** $P < 0.01$ 。

** $P < 0.01$ vs model group.

图 5 典型的关键差异代谢物质谱成像图

Fig. 5 Typical key differential metabolites mass spectrometry imaging images



A-各组大鼠血清中 TGF- β 1 含量; B-各组大鼠肺组织中 HYP 含量; 与空白组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$; 与模型组比较: * $P < 0.05$, 图 7 同。

A-TGF- β 1 content in serum of rats in each group; B-HYP content in lung tissue of rats in each group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs blank group; * $P < 0.05$ vs model group.

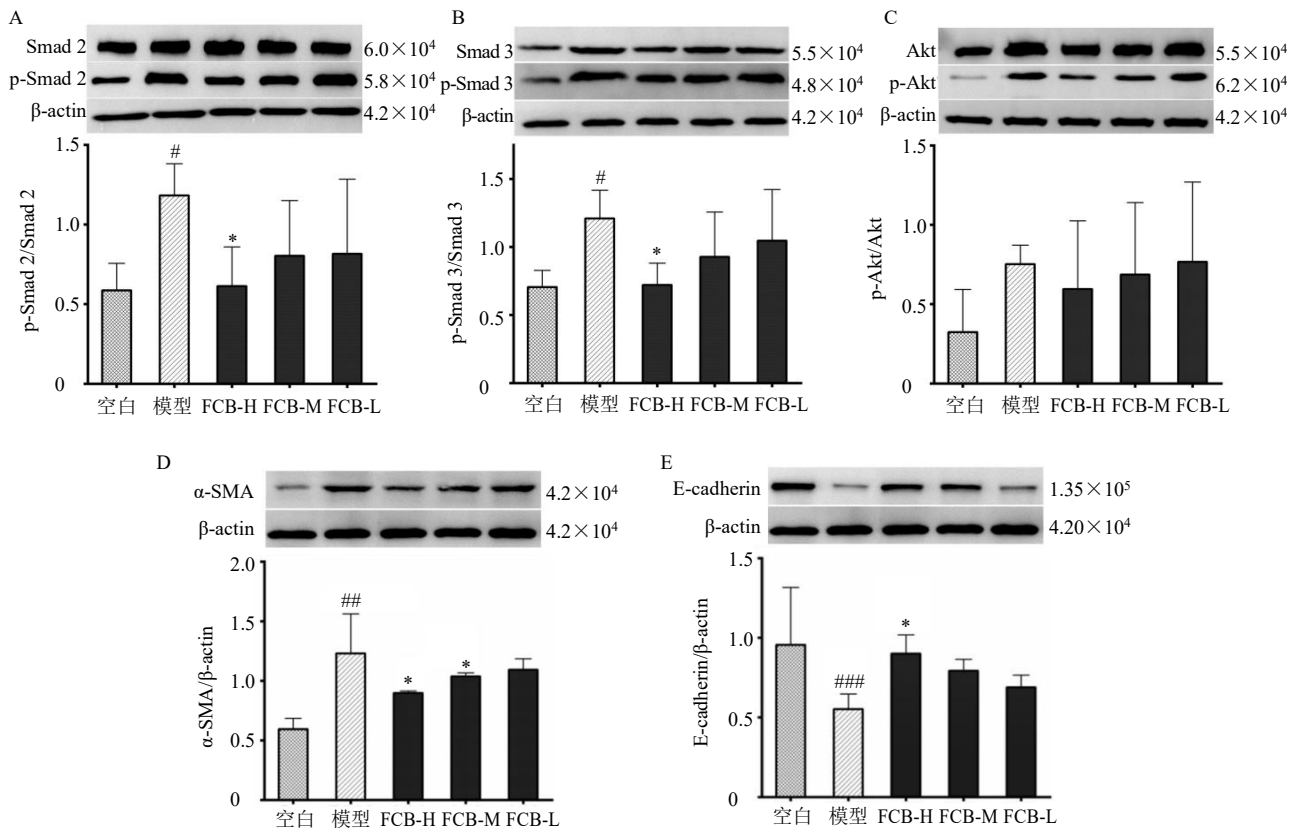
图 6 川贝母对各组大鼠血清及肺组织中相关细胞因子含量的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 6 Effects of *Fritillariae Cirrhosae Bulbus* on contents of related cytokines in serum and lung tissue of rats in each group ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

3.4 川贝母对大鼠肺组织中肺纤维化相关蛋白表达的影响

如图 7 所示, 与空白组比较, 模型组大鼠肺组织中 E-cadherin 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.001$), Smad 2、Smad 3 的磷酸化水平和 α -SMA 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01), p-Akt/Akt 蛋白表达量升高; 与模型组比较, FCB-H 组大鼠肺组织中

Smad 2 和 Smad 3 磷酸化水平显著降低 ($P < 0.05$), E-cadherin 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$); FCB-H 组和 FCB-M 组 α -SMA 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$), 各给药组 p-Akt/Akt 蛋白表达量有降低趋势。结果表明, 川贝母粉能够调控博来霉素诱导的肺纤维化大鼠体内 TGF- β 1/Smad 2/3 信号通路和 EMT 相关蛋白表达。



A-Smad 2 蛋白磷酸化表达水平; B-Smad 3 蛋白磷酸化表达水平; C-Akt 蛋白磷酸化表达水平; D- α -SMA 蛋白表达水平; E-E-cadherin 蛋白表达水平。

A-Smad2 protein phosphorylation expression level; B-Smad3 protein phosphorylation expression level; C-Akt protein phosphorylation expression level; D- α -SMA protein expression level; E-E-cadherin protein expression level.

图 7 川贝母对各组大鼠肺组织中相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 7 Effect of *Fritillariae Cirrhosae Bulbus* on related protein expressions in lung tissue of rats in each group ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

4 讨论

为了探寻川贝母抗肺纤维化可能的药理作用机制, 本研究先利用空间代谢组学结合多变量统计分析, 从不同给药组对比筛选出与川贝母抗肺纤维化可能的相关代谢通路, 再利用常规药理实验对其中一些相关性强的代谢通路进行验证。差异代谢通路富集分析结果显示川贝母可能是通过调控 mTOR、精氨酸、脯氨酸和谷胱甘肽等代谢途径发挥抗肺纤维化作用。越来越多的研究发现肺纤维化过程中会出现 mTOR 信号通路过度活化, 抑制该信号通路可

以抑制 EMT 和减少细胞外基质的表达, 从而抑制纤维化形成^[18-20]。EMT 是一种完全分化的上皮细胞在外界因素作用下逐渐转变为间充质细胞, 并失去上皮细胞原有功能的过程, 是肺纤维化发生和发展的重要机制^[21]。在 EMT 过程中, 上皮细胞标志物如 E-cadherin、紧密黏连蛋白-1 等表达降低, 间质细胞标志物如 α -SMA、成纤维细胞特异蛋白等表达升高。研究表明, L-精氨酸是 mTOR 信号通路中一个重要的调节因子, L-精氨酸的摄入可以增加细胞内的蛋白质合成速率, 增加氨基酸传感器的表达,

从而激活 mTOR 信号通路调控 EMT 阶段^[22-23]。本研究中质谱成像结果显示,肺纤维化大鼠给药川贝母粉 28 d 后,其肺组织纤维化区域的 L-精氨酸含量明显低于模型组大鼠肺纤维化区域中 L-精氨酸含量,表明在肺纤维化模型基础上,给药川贝母会影响大鼠体内 L-精氨酸含量水平,从而调控 EMT 阶段。此外, Akt 是 mTOR 信号通路中的关键靶点, mTOR 复合物可以通过直接磷酸化激活 Akt, 调控细胞的肌动蛋白骨架,从而调控 EMT^[24-25]。TGF- β 1 被认为是肺纤维化发生的核心因素^[26]。当 TGF- β 1/Smad 信号通路被激活时,会导致减少上皮细胞标志物(如 E-cadherin)的表达,并增加间质细胞标志物(如 α -SMA)的表达,从而促进 EMT 过程^[27-28]。细胞因子检测结果显示,与模型组比较,FCB-H 组能够明显抑制由博来霉素引起的 TGF- β 1 升高。Western blotting 分析结果显示,与模型组比较,FCB-H 组大鼠肺组织中 α -SMA、p-Akt 表达量降低, E-cadherin 表达量升高, Smad 2 和 Smad 3 磷酸化水平降低。表明川贝母可能通过 TGF- β 1/Smad 和 Akt/mTOR 等信号通路来抑制 EMT,从而发挥抗肺纤维化作用。

此外,空间代谢组学分析结果显示,川贝母抗肺纤维化还可能与抑制细胞外基质沉积有关。细胞外基质是组织中的非细胞部分,主要由胶原蛋白、纤维连接蛋白等多种蛋白质和多糖组成。研究表明,细胞外基质的沉积在肺纤维化的发展过程中起着重要作用,是肺纤维化的主要病理特征之一^[29]。精氨酸和脯氨酸代谢是人体内重要的代谢途径,在蛋白质合成和多种信号传导途径各种生物化学过程中发挥关键作用。脯氨酸参与胶原蛋白的合成,其代谢异常可能会影响到胶原蛋白的产生,进而导致细胞外基质沉积^[30]。亚精胺是精氨酸和脯氨酸代谢途径的主要产物之一,在衰老、细胞自噬等领域都有重要的生理功能。研究表明,亚精胺会导致纤维化小鼠细胞外基质相关蛋白表达水平明显下降,从而起到抗纤维化的作用^[31]。质谱成像结果显示,肺纤维化大鼠给药川贝母粉 28 d 后,其肺组织纤维化区域的亚精胺含量明显高于模型组大鼠肺纤维化区域中亚精胺含量。HYP 是胶原蛋白的主要组成成分,而胶原蛋白是细胞外基质的核心组成部分,因此 HYP 常被当作评估肺纤维化程度及其疾病进展的生物标志物^[32]。细胞因子检测结果显示,与模型组比较,FCB-H、FCB-M 组均能够明显抑制由博来霉素引起

的 HYP 升高的情况。此外,病理切片分析结果显示,与模型组比较,给药川贝母后大鼠肺组织蓝色胶原纤维沉积明显减少,表明川贝母可能是通过调控与细胞外基质沉积相关的代谢途径来发挥抗肺纤维化作用。

综上,川贝母粉能够在一定程度上改善博来霉素诱导的大鼠肺纤维化,其作用机制可能是通过调控 EMT 阶段、抑制细胞外基质沉积等途径来实现的。本研究基于空间代谢组学技术初步研究了川贝母抗肺纤维化的药理作用机制,为川贝母抗肺纤维化研究提供了一些参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Raghu G, Remy-Jardin M, Richeldi L, *et al.* Idiopathic pulmonary fibrosis (an update) and progressive pulmonary fibrosis in adults: An official ATS/ERS/JRS/ALAT clinical practice guideline [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2022, 205(9): e18-e47.
- [2] Maher T M, Strek M E. Antifibrotic therapy for idiopathic pulmonary fibrosis: Time to treat [J]. *Respir Res*, 2019, 20(1): 205.
- [3] 张娟娟, 张英为, 邱玉英. 特发性肺纤维化急性加重的研究进展 [J]. *医学研究生学报*, 2019, 32(4): 418-422.
- [4] Yang S N, Perng D W, Ko H K, *et al.* Epidemiologic analysis of Taiwanese patients with idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Healthcare (Basel)*, 2020, 8(4): 580.
- [5] 苗双, 丁国建, 宋殿芳, 等. 细胞自噬调节上皮细胞间充质转化过程对特发性肺纤维化的作用机制 [J]. *医学研究生学报*, 2019, 32(10): 1025-1030.
- [6] Richeldi L, Collard H R, Jones M G. Idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Lancet*, 2017, 389(10082): 1941-1952.
- [7] 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.
- [8] King T E Jr, Bradford W Z, 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.
- [9] 王家才, 段星星, 张波, 等. 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 [J]. *中草药*, 2023, 54(7): 2144-2154.
- [10] 唐艳, 杨蓉佳, 陈红纲, 等. 姜黄素对百草枯中毒致肺纤维化大鼠肺功能及 TGF- β 1、NF- κ B 表达的影响 [J]. *中华急诊医学杂志*, 2017, 26(4): 392-395.
- [11] 郑蕾, 黄红, 吴涵, 等. 姜黄素抗肺纤维化作用的分子机制研究进展 [J]. *中草药*, 2022, 53(21): 6909-6918.

- [12] Wang D D, Zhu J Y, Wang S, *et al.* Antitussive, expectorant and anti-inflammatory alkaloids from *Bulbus Fritillariae Cirrhosae* [J]. *Fitoterapia*, 2011, 82(8): 1290-1294.
- [13] Wang D D, Wang S, Chen X, *et al.* Antitussive, expectorant and anti-inflammatory activities of four alkaloids isolated from *bulbus* of *Fritillaria wabuensis* [J]. *J Ethnopharmacol*, 2012, 139(1): 189-193.
- [14] 赵木叶. 川贝母对博来霉素致肺纤维化大鼠的影响及作用机制的研究 [D]. 济南: 山东中医药大学, 2016.
- [15] 孙晓珊, 路鑫, 许国旺. 基于高分辨质谱的代谢组学分析技术研究进展 [J]. *质谱学报*, 2021, 42(5): 787-803.
- [16] Gao S Q, Zhao J H, Guan Y, *et al.* Mass spectrometry imaging technology in metabolomics: A systematic review [J]. *Biomed Chromatogr*, 2023, 37(7): e5494.
- [17] Gilmore I S, Heiles S, Pieterse C L. Metabolic imaging at the single-cell scale: Recent advances in mass spectrometry imaging [J]. *Annual Rev Anal Chem*, 2019, 12: 201-224.
- [18] Platé M, Guillotin D, Chambers R C. The promise of mTOR as a therapeutic target pathway in idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Eur Respir Rev*, 2020, 29(157): 200269.
- [19] Han Q, Lin L J, Zhao B L, *et al.* Inhibition of mTOR ameliorates bleomycin-induced pulmonary fibrosis by regulating epithelial-mesenchymal transition [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 500(4): 839-845.
- [20] Saito M, Mitani A, Ishimori T, *et al.* Active mTOR in lung epithelium promotes epithelial-mesenchymal transition and enhances lung fibrosis [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2020, 62(6): 699-708.
- [21] Phan T H G, Paliogiannis P, Nasrallah G K, *et al.* Emerging cellular and molecular determinants of idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2021, 78(5): 2031-2057.
- [22] Ma X, Han M, Li D F, *et al.* L-Arginine promotes protein synthesis and cell growth in brown adipocyte precursor cells via the mTOR signal pathway [J]. *Amino Acids*, 2017, 49(5): 957-964.
- [23] Jung J W, Macalino S J Y, Cui M H, *et al.* Transmembrane 4L six family member 5 senses arginine for mTORC1 signaling [J]. *Cell Metab*, 2019, 29(6): 1306-1319.
- [24] Karimi Roshan M, Soltani A, Soleimani A, *et al.* Role of AKT and mTOR signaling pathways in the induction of epithelial-mesenchymal transition (EMT) process [J]. *Biochimie*, 2019, 165: 229-234.
- [25] Lee J H, Chinnathambi A, Alharbi S A, *et al.* Farnesol abrogates epithelial to mesenchymal transition process through regulating Akt/mTOR pathway [J]. *Pharmacol Res*, 2019, 150: 104504.
- [26] Kim K K, Sheppard D, Chapman H A, *et al.* TGF- β 1 signaling and tissue fibrosis [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2018, 10(4): a022293.
- [27] 张秀, 胡静, 覃惠, 等. 宣肺化痰方对肺纤维化大鼠肺组织 TGF- β 1/Smad 表达的影响 [J]. *中草药*, 2018, 49(14): 3326-3333.
- [28] 李雅群, 耿子凯, 王萍, 等. 桑白皮提取物桦木酸对 TGF- β 1 诱导的人肺泡上皮细胞 HPAEpiC 上皮间质转化的抑制作用 [J]. *中药新药与临床药理*, 2020, 31(1): 1-7.
- [29] 叶威, 孙梦阳, 王新华. 特发性肺纤维化与细胞微环境之间关系的研究进展 [J]. *中国医学科学院学报*, 2020, 42(3): 410-416.
- [30] Karna E, Szoka L, Huynh T Y L, *et al.* Proline-dependent regulation of collagen metabolism [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2020, 77(10): 1911-1918.
- [31] Shi B Y, Wang W, Ye M T, *et al.* Spermidine suppresses the activation of hepatic stellate cells to cure liver fibrosis through autophagy activator MAP1S [J]. *Liver Int*, 2023, 43(6): 1307-1319.
- [32] Song S R, Fu Z L, Guan R J, *et al.* Intracellular hydroxyproline imprinting following resolution of bleomycin-induced pulmonary fibrosis [J]. *Eur Respir J*, 2023, 43(6): 1307-1319.

[责任编辑 李亚楠]