

亚砷酸钠协同 *N*-乙酰半胱氨酸对特发性肺纤维化的治疗作用

袁一超, 李 策[#], 陈 楠, 熊 域, 张纪平, 郑杭生*, 朱志红*

浙江中医药大学药学院, 浙江 杭州 311400

摘要:目的 探究砒霜(三氧化二砷)的生物转化产物亚砷酸钠(sodium arsenite, SA)与 *N*-乙酰半胱氨酸(*N*-acetylcysteine, NAC)联合用药的抗肺纤维化作用。方法 小鼠 L929 成纤维细胞给予 SA 或 NAC 干预 24 h 后, 测定细胞活力; 通过考察不同比例的 SA 与 NAC 对 L929 细胞活力的影响, 确定联合用药比例, 采用划痕实验和 Transwell 实验检测细胞迁移能力; 采用免疫荧光法检测 SA 与 NAC 联合给药对转化生长因子- β 1(transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)诱导的 L929 细胞 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)、I 型胶原蛋白 α 1(collagen type I α 1, COL1A1)表达和活性氧(reactive oxygen species, ROS)水平的影响。建立博来霉素诱导的小鼠特发性肺纤维化模型, 给予 SA 或 NAC 干预 28 d, 观察小鼠生存情况和体质量变化; 采用苏木素-伊红(hematoxylin-eosin, HE)和 Masson 染色观察肺组织病理变化; 检测支气管肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)中总蛋白含量、TGF- β 1 和肺组织羟脯氨酸(hydroxyproline, Hyp)水平; 采用免疫荧光法检测肺组织 α -SMA、COL1A1、CD86 和 CD206 表达。结果 SA 与 NAC 联合用药的协同效应与二者比例有关, 当 SA:NAC=2:1 时, 可显著抑制 L929 细胞活力与迁移($P<0.001$), 且优于单药组($P<0.01$ 、 0.001); SA 与 NAC(2:1)联合给药显著下调 TGF- β 1 诱导的 L929 细胞中 α -SMA、COL1A1 表达($P<0.001$), 并降低 ROS 水平($P<0.01$)。体内实验结果显示, 与模型组比较, SA 与 NAC(2:1)联合给药可以延长小鼠的生存周期, 增加体质量, 减轻肺组织损伤和胶原沉积, 降低 BALF 中总蛋白含量、TGF- β 1 及肺组织 Hyp 水平($P<0.01$ 、 0.001), 降低肺组织 α -SMA、COL1A1 表达($P<0.001$), 抑制肺组织巨噬细胞 M2 型极化($P<0.001$), 且对主要脏器无明显毒性作用。结论 亚砷酸钠与 NAC 联合用药具有协同抗肺纤维化效果, 为砒剂联合巯基供体治疗特发性肺纤维化提供了实验依据。

关键词: 特发性肺纤维化; 砒霜; 亚砷酸钠; *N*-乙酰半胱氨酸; TGF- β 1; 巨噬细胞 M2 型极化; 氧化应激

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2026)18-7150-12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.18.007

Synergistic therapeutic efficacy of sodium arsenite and *N*-acetylcysteine against idiopathic pulmonary fibrosis

YUAN Yichao, LI Ce, CHEN Nan, XIONG Yu, ZHANG Jiping, ZHENG Hangsheng, ZHU Zhihong

School of Pharmacy, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 311400, China

Abstract: Objective To investigate the antifibrotic effect of combined treatment with sodium arsenite (SA, biotransformation product of arsenic trioxide) and *N*-acetylcysteine (NAC) on pulmonary fibrosis. **Methods** L929 fibroblasts were treated with SA or NAC for 24 h before measuring cell viability. The combination drug ratio was determined by examining the effects of different ratios of SA and NAC on viability of L929 cells, and the cell migration ability was detected using scratch assay and Transwell assay. Immunofluorescence assay was used to detect the effects of combined administration of SA and NAC on the expressions of α -smooth muscle actin (α -SMA), collagen type I α 1 (COL1A1), and reactive oxygen species (ROS) level in transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1)-induced L929 cells. A mouse model of idiopathic pulmonary fibrosis was established induced by bleomycin, after intervention with SA or NAC for 28 d, the survival and body weight changes of mice were observed. Hematoxylin-eosin (HE) and Masson staining were used to observe pathological changes in lung tissue. The total protein content, TGF- β 1 level in bronchoalveolar lavage fluid (BALF), and hydroxyproline (Hyp) level

收稿日期: 2026-01-22

基金项目: 浙江省自然科学基金资助项目 (LY23H280010); 浙江中医药大学校级科研基金资助项目 (2023JKZKTS23)

作者简介: 袁一超 (2002—), 男, 硕士研究生, 研究方向为中药药剂学。E-mail: 1944557087@qq.com

[#]共同第一作者: 李 策, 男, 硕士研究生, 研究方向为中药药剂学。E-mail: 17367219539@163.com

*通信作者: 朱志红 (1991—), 女, 副教授, 研究方向为中药制药学和药剂学。E-mail: zzhjanny@163.com

郑杭生, 男, 教授, 研究方向为中药制药学、药剂学。E-mail: hs-zheng@163.com

in lung tissue were detected. Immunofluorescence assay was used to detect the expressions of α -SMA, COL1A1, CD86 and CD206 in lung tissue. **Results** The synergistic effect of SA and NAC combination therapy was related to their ratio. When SA : NAC = 2 : 1, the combination could significantly inhibit viability and migration of L929 cells ($P < 0.001$), and was superior to the monotherapy group ($P < 0.01, 0.001$). The combined administration of SA and NAC (2 : 1) significantly down-regulated the expressions of α -SMA and COL1A1 in L929 cells induced by TGF- β 1 ($P < 0.001$), and reduced ROS level ($P < 0.01$). The *in vivo* experimental results showed that compared with model group, the combined administration of SA and NAC (2 : 1) could prolong the survival cycle of mice, increase body weight, reduce lung tissue damage and collagen deposition, decrease the total protein content, TGF- β 1 level in BALF and Hyp level in liver tissue ($P < 0.01, 0.001$), reduce the expression of α -SMA and COL1A1 in lung tissue ($P < 0.001$), inhibit M2 polarization of lung tissue macrophages ($P < 0.001$), and had no significant toxic effects on major organs. **Conclusion** The combination of SA and NAC has a synergistic anti-pulmonary fibrosis effect, providing experimental evidence for the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis with arsenic agents combined with thiol donors.

Key words: idiopathic pulmonary fibrosis; arsenic trioxide; sodium arsenite; *N*-acetylcysteine; TGF- β 1; M2 macrophage polarization; oxidative stress

特发性肺纤维化 (idiopathic pulmonary fibrosis, IPF) 是一类以慢性、进行性纤维化为特征的间质性肺疾病, 病因尚未明确, 5 年生存率不足 40%, 预后极差, 死亡率甚至高于多种恶性肿瘤, 造成显著的社会经济负担^[1-2]。中医学虽无“特发性肺纤维化”之名, 但其成纤维细胞灶形成与纤维蛋白过度沉积, 契合“由无形而有形、由痕而癥”的病理演变^[3]; 其形成机制与病理特征近似“癥瘕”, 因而有“络脉微型癥瘕”之称^[4]。由此出发, 缓消癥瘕可视为 IPF 干预的重要方向。

砒霜的主要有效成分为三氧化二砷, 自古便用于治疗“癥瘕”等病症, 历代本草均记载其具有“益肝气、破积聚”的功效, 能软坚散结。现代药理学研究进一步提示, 三氧化二砷在 IPF 中呈现多细胞、多靶点的抑制作用^[5-7], 可干预成纤维化表型与基质沉积^[8-10]。然而, 其疗效伴随着以氧化应激为主要特征的潜在毒性负担, 限制了应用范围与可及性^[11]。从病理生理看, IPF 长期存在肺部谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 枯竭与氧化还原失衡, 可促进转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β) 激活并驱动纤维化进程^[12-13]。*N*-乙酰半胱氨酸 (*N*-acetylcysteine, NAC) 作为 GSH 前体, 不仅能够增强宿主抗氧化屏障, 还能降低三氧化二砷所致的系统性氧化应激负担^[14]。同时, NAC 具有黏液调节与抗炎作用, 可降低黏液网络二硫键、改善纤毛清除并抑制核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 驱动的中性粒/单核炎症级联, 进而缓解“炎症-黏液滞留-通气失衡”的恶性循环, 为三氧化二砷的抗纤维化干预创造更有利的肺泡微环境^[15-17]。基于上述病理与药理依据, 三氧化二砷与 NAC 联合应用具

有一定的内在互补性。三氧化二砷在水溶液及体内生理环境中经水解/转化后主要以三价砷的亚砷酸/亚砷酸根等形态存在并发挥药理与毒理作用。亚砷酸钠 (sodium arsenite, SA) 为亚砷酸的钠盐^[18], 同样提供三价砷离子, 二者在药理和毒理学上具有可比性。本研究为便于精确剂量控制与实验重复性, 选用 SA 作为三氧化二砷现代制剂形式进行体内外研究。国内外相关基础与转化研究中亦存在采用 SA 作为三价砷供体代替三氧化二砷进行系统实验的先例, 从而为本研究的用药选择提供了方法学依据与可追溯性^[19-21]。本研究旨在系统评估砷剂与 NAC 联合用于肺纤维化的协同疗效与安全性

1 材料

1.1 细胞与动物

小鼠 L929 成纤维细胞购自中国科学院上海细胞库, 保存于浙江中医药大学中医药科学院。

SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠, 6~8 周龄, 体质量 (25 $\pm$ 2) g, 由浙江中医药大学实验动物研究中心提供, 实验动物合格证号 20220004057231。动物饲养条件满足 SPF 级实验动物生产或使用要求的各种因素总和。动物实验按照浙江中医药大学制定和监督的动物护理和使用指南进行 (伦理批准号 IACUC-20240805-09)。

1.2 药品与试剂

SA (批号 7784-46-5) 购自成都艾科达化学试剂有限公司; NAC (批号 A105420)、硫酸博莱霉素 (批号 B107423) 购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 吡非尼酮 (批号 M823668) 购自上海麦克林生化科技有限公司; TGF- β 1 ELISA 试剂盒 (批号 RX202402M) 购自睿信生物科技有限公司; TGF- β 1

(批号 CK33) 购自苏州近岸蛋白质科技股份有限公司; α -平滑肌肌动蛋白 (α -smooth muscle actin, α -SMA) 抗体 (批号 AF1032)、I 型胶原蛋白 $\alpha 1$ (collagen type I $\alpha 1$, COL1A1) 抗体 (批号 AF7001)、Alexa Fluor 647 标记的羊抗兔 IgG 二抗 (批号 S0013)、Dylight 594 标记的羊抗兔 IgG 二抗 (批号 S0006) 购自江苏亲科生物研究中心有限公司; 活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 检测试剂盒 (批号 20251112)、羟脯氨酸 (hydroxyproline, Hyp) 试剂盒 (批号 A030-3-1) 购自南京建成生物工程研究所; CD86 抗体 (批号 GB150054)、CD206 抗体 (批号 GB113497) 购自武汉塞维生物技术有限公司; 苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色试剂盒 (批号 G1120)、Masson 染色试剂盒 (批号 G1340) 购自北京索莱宝科技有限公司。

1.3 仪器

ECLIPSE Ts2 型倒置显微镜 [尼康精机 (上海) 有限公司]; Synergy H1 多功能酶标仪 (美国伯腾仪器有限公司); LSM880 型激光共聚焦显微镜 (卡尔蔡司集团); KF-PRO-020-HI 型数字病理切片扫描仪 (宁波江丰生物信息技术有限公司)。

2 方法

2.1 SA 与 NAC 联合用药比例确定

L929 细胞以 1×10^4 个/孔接种于 96 孔板, 培养过夜。分别加入不同浓度的 SA (15、22、28、34、40、46 $\mu\text{mol/L}$) 或 NAC (1.56、3.13、6.25、12.50、25.00、50.00 mmol/L), 作用 24 h, 采用 MTT 法检测细胞活力, 绘制剂量-效应曲线, 并计算各自的半数抑制浓度 (half inhibitory concentration, IC_{50})。随后按不同配比 (SA : NAC = 1 : 1、1 : 2、1 : 3、2 : 1、3 : 1, SA 浓度为 15、22、28、34、40、46 $\mu\text{mol/L}$) 进行联合给药, 作用 24 h, 采用 MTT 法检测细胞活力。以单药 (SA 或 NAC) 及联合给药对 L929 细胞活性的抑制率为评价指标, 使用 CompuSyn 软件计算联合用药指数 (combination index, CI), 从而筛选并确定 SA 与 NAC 联合用药的最优配比。

2.2 SA 与 NAC 联合用药对 L929 细胞迁移的影响

2.2.1 划痕实验 L929 细胞以 1.2×10^5 个/孔接种于 6 孔板中, 培养过夜, 用 PBS 润洗细胞 3 次, 设置对照组、SA 组、NAC 组和 SA+NAC 组。SA 给药浓度为 IC_{50} (42.13 $\mu\text{mol/L}$) 时, 部分孔位细胞死亡、脱落较明显, 干扰系统评价, 因此选用略低于 IC_{50} 的 SA 浓度 38.4 $\mu\text{mol/L}$ 进行后续实验。对照组

加入 2 mL 无血清 MEM 培养基, 各给药组分别加入 2 mL 含 SA (38.4 $\mu\text{mol/L}$) 或 NAC (19.2 $\mu\text{mol/L}$) 的无血清 MEM 培养基, 培养 4 h。弃去培养液, 用 PBS 润洗细胞 3 次后, 各组加入含 1% 马血清的 MEM 培养基, 用 200 μL 无菌枪头在 6 孔板底部划一条水平划痕, PBS 润洗 3 次后继续培养 24 h。于划痕后 0、24 h, 于倒置显微镜下观察划痕, 利用 Image J 软件计算划痕愈合率。

划痕愈合率 = $1 - 24 \text{ h 划痕面积} / \text{初始划痕面积}$

2.2.2 Transwell 迁移实验 L929 细胞以 1.2×10^5 个/孔接种于 6 孔板中, 培养过夜, 用 PBS 润洗细胞 3 次。设置对照组、模型组、SA 组、NAC 组和 SA+NAC 组, 对照组和模型组加入 2 mL 无血清 MEM 培养基, 各给药组分别加入 2 mL 含 SA (38.4 $\mu\text{mol/L}$) 或 NAC (19.2 $\mu\text{mol/L}$) 的无血清 MEM 培养基, 培养 4 h, 制备各组细胞悬液。在 Transwell 小室下室加入 750 μL 含 1% 马血清的 MEM 培养基, 上室加入 200 μL 各组细胞悬液, 模型组和各给药组加入 TGF- $\beta 1$ (10 ng/mL) 刺激, 置于培养箱中继续培养 24 h。用棉签去除膜上侧的非迁移细胞, 将迁移细胞于 4% 多聚甲醛中固定, 染色后, 于倒置显微镜观察每张膜上 2 个不重叠区域的细胞迁移情况, 利用 Image J 软件计算细胞迁移数量。

2.3 SA 与 NAC 联合用药对 TGF- $\beta 1$ 诱导的 L929 细胞 α -SMA 和 COL1A1 表达的影响

取对数生长期的 L929 细胞, 以 1×10^4 个/孔接种于激光共聚焦小皿中, 培养过夜。设置对照组、模型组、SA 组、NAC 组和 SA+NAC 组, 对照组和模型组加入 1 mL 无血清 MEM 培养基, 各给药组分别加入 1 mL 含 SA (38.4 $\mu\text{mol/L}$) 或 NAC (19.2 $\mu\text{mol/L}$) 的无血清 MEM 培养基, 培养 4 h。弃去培养液, 加入完全培养基培养 20 h, 再更换为无血清 MEM 培养基饥饿处理 24 h。对照组加入含 1% 马血清的 MEM 培养基, 其余各组加入含 TGF- $\beta 1$ (10 ng/mL) 和 1% 马血清的 MEM 培养基, 继续培养 24 h。细胞经处理后, 加入 4% 多聚甲醛, 于室温固定 30 min, 随后用预冷 PBS 润洗 3 次; 以含 0.1% Triton X-100 的 PBS 通透 10 min, 提高抗体渗透性, 通透后用 PBS 润洗 3 次, 每次 5 min; 以 1% 牛血清白蛋白于室温封闭 30 min 以减少非特异性结合; 按说明书比例用一抗稀释液配制一抗工作液, 每个共聚焦小皿加入 200 μL 一抗, 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 摇床孵育过夜。次日, 回收一抗于 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存, PBS 润洗 3 次, 每次

5 min; 按一抗来源选择相应二抗并按说明书用二抗稀释液稀释, 加入二抗工作液后, 于室温摇床避光孵育 1 h; 弃去二抗后, 用 PBS 避光润洗 3 次, 每次 5 min; 加入 200 μ L DAPI 溶液 (0.1 μ g/mL), 于室温避光孵育 5 min, 弃去 DAPI 溶液后用 PBS 避光润洗 3 次, 每次 5 min。于激光共聚焦显微镜下观察并拍照, 利用 Image J 软件评估其向肌成纤维细胞转化情况。

2.4 SA 与 NAC 联合用药对 TGF- β 1 诱导的 L929 细胞内 ROS 水平的影响

取对数生长期的 L929 细胞, 以 1×10^4 个/孔接种于 6 孔板中, 培养过夜。按“2.3”项下方法处理细胞, 按照试剂盒说明书检测细胞内 ROS 水平。

2.5 动物实验

2.5.1 造模、分组与给药 小鼠 ip 舒泰 50 (50 mg/kg) 麻醉, 仰卧位固定, 用 75%乙醇消毒颈部, 在小鼠颈部皮肤开 1 个小切口以暴露唾液腺, 使用镊子小心分离腺体, 直至胸骨舌骨肌清晰可见。使用镊子切开气管周围的肌肉, 直至气管完全暴露。使用胰岛素注射器沿气管软骨环之间平行刺入, 缓慢注入 30 μ L 硫酸博莱霉素溶液 (3.5 mg/kg)。注射完毕后, 轻柔退出注射器。将小鼠直立并轻轻摇晃, 以促进硫酸博莱霉素在肺部的均匀分布。造模后的小鼠随机分成模型组、吡非尼酮 (250 mg/kg) 组、SA (0.42 mg/kg) [8,10,22-24] 组、NAC (0.26 mg/kg) 组和 SA+NAC 组, 每组 10 只。另取 10 只 C57BL/6 小鼠作为对照组。造模次日, 吡非尼酮组每天 ig 吡非尼酮, SA 组、NAC 组及 SA+NAC 组每 3 天尾 iv 给药, 对照组和模型组每 3 天尾 iv 等体积的生理盐水, 连续给药至造模后 28 d。每日在给药前记录小鼠的体质量及生存情况。按动物伦理要求当小鼠体质量低于 18 g 时安乐死, 取材。实验过程中死亡的个体均记录死亡时间并计入生存曲线分析, 无法获得完整肺组织及主要脏器标本的个体, 不纳入组织学及生化指标的终点分析, 相关分析均基于实验结束时仍存活或依据动物伦理实施安乐死的小鼠。

2.5.2 支气管肺泡灌洗液 (bronchoalveolar lavage fluid, BALF) 中总蛋白及 TGF- β 1 水平的测定 小鼠安乐死, 收集 BALF, 1 200 r/min 离心 5 min, 取上清液, 采用 BCA 法测定总蛋白浓度, 按照 ELISA 试剂盒说明书检测 TGF- β 1 水平。

2.5.3 肺组织 Hyp 含量测定 取小鼠肺组织, 按照

试剂盒说明书测定 Hyp 含量。

2.5.4 肺组织病理学观察 取小鼠肺组织, 于 4%多聚甲醛中固定 24 h 后, 用 PBS 冲洗去除残留固定液, 梯度乙醇脱水, 并以二甲苯透明化处理。石蜡包埋后切片 (4~6 μ m), 于 40 $^{\circ}$ C 温水展片并在 60 $^{\circ}$ C 烘烤。切片经二甲苯脱蜡至水, 经梯度乙醇复水后, 分别按照 HE 和 Masson 染色试剂盒说明书进行染色, 用中性树胶封片后, 于显微镜下观察并拍照。

2.5.5 肺组织 α -SMA、COL1A1、CD86 和 CD206 表达的检测 取肺组织石蜡切片, 脱蜡至水后, 于柠檬酸缓冲液 (pH 6.0) 中进行热诱导表位修复, 自然冷却; PBS (pH 7.4) 振荡洗涤 3 次, 每次 5 min, 用组化笔圈定组织区域, 滴加 3% H_2O_2 于室温避光孵育 25 min 以抑制内源性过氧化物酶, PBS 洗涤后, 滴加 3%牛血清白蛋白于室温封闭 30 min。滴加一抗, 置于湿盒中, 于 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜; PBS 洗涤后加入相应二抗, 室温孵育 50 min; PBS 洗涤后滴加 Alexa Fluor 488 酪胺试剂, 室温避光孵育 10 min; TBST 洗涤, 滴加 DAPI 复染细胞核, 室温避光孵育 10 min; PBS 洗涤, 加入自发荧光淬灭剂孵育 5 min, 流水冲洗 10 min; 以抗荧光淬灭封片剂封片, 于荧光显微镜下观察并拍照。

2.5.6 安全性评估 小鼠安乐死后, 小心剥离心脏、肝脏、脾脏、肾脏、大肠、小肠。将脏器周围的结缔组织清除干净后, 浸入 4%多聚甲醛中进行固定, 按照“2.5.4”项下方法对各个脏器进行 HE 染色, 于显微镜下观察并拍照。

2.6 统计学分析

采用 GraphPad Prism 9.0 软件对数据进行统计学分析, 所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 各组之间差异使用单因素方差分析 (One-way ANOVA)。

3 结果

3.1 SA 与 NAC 联合用药比例确定

如图 1 所示, SA 与 NAC 呈浓度相关性地抑制 L929 细胞活力, IC_{50} 分别为 42.13 μ mol/L 与 22.06 mmol/L。在固定 SA 浓度下, 比较不同比例的 SA 与 NAC 对 L929 细胞活力的联合作用, 如图 2 所示, 当 SA:NAC=1:1 时, 联合用药抑制效果较 SA 单药增强; 当 SA:NAC=2:1 或 3:1 时, 抑制效果显著增强, 其中 2:1 最强。相反, 随 NAC 比例继续升高, 抑制效应低于 SA 单药。

基于 CI 法对 SA 与 NAC 进行协同分析, 如图 3 所示, 当 SA:NAC=1:1, 在 $0 < Fa < 65\%$ 时

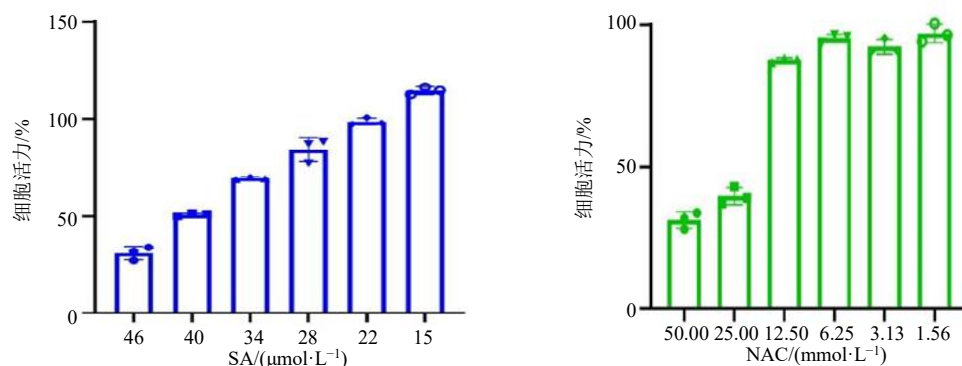
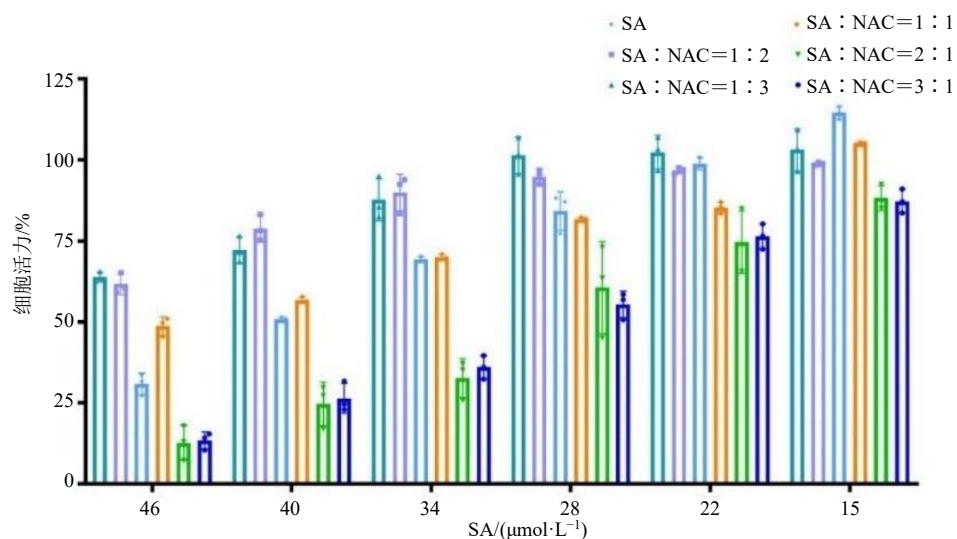
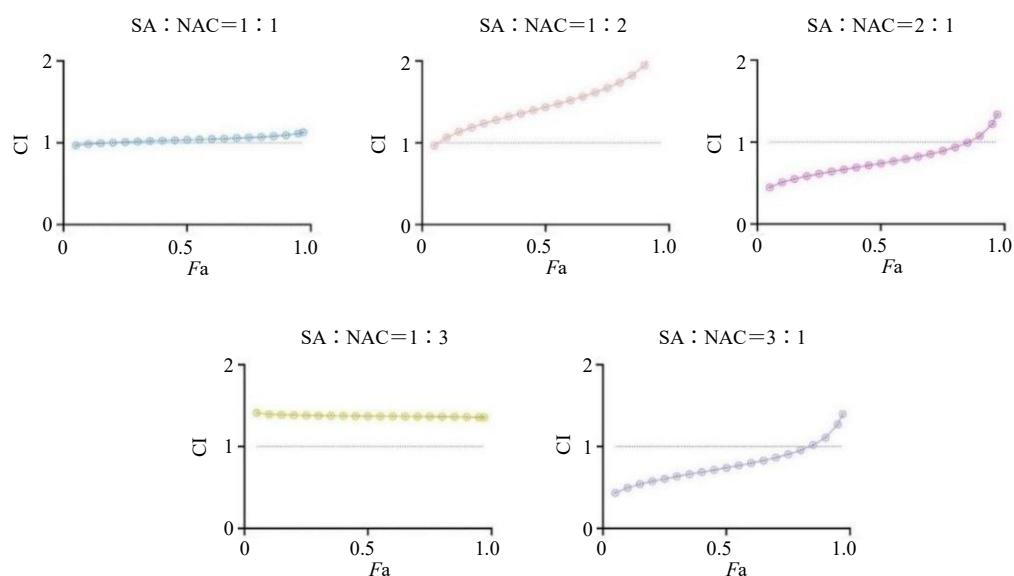
图1 不同浓度的SA或NAC对L929细胞活力的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)Fig. 1 Effect of different concentrations of SA or NAC on viability of L929 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)图2 不同配伍比例的SA与NAC对L929细胞活力的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)Fig. 2 Effect of different combination ratios of SA and NAC on viability of L929 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

图3 不同配伍比例的SA与NAC的CI分析

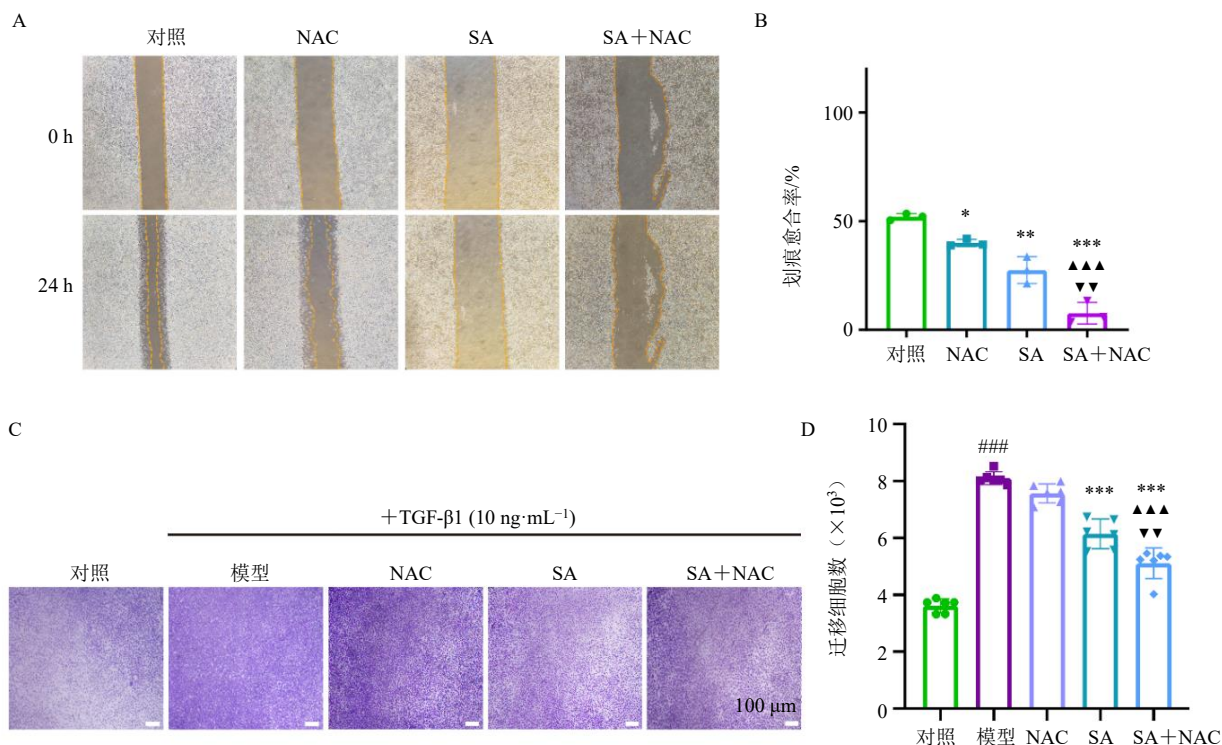
Fig. 3 CI analysis of SA and NAC in different combination ratios

0.8<CI<1, 呈弱协同作用; 当 SA:NAC=1:3, 在 0<Fa<100%时 CI>1, 呈拮抗作用; 当 SA:NAC=2:1, 在 0<Fa<90%时 CI<1, 呈协同作用, 且在 0<Fa<55%时 CI<0.7, 呈强协同作用。因此在本研究条件下, SA:NAC=2:1 的 CI 最低, 为最优配比。

3.2 SA 与 NAC 联合用药对 L929 细胞迁移的影响

采用划痕实验和 Transwell 实验评估联合用药对 L929 细胞迁移的影响, 如图 4-A、B 所示, 与对

照组比较, 各给药组划痕愈合率显著降低 ($P<0.05$ 、0.01、0.001), 且 SA+NAC 组划痕愈合率显著低于各单独给药组 ($P<0.01$ 、0.001)。如图 4-C、D 所示, 在 TGF- β 1 诱导下, Transwell 实验结果与划痕实验一致, 与模型组比较, SA 组和 SA+NAC 组迁移细胞数显著减少 ($P<0.001$), 且 SA+NAC 组迁移细胞数显著低于各单独给药组 ($P<0.01$ 、0.001)。表明 SA 与 NAC 联合用药对不同条件下的 L929 细胞迁移均具有更强的抑制作用。



A、B-划痕实验 ($\times 20$, $n=3$); C、D-Transwell 实验 ($\times 20$, $n=6$), 与对照组比较: $###P<0.01$ $####P<0.001$; 与模型组比较: $*P<0.05$ $**P<0.01$ $***P<0.001$; 与 NAC 组比较: $▲▲P<0.01$ $▲▲▲P<0.001$; 与 SA 组比较: $▼P<0.05$ $▼▼P<0.01$, 图 5、6 同。

A, B-scratch test ($\times 20$, $n=3$); C, D-Transwell experiment ($\times 20$, $n=6$), $###P<0.01$ $####P<0.001$ vs control group; $*P<0.05$ $**P<0.01$ $***P<0.001$ vs model group; $▲▲P<0.01$ $▲▲▲P<0.001$ vs NAC group; $▼P<0.05$ $▼▼P<0.01$ vs SA group, same as Figs. 5, 6.

图 4 SA 与 NAC 联合用药对 TGF- β 1 诱导的 L929 细胞迁移的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Fig. 4 Effect of SA combined with NAC on migration of TGF- β 1-induced L929 cells ($\bar{x} \pm s$)

3.3 SA 与 NAC 联合用药对 TGF- β 1 诱导的 L929 细胞 α -SMA 和 COL1A1 表达的影响

如图 5 所示, 与对照组比较, 模型组 α -SMA 和 COL1A1 阳性表达显著升高 ($P<0.001$), 提示 TGF- β 1 刺激诱导成纤维细胞向肌成纤维细胞分化; 与模型组比较, 各给药组 α -SMA 和 COL1A1 阳性表达均显著降低 ($P<0.05$ 、0.01、0.001), 且 SA+NAC 组 α -SMA 和 COL1A1 阳性表达显著低于各单独给药组 ($P<0.05$ 、0.01、0.001)。表明 SA 与 NAC 联

合用药有效抑制 TGF- β 1 诱导的成纤维细胞向肌成纤维细胞转化。

3.4 SA 与 NAC 联合用药对 TGF- β 1 诱导的 L929 细胞内 ROS 水平的影响

如图 6 所示, 与对照组比较, 模型组细胞内 ROS 水平显著升高 ($P<0.01$), 提示 TGF- β 1 刺激氧化应激水平升高; 与模型组比较, NAC 组和 SA+NAC 组细胞内 ROS 水平显著降低 ($P<0.01$), SA 组 ROS 水平显著升高 ($P<0.01$), 表明 SA 本身具有一定

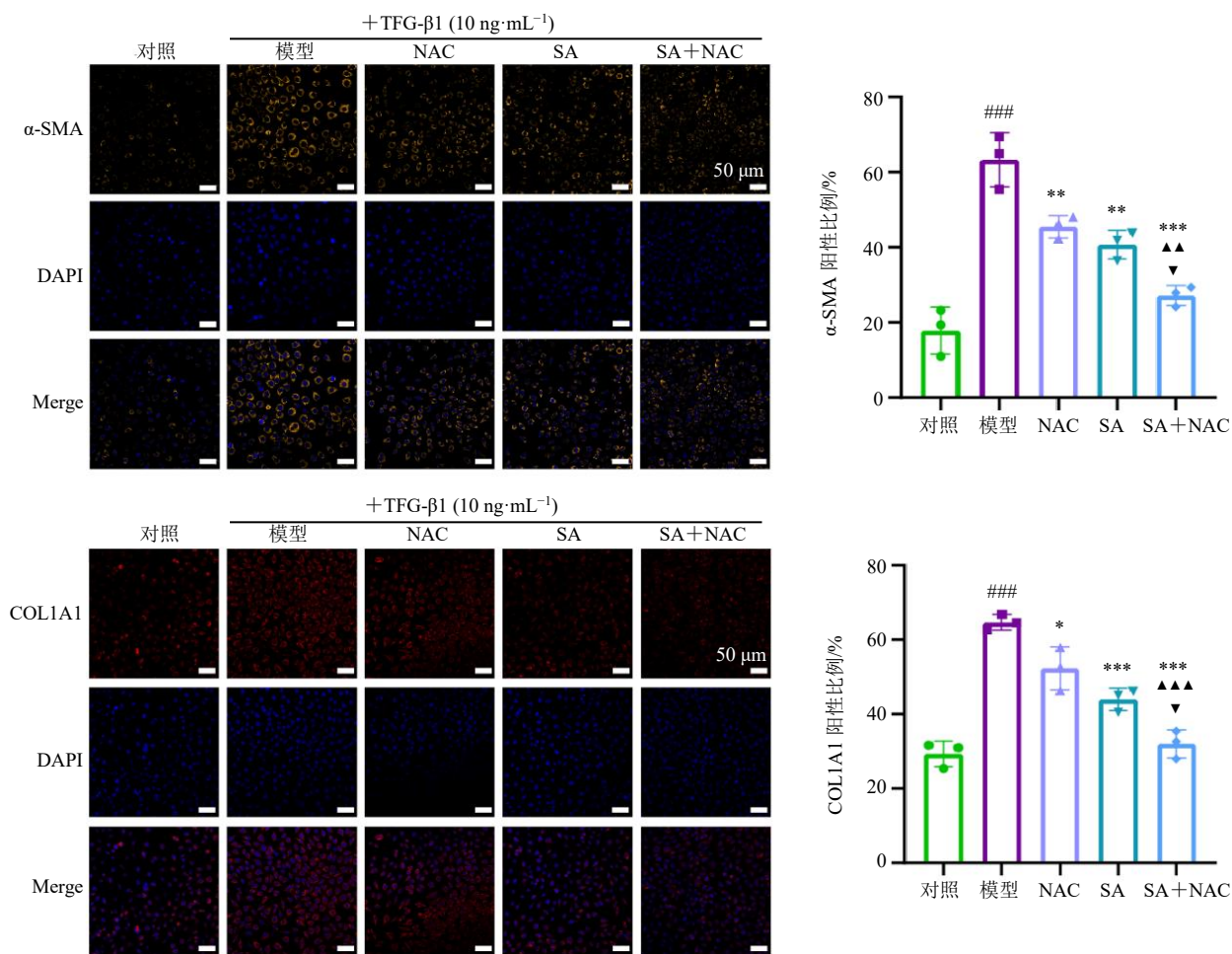


图 5 SA 与 NAC 联合用药对 TGF- β 1 诱导的 L929 细胞 α -SMA 和 COL1A1 表达的影响 ($\times 40$; $\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 5 Effect of SA combined with NAC on expressions of α -SMA and COL1A1 in TGF- β 1-induced L929 cells ($\times 40$; $\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

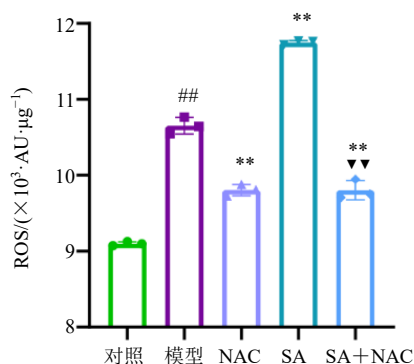


图 6 SA 与 NAC 联合用药对 TGF- β 1 诱导的 L929 细胞内 ROS 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

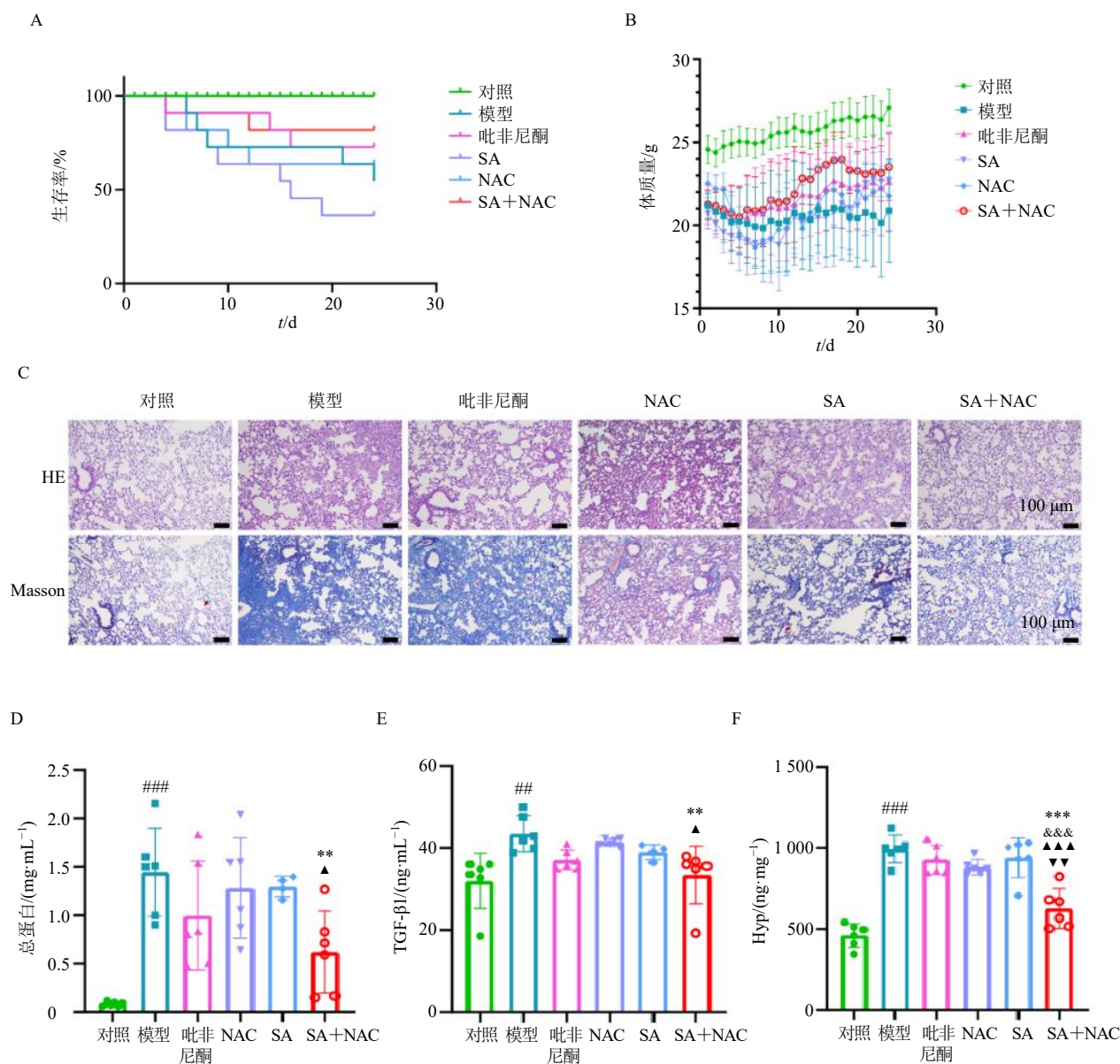
Fig. 6 Effect of SA combined with NAC on ROS level in TGF- β 1-induced L929 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

促氧化作用, SA 与 NAC 联合用药在缓解氧化应激方面主要依赖 NAC, 而 SA 的加入并未进一步加重

ROS 负担。

3.5 SA 与 NAC 联合用药对 IPF 小鼠的治疗作用

如图 7 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠体重下降, 生存率降低, 肺泡结构破坏、间质增厚, 胶原沉积明显增加, BALF 中总蛋白含量、TGF- β 1 及肺组织 Hyp 水平显著升高 ($P < 0.01$ 、 0.001); 与模型组比较, SA 或 NAC 单药均能部分改善上述指标, 表现为生存曲线上移、体重回升, 组织学损伤与胶原沉积减轻, 且 BALF 总蛋白含量、TGF- β 1 及肺组织 Hyp 水平下降。与单药相比, SA+NAC 联合效应更为显著, 表现为生存进一步改善、体重恢复幅度更大, 肺泡结构更完整、炎症与胶原沉积最轻, BALF 总蛋白含量、TGF- β 1 水平及肺组织 Hyp 水平显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)。以上结果表明, SA 与 NAC 在体内对肺损伤与纤维化相关多维指标呈协同抑制, 总体疗效优于单药。



A-各组小鼠的生存曲线图 ($n=10$); B-各组小鼠体重变化 ($n=10$); C-肺组织 HE 染色和 Masson 染色结果 ($\times 20$); D-各组 BALF 中总蛋白浓度 ($n=6$); E-各组 BALF 中 TGF- $\beta 1$ 的水平 ($n=6$); F-各组肺组织中 Hyp 含量 ($n=6$); 与对照组比较: $\#P<0.01$ $\#\#\#P<0.001$; 与模型组比较: $*P<0.05$ $**P<0.01$ $***P<0.001$; 与吡非尼酮组比较: $\&P<0.05$ $\&\&P<0.001$; 与 NAC 组比较: $\blacktriangle P<0.05$ $\blacktriangle\blacktriangle P<0.001$; 与 SA 组比较: $\blacktriangledown P<0.05$ $\blacktriangledown\blacktriangledown P<0.01$ $\blacktriangledown\blacktriangledown\blacktriangledown P<0.001$, 图 8、9 同。

A-survival curves of mice in each group ($n=10$); B-changes in body weight of mice in each group ($n=10$); C- HE staining and Masson staining results of lung tissue ($\times 20$); D-total protein concentration in BALF of each group ($n=6$); E-TGF- $\beta 1$ level in BALF of each group ($n=6$); F-Hyp content in lung tissues of each group ($n=6$); $\#P<0.01$ $\#\#\#P<0.001$ vs control group; $*P<0.05$ $**P<0.01$ $***P<0.001$ vs model group; $\&P<0.05$ $\&\&\&P<0.001$ vs pirfenidone group; $\blacktriangle P<0.05$ $\blacktriangle\blacktriangle P<0.001$ vs NAC group; $\blacktriangledown P<0.05$ $\blacktriangledown\blacktriangledown P<0.01$ $\blacktriangledown\blacktriangledown\blacktriangledown P<0.001$ vs SA group, same as Figs. 8, 9.

图 7 SA 与 NAC 联合用药对 IPF 小鼠的治疗作用 ($\bar{x} \pm s$)

Fig. 7 Therapeutic effect of SA combined with NAC on IPF mice ($\bar{x} \pm s$)

3.6 SA 与 NAC 联合用药对 IPF 小鼠肺组织 α -SMA 和 COL1A1 表达的影响

如图 8 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠肺组织 α -SMA 和 COL1A1 阳性表达显著升高 ($P<$

0.001); 与模型组比较, SA+NAC 组小鼠肺组织 α -SMA 和 COL1A1 阳性表达显著降低 ($P<0.001$), 且优于各单药。表明联合给药在体内能更有效地抑制成纤维细胞活化与胶原沉积。

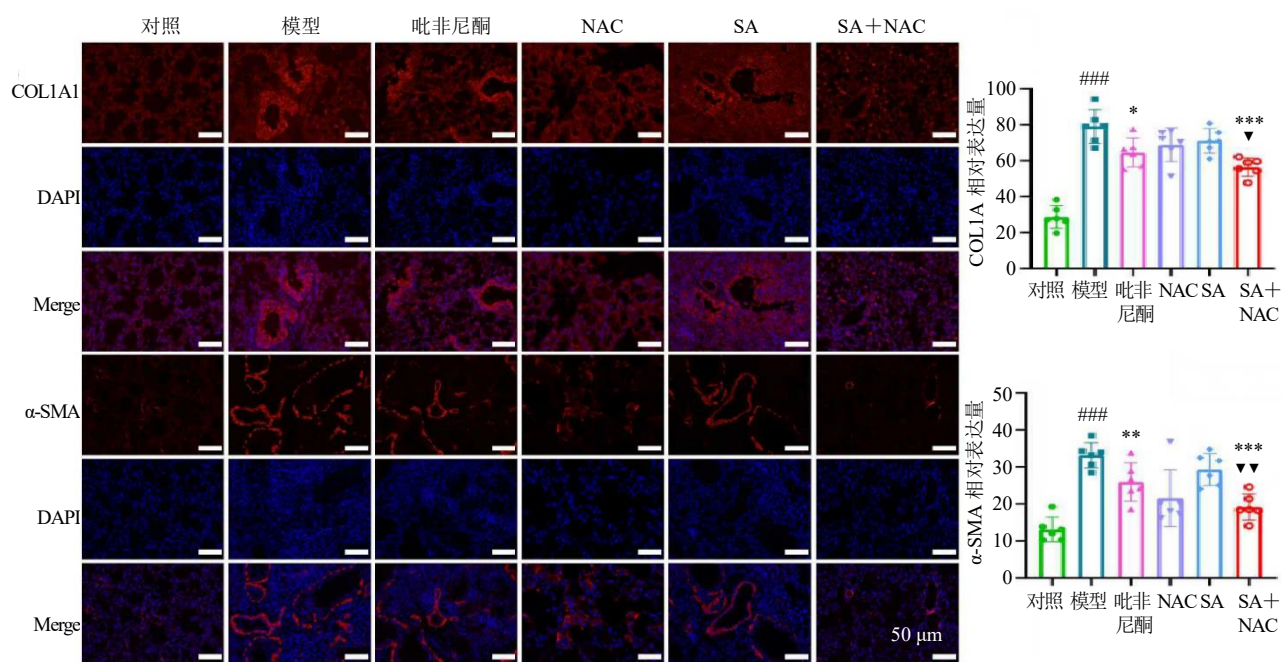


图 8 SA 与 NAC 联合用药对 IPF 小鼠肺组织 α -SMA 和 COL1A1 表达的影响 ($\times 20$; $\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Fig. 8 Effect of SA combined with NAC on expressions of α -SMA and COL1A1 in lung tissues of IPF mice ($\times 20$; $\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

3.7 SA 与 NAC 联合用药对 IPF 小鼠肺组织 CD86 和 CD206 表达的影响

如图 9 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠肺组织 CD206 阳性表达显著升高 ($P < 0.001$), 提示 IPF 小鼠肺组织中巨噬细胞向 M2 极化; 与模型组比较, NAC 组和 SA+NAC 组小鼠肺组织 CD206 阳性表达显著降低 ($P < 0.001$), 且 SA+NAC 组作用优于各单药。各组小鼠肺组织 CD86 阳性表达无显著差异。表明 SA 与 NAC 联用优先抑制纤维化相关的 M2 型巨噬细胞极化, 而不诱发 M1 极化增强, 提

示其可能通过免疫微环境重塑发挥协同抗纤维化作用。

3.8 SA 与 NAC 联合用药对 IPF 小鼠各脏器病理学形态的影响

如图 10 所示, SA 组、NAC 组及 SA+NAC 组小鼠心肌纤维排列、肝小叶结构与肝细胞形态、脾红白髓分区、肾小球与肾小管结构, 以及小/大肠黏膜与腺体结构均保持完整, 未见坏死、明显炎细胞弥漫浸润、出血或黏膜糜烂等急性毒性病理学现象。表明 SA+NAC 组未显示出组织学毒性。

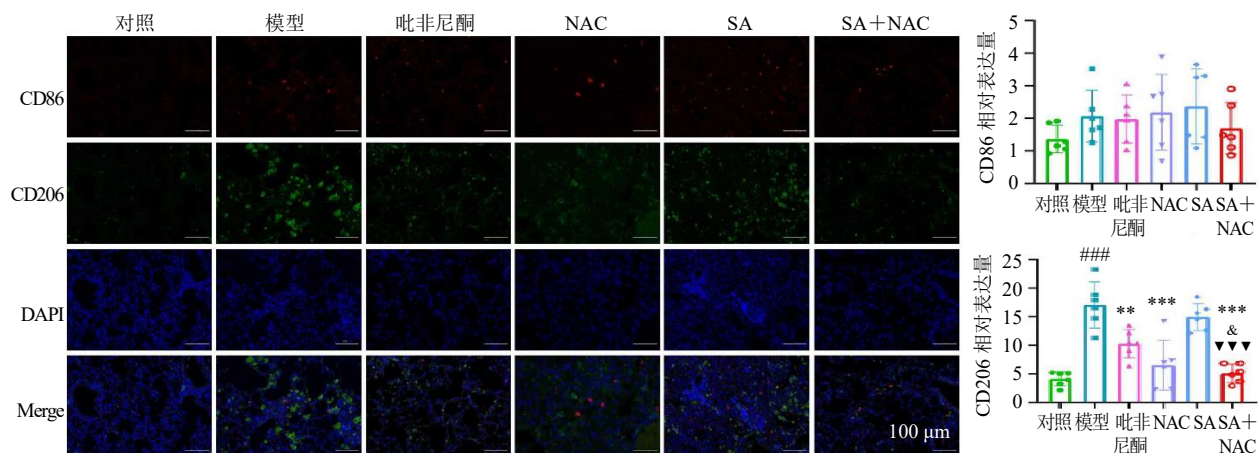


图 9 SA 与 NAC 联合用药对 IPF 小鼠肺组织 CD86 和 CD206 表达的影响 ($\times 20$; $\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Fig. 9 Effect of SA combined with NAC on expressions of CD86 and CD206 in lung tissues of IPF mice ($\times 20$; $\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

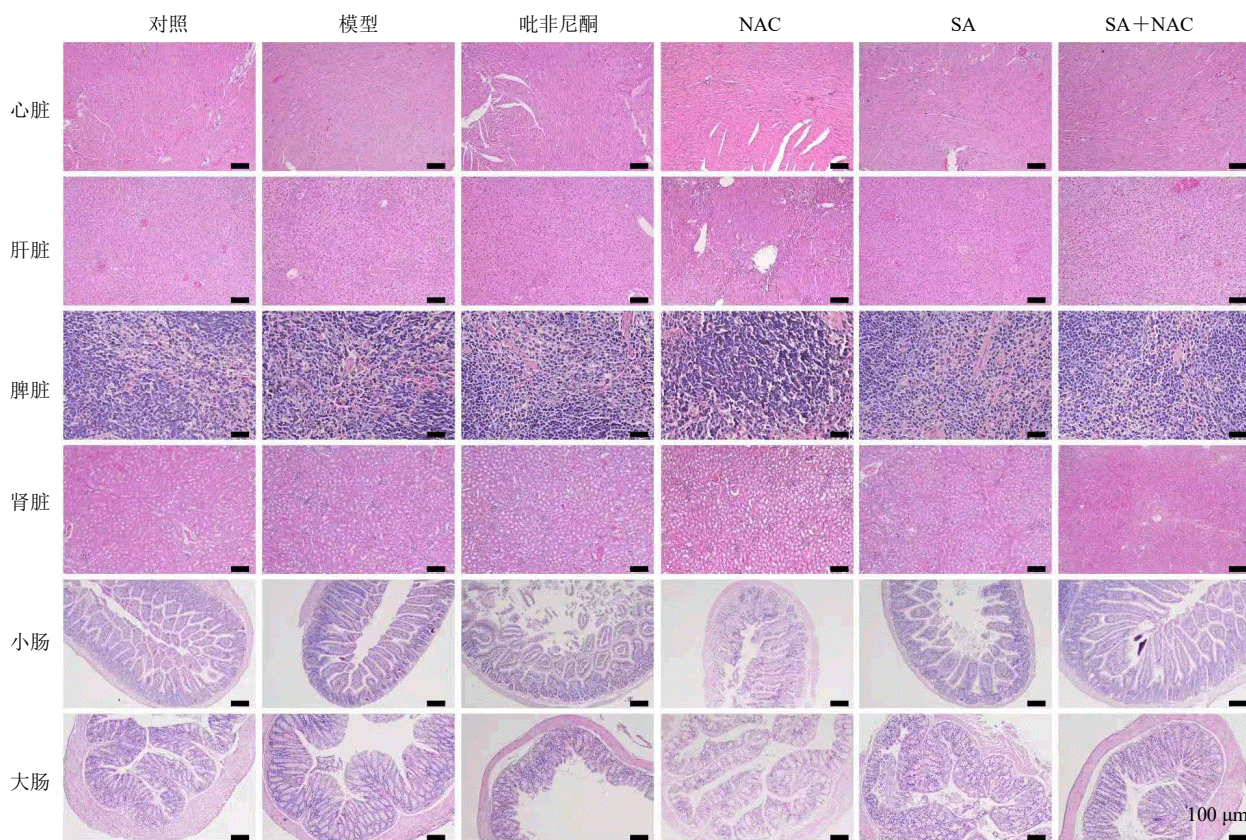


图 10 各组小鼠各脏器 HE 染色结果 (×20)

Fig. 10 HE staining results of various organs of mice in each group (× 20)

4 讨论

本研究在体内外验证了 SA 与 NAC 的协同抗纤维化效应。在 L929 细胞中,当联合用药比例为 SA:NAC=2:1 时具有协同作用,能较好地抑制细胞活性与迁移,抑制 TGF-β1 诱导的肌成纤维分化。在小鼠博来霉素模型中,联合用药可以延长生存期、缓解肺泡结构与胶原沉积,降低 BALF 总蛋白、TGF-β1 与肺组织 Hyp 水平,且对各脏器未见明显影响。结合本研究结果与文献研究,推测联合用药协同效应机制可能为联合用药抑制成纤维细胞活化,缓解微环境中的氧化还原失衡,重塑免疫微环境。

联合用药可有效加强 SA 对成纤维细胞的抑制作用。既往研究提示,三氧化二砷可直接拮抗 TGF-β1/Smad 驱动的成纤维活化,抑制 α-SMA、I 型胶原蛋白的表达,并在博来霉素模型中减少肺纤维化负荷^[8];三氧化二砷抑制原代人肺成纤维细胞的多项促纤维过程^[7]。本研究结果显示,联合用药对上述表型的抑制显著增强,这可能是由于 NAC 在上游削弱了 ROS 介导的 TGF-β 激活及烟酰胺腺嘌呤

二核苷酸磷酸氧化酶 4 (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase 4, NOX4) 放大,下游与 SA 对 Smad/非经典分支的抑制同向叠加而造成的^[25-27]。

联合用药可改善微环境的氧化应激。IPF 气道上皮衬液存在长期 GSH 缺乏与氧化-抗氧化失衡,这一特征会促进 TGF-β 活化与上皮损伤进而加重纤维化^[28]。NAC 作为 GSH 前体可缓解氧化应激、改善黏液-炎症微环境,从而与 SA 的抗纤维化形成分工互补。本研究中,TGF-β1 诱导显著升高 L929 细胞内 ROS 水平,给予 SA 后进一步升高 ROS 水平,而 NAC 及 SA+NAC 联合处理均可部分逆转 TGF-β1 诱导的 ROS 水平升高,且联合给药组与 NAC 组 ROS 水平相近,提示联合用药在氧化应激层面主要依赖 NAC 的作用,同时并未因加入 SA 而额外加重 ROS 负担。课题组此前的联合用药分析亦显示,当 NAC 比例过高(如 SA:NAC=1:3)时,联合给药出现拮抗现象,这可能与过量巯基通过络合 SA 或过度清除信号性 ROS 而削弱 SA 抗纤维化效应有关;而 SA 与 NAC 配伍比例为 2:1 时,

NAC 既能有效缓冲 SA 相关毒性和氧化应激,又不至于过度“中和”其药理作用,从而在抗纤维化效应与安全性之间取得相对平衡。

联合用药可改善免疫微环境。IPF 进展与 M2 型巨噬细胞增多密切相关,近年的研究均将其视为治疗的关键靶点之一^[29-30]。本研究中联合用药显著降低 IPF 小鼠肺组织 CD206 表达,但对 CD86 表达无明显影响,提示其通过抑制巨噬细胞 M2 型极化达到改善间质免疫微环境的目的。既往研究表明,NAC 可通过降低 ROS 水平,抑制白细胞介素-4 (interleukin-4, IL-4) /IL-13 诱导的 M2 极化^[31],但在某些慢性炎症/修复情境又可偏向促修复的 M2 表型^[32];三氧化二砷在不同模型中既有抑制 M2 的报道,也有促 M2 的证据^[33-34]。据此推断,联合用药对于巨噬细胞极化的调控具有剂量、时程以及微环境相关性,是进一步探索的方向之一。

综上,SA 与 NAC 联合用药可能通过抑制成纤维细胞活化、校正氧化还原失衡并重塑免疫微环境等多重途径协同抑制 IPF 的进展,且在动物实验中表现出良好的组织学耐受性。与目前口服一线抗纤维化药物吡非尼酮相比,本研究的联合用药在生存率、体质量恢复、肺组织炎症及胶原沉积、BALF 总蛋白浓度、TGF- β 1 水平和肺组织 Hyp 水平等多维指标上整体呈现相当甚至略优的抗纤维化效应,尤其在下调 COL1A1、 α -SMA 表达和抑制 M2 型巨噬细胞富集方面表现更为突出,提示其在缓解基质重塑和免疫微环境异常方面可能优于吡非尼酮干预。但本研究仅在有限的给药方案和观察周期内对比了吡非尼酮与 SA、NAC 联合用药的疗效,尚缺乏系统的药动学、剂量等效性及长期安全性评价,因此相关结论仍有待进一步验证。本研究为砷剂联合巯基供体治疗 IPF 提供了初步的实验依据和可转化线索。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Zheng D B, Guo J S, Liang Z Y, *et al.* Supramolecular nanofibers ameliorate bleomycin-induced pulmonary fibrosis by restoring autophagy [J]. *Adv Sci*, 2024, 11(28): e2401327.
- [2] Zhang G R, Luo L, Zhang L M, *et al.* Research progress of respiratory disease and idiopathic pulmonary fibrosis based on artificial intelligence [J]. *Diagnostics*, 2023, 13(3): 357.
- [3] 马鑫来, 刘学, 张伟. “肺虚络瘀, 肺络癥瘕”病机观与系统性硬化症合并肺间质纤维化的相关性 [J]. 安徽中医药大学学报, 2023, 42(4): 8-11.
- [4] 庄宛滢, 晏军, 李艳华, 等. 从“肺络微型癥瘕”理论探讨特发性肺纤维化治疗的“三期分治”原则 [J]. 中华中医药杂志, 2023, 38(12): 6100-6102.
- [5] 王克俭. 三氧化二砷治疗动物肺纤维化的深入研究 [D]. 苏州: 苏州大学, 2009.
- [6] 高淑艳. As₂O₃ 上调 miR-98 表达缓解博来霉素诱导的大鼠肺纤维化 [D]. 滨州: 滨州医学院, 2014.
- [7] Joannes A, Morzadec C, Duclos M, *et al.* Arsenic trioxide inhibits the functions of lung fibroblasts derived from patients with idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2022, 441: 115972.
- [8] Luo F Y, Zhuang Y, Sides M D, *et al.* Arsenic trioxide inhibits transforming growth factor- β 1-induced fibroblast to myofibroblast differentiation *in vitro* and bleomycin induced lung fibrosis *in vivo* [J]. *Respir Res*, 2014, 15(1): 51.
- [9] Zhong L Z, Hao H J, Chen D Y, *et al.* Arsenic trioxide inhibits the differentiation of fibroblasts to myofibroblasts through nuclear factor erythroid 2-like 2 (NFE2L2) protein and the Smad2/3 pathway [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(3): 2606-2617.
- [10] Gao S Y, Zhou X, Li Y J, *et al.* Arsenic trioxide prevents rat pulmonary fibrosis via miR-98 overexpression [J]. *Life Sci*, 2014, 114(1): 20-28.
- [11] Hu Y X, Li J, Lou B, *et al.* The role of reactive oxygen species in arsenic toxicity [J]. *Biomolecules*, 2020, 10(2): 240.
- [12] Samarakoon R, Overstreet J M, Higgins P J. TGF- β signaling in tissue fibrosis: Redox controls, target genes and therapeutic opportunities [J]. *Cell Signal*, 2013, 25(1): 264-268.
- [13] Liu R M, Desai L P. Reciprocal regulation of TGF- β and reactive oxygen species: A perverse cycle for fibrosis [J]. *Redox Biol*, 2015, 6: 565-577.
- [14] Rogliani P, Manzetti G M, Gholamalishahi S, *et al.* Impact of N-acetylcysteine on mucus hypersecretion in the airways: A systematic review [J]. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*, 2024, 19: 2347-2360.
- [15] Santus P, Signorello J C, Danzo F, *et al.* Anti-inflammatory and anti-oxidant properties of N-acetylcysteine: A fresh perspective [J]. *J Clin Med*, 2024, 13(14): 4127.
- [16] Rhee C K, Lim S Y, Lee W Y, *et al.* The effect of nebulized N-acetylcysteine on the phlegm of chronic obstructive pulmonary disease: The NEWEST study [J]. *BMC Pulm Med*, 2024, 24(1): 434.
- [17] Mokra D, Mokry J, Barosova R, *et al.* Advances in the use

- of *N*-acetylcysteine in chronic respiratory diseases [J]. *Antioxidants*, 2023, 12(9): 1713.
- [18] Ralph S J. Arsenic-based antineoplastic drugs and their mechanisms of action [J]. *Met Based Drugs*, 2008, 2008: 260146.
- [19] Jin Z, Yi X, Yang J, *et al.* Liposome-coated arsenic-manganese complex for magnetic resonance imaging-guided synergistic therapy against carcinoma [J]. *Int J Nanomed*, 2021, 16: 3775-3788.
- [20] Ettlinger R, Moreno N, Volkmer D, *et al.* Zeolitic imidazolate framework-8 as pH-sensitive nanocarrier for “arsenic trioxide” drug delivery [J]. *Chem A Eur J*, 2019, 25(57): 13189-13196.
- [21] Fu X, Liang Q R, Luo R G, *et al.* An arsenic trioxide nanoparticle prodrug (ATONP) potentiates a therapeutic effect on an aggressive hepatocellular carcinoma model via enhancement of intratumoral arsenic accumulation and disturbance of the tumor microenvironment [J]. *J Mater Chem B*, 2019, 7: 3088-3099.
- [22] Jiao H, Song J, Sun X, *et al.* Sodium arsenite inhibits lung fibroblast differentiation and pulmonary fibrosis [J]. *Pharmacol*, 2019, 104(5/6): 368-376.
- [23] Ganapathy S, Xiao S, Yang M, *et al.* A low-dose arsenic-induced p53 protein-mediated metabolic mechanism of radiotherapy protection [J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(8): 5340-5347.
- [24] Ganapathy S, Xiao S, Seo S J, *et al.* Low-dose arsenic induces chemotherapy protection via p53/NF- κ B-mediated metabolic regulation [J]. *Oncogene*, 2014, 33(11): 1359-1366.
- [25] Chung J, Huda M N, Shin Y, *et al.* Correlation between oxidative stress and transforming growth factor-beta in cancers [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(24): 13181.
- [26] Hecker L, Vittal R, Jones T, *et al.* NADPH oxidase-4 mediates myofibroblast activation and fibrogenic responses to lung injury [J]. *Nat Med*, 2009, 15(9): 1077-1081.
- [27] Xu S W, Thompson K, Khan K, *et al.* Focal adhesion kinase and reactive oxygen species contribute to the persistent fibrotic phenotype of lesional scleroderma fibroblasts [J]. *Rheumatology*, 2012, 51(12): 2146-2154.
- [28] Cantin A M, Hubbard R C, Crystal R G. Glutathione deficiency in the epithelial lining fluid of the lower respiratory tract in idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Am Rev Respir Dis*, 1989, 139(2): 370-372.
- [29] Pommerolle L, Beltramo G, Biziolek L, *et al.* CD206⁺ macrophages are relevant non-invasive imaging biomarkers and therapeutic targets in experimental lung fibrosis [J]. *Thorax*, 2024, 79(12): 1124-1135.
- [30] Ghebremedhin A, Salam A B, Adu-Addai B, *et al.* A novel CD206 targeting peptide inhibits bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice [J]. *Cells*, 2023, 12(9): 1254.
- [31] Zhang Y, Choksi S, Chen K, *et al.* ROS play a critical role in the differentiation of alternatively activated macrophages and the occurrence of tumor-associated macrophages [J]. *Cell Res*, 2013, 23(7): 898-914.
- [32] Zhu Q Y, Tai S, Tang L, *et al.* *N*-acetyl cysteine ameliorates aortic fibrosis by promoting M2 macrophage polarization in aging mice [J]. *Redox Rep*, 2021, 26(1): 170-175.
- [33] Yin J Z, Shi X Q, Wang M D, *et al.* Arsenic trioxide elicits anti-tumor activity by inhibiting polarization of M2-like tumor-associated macrophages via Notch signaling pathway in lung adenocarcinoma [J]. *Int Immunopharmacol*, 2023, 117: 109899.
- [34] Hung C H, Hsu H Y, Chiou H C, *et al.* Arsenic induces M2 macrophage polarization and shifts M1/M2 cytokine production via mitophagy [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(22): 13879.

[责任编辑 李亚楠]