

基于 RAF/MEK/ERK 信号通路探讨苦杏仁-苦参对特发性肺纤维化大鼠的保护作用

韩兴稷^{1,2,3}, 王晓羽⁴, 焦太强⁵, 高晨曦^{1,2}, 李德芳^{1,2}, 贾戌生², 牛 阳^{1,2*}

1. 宁夏医科大学中医学院, 宁夏 银川 750004

2. 宁夏医科大学 中医燥证教育部重点实验室, 宁夏 银川 750004

3. 靖远县中医院, 甘肃 白银 730600

4. 宁夏医科大学 第一临床学院, 宁夏 银川 750004

5. 南京中医药大学第一临床学院, 江苏 南京 210023

摘要: 目的 探讨苦杏仁-苦参 (*Armeniacae Semen Amarum-Sophorae Flavescens Radix*) 对博来霉素诱导的特发性肺纤维化 (idiopathic pulmonary fibrosis, IPF) 大鼠的保护作用, 并探讨其作用机制。方法 SD 大鼠随机分为对照组、模型组、吡非尼酮 (200 mg/kg) 组和苦杏仁-苦参低、中、高剂量 (1、2、4 g/kg) 组, 采用一次性气管滴注硫酸博来霉素 (5 mg/kg) 的方式建立 IPF 大鼠模型, 给予药物干预后, 采用苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 和 Masson 染色观察肺组织病理学改变; ELISA 检测血清及肺泡灌洗液中肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、IL-6、羟脯氨酸 (hydroxyproline, Hyp) 水平; TUNEL 染色检测肺组织细胞凋亡情况; 免疫荧光检测肺组织中 α -平滑肌肌动蛋白 (α -smooth muscle actin, α -SMA)、I 型胶原蛋白 (collagen type I, collagen-I)、纤连蛋白-1 (fibronectin-1, FN-1) 的表达; Western blotting 检测肺组织 p-p38、磷酸化细胞外信号调节激酶 (phosphorylated extracellular signal-regulated kinase, p-ERK)、磷酸化 c-Jun 氨基末端激酶 (phosphorylated c-Jun N-terminal kinase, p-JNK)、B 细胞淋巴瘤-2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bcl-2 associated X protein, Bax) 表达。采用转化生长因子- β 1 (transforming growth factor- β 1, TGF- β 1) 诱导人肺成纤维细胞 (MRC-5) 建立体外模型, 给予苦杏仁-苦参含药血清干预后, 采用 CCK-8 法检测细胞增殖活力; TUNEL 染色检测细胞凋亡情况; 免疫荧光检测 α -SMA、collagen-I、FN-1 的表达; Western blotting 检测 p-RAF、磷酸化丝裂原活化蛋白激酶激酶 (phosphorylated mitogen-activated protein kinase kinase, p-MEK)、p-ERK、细胞周期蛋白 D1 (Cyclin D1)、增殖细胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA)、Bax、Bcl-2 蛋白表达。结果 体内实验中, 与对照组比较, 模型组大鼠体质量降低 ($P < 0.01$), 肺组织干湿质量比和肺脏指数升高 ($P < 0.01$), 肺组织出现明显炎性浸润、肺泡间隙增厚及水肿, 肺组织细胞凋亡率降低 ($P < 0.01$), 血清及肺泡灌洗液中炎症因子水平升高 ($P < 0.01$), 肺组织中 α -SMA、collagen-I、FN-1、p-p38、p-ERK、p-JNK、Bcl-2 蛋白表达显著上调 ($P < 0.01$), Bax 蛋白表达显著下调 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 各给药组大鼠体质量升高 ($P < 0.01$), 肺组织干湿质量比和肺脏指数降低 ($P < 0.01$), 肺组织病理变化得到明显改善, 肺组织细胞凋亡率升高 ($P < 0.01$), 血清及肺泡灌洗液中炎症因子水平降低 ($P < 0.05, 0.01$), 肺组织中 α -SMA、collagen-I、FN-1、p-p38、p-ERK、p-JNK、Bcl-2 蛋白表达显著下调 ($P < 0.01$), Bax 蛋白表达显著上调 ($P < 0.01$)。体外实验中, 与对照组比较, 模型组细胞增殖活性升高 ($P < 0.01$), 细胞凋亡率降低 ($P < 0.01$), α -SMA、collagen-I、FN-1、p-RAF、p-MEK、p-ERK、Cyclin D1、PCNA、Bcl-2 蛋白表达升高 ($P < 0.01$), Bax 蛋白表达降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 杏仁-苦参含药血清以及 RAF 抑制剂 GW5074 干预后细胞增殖活性降低 ($P < 0.05, 0.01$), 细胞凋亡率升高 ($P < 0.01$), α -SMA、collagen-I、FN-1、p-RAF、p-MEK、p-ERK、Cyclin D1、PCNA、Bcl-2 蛋白表达降低 ($P < 0.05, 0.01$), Bax 蛋白表达升高 ($P < 0.05, 0.01$)。结论 苦杏仁-苦参通过调控 RAF/MEK/ERK 信号通路, 抑制炎症反应、抑制细胞增殖以及促进细胞凋亡, 从而发挥抗 IPF 的作用。

关键词: 特发性肺纤维化; 杏仁-苦参; RAF/MEK/ERK 信号通路; 炎症反应; 细胞凋亡

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2026)18-7178-14

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.18.009

收稿日期: 2026-01-26

基金项目: 国家自然科学基金区域创新发展联合基金项目 (U20A20404); 宁夏自然科学基金项目 (2023AAC03212); 国家中医药管理局高水平中医药重点学科温病学学科建设项目 (zyyzdxk-2023209); 2022 年全国名老中医药专家传承工作室建设项目 (国中医药人教函 [2022] 75 号)

作者简介: 韩兴稷 (1998—), 男, 硕士研究生, 研究方向为中医肺病。E-mail: 1916410833@qq.com

***通信作者:** 牛 阳 (1964—), 男, 教授, 从事中医内科学肺病研究。E-mail: niuyang0227@163.com

Protective effect of *Armeniacae Semen Amarum-Sophorae Flavescentis Radix* on rats with idiopathic pulmonary fibrosis based on RAF/MEK/ERK signaling pathway

HAN Xingji^{1, 2, 3}, WANG Xiaoyu⁴, JIAO Taiqiang⁵, GAO Chenxi^{1, 2}, LI Defang^{1, 2}, JIA Xusheng², NIU Yang^{1, 2}

1. School of Traditional Chinese Medicine, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China

2. Key Laboratory of Dryness Syndrome of Traditional Chinese Medicine, Ministry of Education, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China

3. Jingyuan County Hospital of Traditional Chinese Medicine, Baiyin 730600, China

4. First Clinical College, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China

5. First Clinical Medical College, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

Abstract: Objective To explore the protective effect of herb pair Kuxingren (*Armeniacae Semen Amarum*)-Kushen (*Sophorae Flavescentis Radix*) on bleomycin-induced idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) in rats and investigate its mechanism. **Methods** SD rats were randomly divided into control group, model group, pirfenidone (200 mg/kg) group, *Armeniacae Semen Amarum-Sophorae Flavescentis Radix* low-, medium-and high-dose (1, 2, 4 g/kg) groups. The IPF rat model was established by one-time tracheal instillation of bleomycin sulfate (5 mg/kg). After drug intervention, the pathological changes in lung tissue were observed using hematoxylin-eosin (HE) and Masson staining. ELISA was used to detect the levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β), IL-6 and hydroxyproline (Hyp) in serum and bronchoalveolar lavage fluid. TUNEL staining was used to detect cell apoptosis in lung tissue. The expressions of α -smooth muscle actin (α -SMA), collagen type I (collagen-I) and fibronectin-1 (FN-1) in lung tissue were detected by immunofluorescence. Western blotting was used to detect the expressions of p-p38, phosphorylated extracellular signal regulated kinase (p-ERK), phosphorylated c-Jun N-terminal kinase (p-JNK), B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) and Bcl-2 associated X protein (Bax) in lung tissue. Transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) was used to induce human lung fibroblasts (MRC-5) *in vitro* model. After intervention with *Armeniacae Semen Amarum-Sophorae Flavescentis Radix* containing serum, cell proliferation activity was detected using CCK-8 method. TUNEL staining was used to detect cell apoptosis. The expressions of α -SMA, collagen-I and FN-1 were detected by immunofluorescence. Western blotting was used to detect the expressions of p-RAF, phosphorylated mitogen activated protein kinase (p-MEK), p-ERK, Cyclin D1, proliferating cell nuclear antigen (PCNA), Bax and Bcl-2 proteins. **Results** In the *in vivo* experiment, compared with control group, the body weight of rats in model group was decreased ($P < 0.01$), the dry wet mass ratio and lung index of lung tissue were increased ($P < 0.01$), the lung tissue showed significant inflammatory infiltration, thickening and edema of alveolar space, and the cell apoptosis rate of lung tissue was decreased ($P < 0.01$), the levels of inflammatory factors in serum and bronchoalveolar lavage fluid were increased ($P < 0.01$), the protein expressions of α -SMA, collagen-I, FN-1, p-p38, p-ERK, p-JNK and Bcl-2 in lung tissue were significantly up-regulated ($P < 0.01$), while the protein expression of Bax was significantly down-regulated ($P < 0.01$). Compared with model group, the body weight of rats in each treatment group were increased ($P < 0.01$), the dry wet mass ratio and lung index of lung tissue were decreased ($P < 0.01$), the pathological changes of lung tissue were significantly improved, the cell apoptosis rate of lung tissue was increased ($P < 0.01$), the levels of inflammatory factors in serum and bronchoalveolar lavage fluid were decreased ($P < 0.05, 0.01$), the expressions of α -SMA, collagen-I, FN-1, p-p38, p-ERK, p-JNK and Bcl-2 proteins in lung tissue were significantly down-regulated ($P < 0.01$), and the expression of Bax protein was significantly up-regulated ($P < 0.01$). In the *in vitro* experiments, compared with control group, cell proliferation activity in model group was increased ($P < 0.01$), cell apoptosis rate was decreased ($P < 0.01$), α -SMA, collagen-I, FN-1, p-RAF, p-MEK, p-ERK, Cyclin D1, PCNA, Bcl-2 protein expressions were increased ($P < 0.01$), and Bax protein expression was decreased ($P < 0.01$). Compared with model group, *Armeniacae Semen Amarum-Sophorae Flavescentis Radix* containing serum and RAF inhibitor GW5074 intervention resulted in a decrease in cell proliferation activity ($P < 0.05, 0.01$), an increase in cell apoptosis rate ($P < 0.01$), a decrease in the expressions of α -SMA, collagen-I, FN-1, p-RAF, p-MEK, p-ERK, Cyclin D1, PCNA, Bcl-2 proteins ($P < 0.05, 0.01$), and an increase in Bax protein expression ($P < 0.05, 0.01$). **Conclusion** *Armeniacae Semen Amarum-Sophorae Flavescentis Radix* exerts an anti-IPF effect by regulating RAF/MEK/ERK signaling pathway, inhibiting inflammatory response, suppressing cell proliferation and promoting cell apoptosis.

Key words: idiopathic pulmonary fibrosis; *Armeniacae Semen Amarum-Sophorae Flavescentis Radix*; RAF/MEK/ERK signaling pathway; inflammatory response; apoptosis

肺纤维化是由多种病因引起的一种慢性炎症性间质性肺部疾病^[1-3]。因不明原因引起的肺部间质纤维化称为特发性肺纤维化 (idiopathic pulmonary fibrosis, IPF), 主要病理变化为成纤维细胞过度增殖和细胞外基质的过度沉聚^[4-5], 临床主要表现为呼吸困难、运动能力下降、干咳, 预后较差, 诊断后 2.5~5 年死亡^[6-7]。目前主流药物治疗为吡非尼酮与尼达尼布, 但 2 种药物价格昂贵且疗效有限, 并且不良反应严重^[8-9]。因此, 目前急需寻找新型治疗 IPF 的药物。传统中药具有低毒、多层次、多靶点等优点, 在临床应用中具有独有的优势, 运用传统中医中药寻求 IPF 新的治疗方案是目前研究的一个重要方向^[10-12]。

课题组前期研究发现, 麻杏苦甘汤对急性肺损伤 (acute lung injury, ALI) 后肺纤维化具有显著的抗炎、抗肺纤维化作用^[13]。麻杏苦甘汤由苦杏仁、苦参 2 味中药组成, 含有苷类、脂肪酸类、挥发油类、黄酮类、酚酸类、苯丙素类、氨基酸类等多种活性成分^[14-15]。苦杏仁乃传统止咳化痰平喘要药, 其有效成分苦杏仁苷已被证实具有显著的抗炎、抗氧化、平喘镇咳作用^[16-17], 可通过抑制转化生长因子- β 1 (transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)/Smad 信号通路抑制上皮间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 过程, 减轻肺部炎症与纤维化损伤^[16]。现代研究证实了苦参碱和氧化苦参碱作为苦参最主要的活性成分, 在抗炎、抗肿瘤、抗心律失常、抗病原微生物等多方面作用显著^[18]。苦参则以清热燥湿为核心功效, 其活性成分苦参碱具有抗病毒、抗炎、杀菌以及治疗脏器纤维化的药理作用^[19]。氧化苦参碱可通过下调 TGF- β 1、p-Smad2、p-Smad3 的表达, 上调肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)、诱导型一氧化氮合酶 (inducible nitric oxide synthase, iNOS) 的表达来改善 IPF 小鼠的肺组织损伤^[20]。RAS/RAF/丝裂原活化蛋白激酶激酶 (mitogen-activated protein kinase kinase, MEK)/细胞外信号调节激酶 (extracellular signal-regulated kinase, ERK) 信号通路 IPF 进程中成纤维细胞的异常增殖关系尤为紧密^[21-22], 本研究拟基于 RAF/MEK/ERK 信号轴探讨苦杏仁-苦参抗 IPF 的作用及机制。

1 材料

1.1 动物与细胞

SPF 级雄性 SD 大鼠, 体质量 (200±20) g,

购自宁夏医科大学动物中心, 许可证号 SYXK (宁) 2025-0001, 检疫 3 d 后饲养于宁夏医科大学动物屏障中心。饲养条件为室温 20~25 ℃, 相对湿度为 40%~60%, 12 h 光照/黑暗交替, 动物自由进食饮水。本实验经宁夏医科大学医学伦理审查委员会批准 (批准号 IACUC-NYLAC-2024-263)。

MRC-5 人肺成纤维细胞购自 BNCC 公司。

1.2 药材

苦杏仁 (批号 2305414)、苦参 (批号 2410144) 购自宁夏中医医院暨中医研究院, 经宁夏医科大学中医学院牛阳教授分别鉴定为蔷薇科植物山杏 *Prunus armeniaca* L. var. *ansu* Maxim. 的干燥成熟种子、豆科植物苦参 *Sophora flavescens* Ait. 的干燥根。

1.3 药品与试剂

硫酸博来霉素 (货号 R004917) 购自上海易恩化学技术有限公司; 大鼠 IL-1 β 试剂盒 (货号 ER0001)、大鼠 IL-6 试剂盒 (货号 ER0004)、大鼠 TNF- α 试剂盒 (货号 ER0007) 购自杭州华安生物技术有限公司; 羟脯氨酸 (hydroxyproline, Hyp) 试剂盒 (货号 JM-01714R1) 购自江苏晶美生物科技有限公司; I 型胶原蛋白 (collagen type I, collagen-I) 抗体 (货号 AF7001)、纤连蛋白-1 (fibronectin-1, FN-1) 抗体 (货号 AF5335)、 α -平滑肌肌动蛋白 (α -smooth muscle actin, α -SMA) 抗体 (货号 AF1032)、p-p38 抗体 (货号 AF4001)、B 细胞淋巴瘤-2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2) 抗体 (货号 AF6139)、Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bcl-2 associated X protein, Bax) 抗体 (货号 AF0120)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 抗体 (货号 AF7021)、p-RAF 抗体 (货号 AF3065)、p-MEK1/2 抗体 (货号 AF8035)、细胞周期蛋白 D1 (Cyclin D1) 抗体 (货号 AF0931)、增殖细胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA) 抗体 (货号 AF0239) 购自美国 Affinity 公司; p-ERK 抗体 (货号 CY5277)、磷酸化 c-Jun 氨基末端激酶 (phosphorylated c-Jun N-terminal kinase, p-JNK) 抗体 (货号 CY5541) 购自上海 Abways 公司; 全蛋白提取试剂盒 (货号 KGB5303-50) 购自江苏凯基生物技术有限公司; BCA 蛋白定量试剂盒 (货号 ZJ105)、无蛋白快速封闭液 (货号 PS108P) 购自上海雅美生物科技有限公司; 一步法凝胶快速制备试剂盒 (货号 PG212)、高分辨快速电泳缓冲液 (货号 G2152-1L)、免冰浴快速转膜缓冲液 (货号 G2154-1L)、PBS 缓冲液 (货号

G4202)、胎牛血清(货号 G8003)、青霉素链霉素混合液(货号 G4003)、重组胰酶细胞消化液(含 EDTA, 含酚红, 货号 G4021)、CCK-8 试剂盒(货号 G4103)、DEME(货号 G4515)购自武汉赛维尔科技有限公司; TUNEL 试剂盒(货号 rct-50R)购自上海慧蓝生物科技有限公司; TGF- β 1(货号 HY-P7118)购自美国 MedChemExpress 公司; RAF 抑制剂 GW5074(货号 GW5074)购自上海碧云天生物技术有限公司; 二甲基亚砷(货号 D6370T)购自北京博奥拓达科技有限公司; TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒(货号 G1504)购自武汉赛维尔生物科技有限公司; 吡非尼酮(货号 H20133376)购自北京康蒂尼药业股份有限公司。

1.4 仪器

FA2004 型电子天平(上海舜宇恒平科学仪器有限公司); BGA-101 型血气分析仪(广州万孚生物技术有限公司); Aperio LV1 型切片扫描仪(徕卡显微系统有限公司); IX73 型倒置荧光显微镜(日本 Olympus 公司); D-16C 型冷冻离心机、HF100 型恒温培养箱(德国 Sartorius 公司); HSV-12 型水浴锅(上海舜宇恒平公司); BBS-SDS 型超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司); VICTOR Nivo 型多功能酶标仪(德国 Perkin Elmer 公司); 1780164 型-80℃冰箱(青岛海尔公司)。

2 方法

2.1 苦杏仁-苦参及含药血清的制备

称取苦杏仁 9 g、苦参 10 g, 加入 10 倍量水浸泡 45 min 后煎煮 30 min, 滤过; 再加入 8 倍量水煎煮 20 min, 滤过; 合并 2 次滤液, 浓缩至 1 g/mL。

取 SPF 级雄性 SD 大鼠 16 只, 随机分为空白组和苦杏仁-苦参(4 g/kg, 相当于临床等效剂量的 2 倍)组, 每组 8 只。给药组给予相应药物, 空白组给予等体积的生理盐水, 早晚各 1 次, 连续给药 7 d, 末次给药后禁食禁水 12 h, 大鼠麻醉后经腹主动脉采血, 静置、离心取上清, 并将血清置于 37℃水浴锅中 30 min, 冷却后分装存储。

2.2 体内实验

2.2.1 动物分组、造模与给药 SD 大鼠适应性喂养 5 d 后, 随机分为对照组($n=7$)、模型组($n=7$)、吡非尼酮(200 mg/kg)组($n=6$)和苦杏仁-苦参低、中、高剂量(1、2、4 g/kg, 分别相当于临床等效剂量的 0.5、1、2 倍)组($n=6$)。在动物喉镜辅助下, 模型组和各给药组均采用一次性气管滴注硫酸博来霉素(5 mg/kg)的方式建立 IPF 大鼠模

型^[23-25], 对照组则滴入等体积的生理盐水。大鼠出现体质量减轻、呼吸短促, 随机从对照组和模型组中各取 1 只大鼠的肺组织, 结合 HE、Masson 染色显示肺间质炎症、胶原沉积明显增加表明造模成功, 提示 IPF 病理模型构建成功。造模成功后正常饲养 5 d, 然后各给药组给予相应药物(10 mL/kg), 对照组和模型组给予等体积的生理盐水, 1 次/d, 连续给药 15 d。

2.2.2 大鼠体质量测定 自适应性喂养起, 每天观察各组大鼠的精神状态、皮毛色泽、活动情况等一般情况的变化, 并分别在造模前与取材前记录大鼠体质量。

2.2.3 大鼠血清及肺泡灌洗液中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 和 Hyp 水平的检测 大鼠经过 2%戊巴比妥钠(40 mg/kg)麻醉后充分暴露腹腔, 进行腹主动脉采血, 4℃、2 000 r/min 离心 15 min, 分离血清, 置于-80℃冰箱中保存待测。利用大鼠灌胃针插入左主支气管, 固定后注入预冷的磷酸缓冲液 3~4 mL, 反复冲洗 3 次后收集于离心管中, 保证每次回收率 $\geq 80\%$, 于-80℃保存待测。按照试剂盒说明书测定血清及肺泡灌洗液中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 和 Hyp 水平。

2.2.4 大鼠肺组织病理观察 大鼠麻醉后打开胸腔, 分离大鼠肺组织, 剪取右肺用 4%多聚甲醛固定, 经包埋、切片后进行 HE、Masson 染色, 按照表 1、2 标准测定 Szapiel 和 Ashcroft 评分。

表 1 Szapiel 评分表

Table 1 Szapiel scoring scale

Szapiel 评分	评分
无肺泡炎	0
轻度肺泡炎, 局部及近胸部可见单核细胞浸润, 面积小于全肺 20%, 肺泡结构大致正常	1
中度肺泡炎, 病变面积占全肺的 20%~50%	2
重度肺泡炎, 病变面积大于全肺的 50%	3

表 2 Ashcroft 评分表

Table 2 Ashcroft scoring scale

Ashcroft 评分	评分
正常肺组织	0
肺泡或细支气管壁微小纤维增厚	1
肺泡壁中度增厚, 肺组织结构无明显损害	2~3
纤维化加重, 肺结构明显受损, 形成纤维带或小纤维团块	4~5
肺组织结构严重破坏, 纤维面积大, 可伴有蜂窝肺形成	6~7
满视野纤维组织, 整个肺组织全部闭塞坏死	8

2.2.5 大鼠脏器指数的测定 取大鼠左下肺组织, 用 PBS 溶液冲洗干净, 滤纸吸干后称定质量, 记为湿质量; 置于 80 °C 烤箱 24 h 至恒定质量后再次称定质量, 记为干质量, 计算肺脏指数和肺组织干湿质量比。

肺脏指数 = 肺组织湿质量 / 大鼠体质量

2.2.6 TUNEL 染色检测大鼠肺组织细胞凋亡情况 取肺组织石蜡切片, 按照试剂盒说明书操作, 滴加 TUNEL 试剂, 37 °C 孵育 2 h, 加入 DAPI 染液孵育 10 min, 在荧光显微镜下观察和采集图像, 使用 Image J 软件进行分析。

2.2.7 免疫荧光法检测肺组织中 α -SMA、collagen-I、Fn-1 蛋白表达 取大鼠肺组织石蜡切片, 经脱蜡水化、抗原修复、通透后, 室温下用 10% 牛血清白蛋白封闭 1.5 h, 滴加 collagen-I (1 : 300)、Fn-1 (1 : 300)、 α -SMA (1 : 100) 抗体, 4 °C 孵育过夜; 次日, 回收一抗, 滴加二抗 (1 : 50), 室温孵育 1 h, 滴加 DAPI 避光孵育 10 min, 使用抗荧光淬灭封片剂封片, 使用荧光显微镜观察并拍照。

2.2.8 Western blotting 检测肺组织中 p-p38、p-ERK、p-JNK、Bcl-2、Bax 蛋白表达 取大鼠肺组织, 用预冷 PBS 冲洗后剪成小块, 立即置于液氮保存。称取 2 g 肺组织, 加入预冷的 RIPA 裂解液 (含蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂), 用组织匀浆器充分破碎肺组织, 4 °C、12 000 r/min 离心 15 min, 取上清, 采用 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, 用快速封闭液封闭 10 min, TBST 洗涤 3 次后, 加入一抗, 4 °C 孵育过夜; TBST 洗涤 3 次后, 加入二抗, 室温孵育 2 h, TBST 洗涤后, 加入 ECL 化学发光试剂, 进行曝光成像。

2.3 体外实验

2.3.1 细胞培养 MRC-5 细胞用含 10% 胎牛血清的 MEM 培养基, 于 37 °C、5% CO₂ 的细胞培养箱中培养。

2.3.2 CCK-8 法检测细胞活力

(1) 苦杏仁-苦参含药血清对 MRC-5 细胞活力的影响: 取对数生长期的 MRC-5 细胞以 5×10^3 个/孔接种于 96 孔板中, 培养 24 h 后更换为无血清培养基饥饿细胞 12 h。吸弃培养液, PBS 洗涤细胞 2 次, 分别加入 1.25%、2.50%、5.00%、10.00%、20.00%、40.00%、80.00% 的苦杏仁-苦参含药血清, 对照组加入不含药物的培养基, 每组设 4 个复孔, 置于培养

箱中培养 24 h。加入 10 μ L CCK-8 溶液, 孵育 2 h, 采用酶标仪测定各组吸光度 (A) 值。

(2) 苦杏仁-苦参含药血清对 TGF- β 1 诱导的 MRC-5 细胞活力的影响: 取对数生长期的 MRC-5 细胞, 以 5×10^3 个/孔接种于 96 孔板中, 培养 24 h 后更换为无血清培养基饥饿细胞 12 h。设置对照组、模型组、5% 苦杏仁-苦参含药血清组、10% 苦杏仁-苦参含药血清组和 RAF 抑制剂 GW5074 (5 μ mol/L) 组。吸弃培养液, PBS 洗涤细胞 2 次, 对照组加入含 10% 大鼠空白血清的培养基, 模型组加入 5 ng/mL TGF- β 1^[26-27] 和含 10% 大鼠空白血清的培养基, 5% 苦杏仁-苦参含药血清组加入 5 ng/mL TGF- β 1 和含 5% 苦杏仁-苦参含药血清、5% 大鼠空白血清的培养基, 10% 苦杏仁-苦参含药血清组加入 5 ng/mL TGF- β 1 和含 10% 苦杏仁-苦参含药血清的培养基, GW5074 组加入 5 ng/mL TGF- β 1、5 μ mol/L GW5074 和含 10% 大鼠空白血清的培养基。培养 24 h 后, 加入 10 μ L CCK-8 溶液, 孵育 2 h, 采用酶标仪测定各组 A 值。

2.3.3 TUNEL 法检测细胞凋亡情况 将 MRC-5 细胞接种于置有爬片的 6 孔板中, 按照 “2.3.2 (2)” 项下方法进行分组和处理, 干预 24 h 后, 洗涤爬片, 用 4% 多聚甲醛固定 15 min, 加入破膜工作液 100 μ L, 孵育 20 min; 滴加 TUNEL 试剂覆盖细胞, 37 °C 孵育 2 h; 滴加 DAPI 染液孵育 10 min, 于荧光显微镜下观察并拍照, 使用 Image J 软件进行分析。

2.3.4 免疫荧光法检测 α -SMA、collagen-I、Fn-1 蛋白表达 按照 “2.3.2 (2)” 项下方法进行分组和处理, 干预 24 h 后, 加入 4% 多聚甲醛固定细胞 15 min, 加入 0.5% Triton-X 100 通透 20 min, 室温下用 10% 牛血清白蛋白封闭 1.5 h, 滴加一抗, 4 °C 孵育过夜; 滴加二抗, 室温孵育 1 h, 滴加 DAPI 孵育 10 min 后, 使用荧光显微镜观察并拍照。

2.3.5 Western blotting 检测 p-RAF、p-MEK、p-ERK、Bax、Bcl-2、Cyclin D1 和 PCNA 蛋白表达 按照 “2.3.2 (2)” 项下方法进行分组和处理, 干预 24 h 后, 收集细胞, 加入裂解液提取蛋白, 按 “2.2.8” 项下方法检测相关蛋白表达。

2.4 统计学分析

利用 Excel 和 GraphPad Prism 8 软件进行数据处理和统计学分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组之间采用 Student's *t* 检验, 多组样本间比较采用单因素方差分析 (ANOVA)。

3 结果

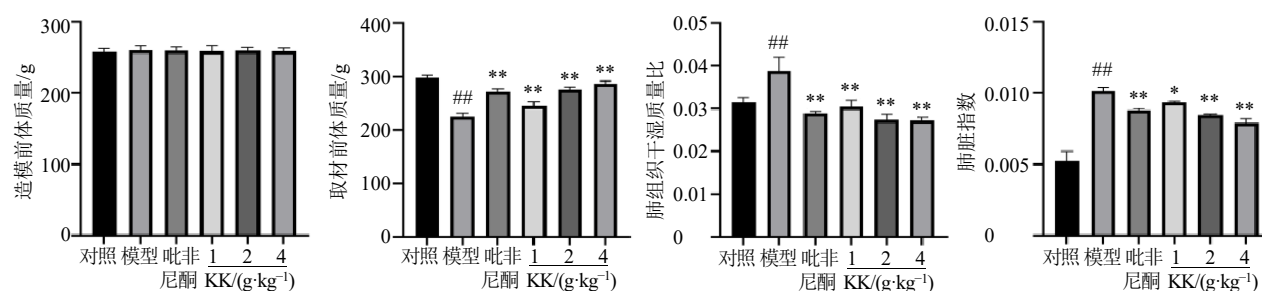
3.1 苦杏仁-苦参对 IPF 大鼠体质量、肺组织干湿质量比和肺脏指数的影响

与对照组比较,模型组大鼠精神状态差、呼吸频率增加、皮毛焦黄枯燥、出现脱毛、弓背等活动功能不佳,并且部分大鼠出现鼻出血;给予药物干预后,大鼠精神状态、呼吸频率、皮毛色泽、活动情况等一般情况较模型组改善。如图 1 所示,造模前各组大鼠的体质量无明显差异;与对照组比较,实验终点模型组大鼠体质量显著降低 ($P<0.01$),肺组织干湿质量比和肺脏指数显著升高 ($P<0.01$);

与模型组比较,实验终点各给药组大鼠体质量显著升高 ($P<0.01$),肺组织干湿质量比和肺脏指数显著降低 ($P<0.05$ 、 0.01)。

3.2 苦杏仁-苦参对 IPF 大鼠血清和肺泡灌洗液炎症因子水平的影响

如表 3、4 所示,与对照组比较,模型组大鼠血清和肺泡灌洗液中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 和 Hyp 水平显著升高 ($P<0.01$);与模型组比较,各给药组大鼠血清和肺泡灌洗液中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 和 Hyp 水平显著降低 ($P<0.05$ 、 0.01),表明苦杏仁-苦参能明显抑制 IPF 大鼠的炎症反应。



KK-苦杏仁-苦参;与对照组比较:## $P<0.01$;与模型组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$, 下图同。

KK-Armeniacae Semen Amarum-Sophorae Flavescentis Radix; ## $P<0.01$ vs control group; * $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs model group, same as below figures.

图 1 苦杏仁-苦参对 IPF 大鼠体质量、肺组织干湿质量比和肺脏指数的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 1 Effects of *Armeniacae Semen Amarum-Sophorae Flavescentis Radix* (KK) on body weight, dry wet mass ratio of lung tissue and lung index in IPF rats ($\bar{x} \pm s, n=6$)

表 3 各组大鼠血清中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 和 Hyp 水平比较 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 3 Comparison of levels of TNF- α , IL-1 β , IL-6 and Hyp in serum of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	TNF- α /(pg·mL ⁻¹)	IL-1 β /(pg·mL ⁻¹)	IL-6/(pg·mL ⁻¹)	Hyp/(pg·mL ⁻¹)
对照	—	57.98 $\pm$ 2.80	66.88 $\pm$ 4.14	94.15 $\pm$ 8.71	37.94 $\pm$ 2.83
模型	—	106.68 $\pm$ 23.43##	238.79 $\pm$ 10.78##	240.17 $\pm$ 44.68##	88.57 $\pm$ 23.09##
吡非尼酮	0.2	73.61 $\pm$ 1.28**	133.42 $\pm$ 18.21**	141.73 $\pm$ 3.74**	53.71 $\pm$ 1.28**
苦杏仁-苦参	1	80.53 $\pm$ 2.59**	200.69 $\pm$ 20.76**	158.30 $\pm$ 5.92**	56.98 $\pm$ 1.51**
	2	73.61 $\pm$ 1.21**	97.62 $\pm$ 2.99**	123.35 $\pm$ 4.32**	53.68 $\pm$ 1.22**
	4	68.61 $\pm$ 1.16**	85.74 $\pm$ 5.88**	111.82 $\pm$ 2.79**	48.64 $\pm$ 1.18**

与对照组比较:## $P<0.01$;与模型组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$, 表 4 同。

$P<0.01$ vs control group; * $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs model group, same as table 4.

表 4 各组大鼠肺泡灌洗液中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 和 Hyp 水平比较 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 4 Comparison of levels of TNF- α , IL-1 β , IL-6 and Hyp in bronchoalveolar lavage fluid of rats in each group

($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	TNF- α /(pg·mL ⁻¹)	IL-1 β /(pg·mL ⁻¹)	IL-6/(pg·mL ⁻¹)	Hyp/(pg·mL ⁻¹)
对照	—	30.71 $\pm$ 1.06	106.46 $\pm$ 2.92	22.63 $\pm$ 1.43	28.56 $\pm$ 2.83
模型	—	45.75 $\pm$ 10.14##	191.45 $\pm$ 6.22##	43.82 $\pm$ 3.18##	77.19 $\pm$ 23.09##
吡非尼酮	0.2	34.39 $\pm$ 0.29**	126.29 $\pm$ 1.50**	36.83 $\pm$ 1.03**	43.33 $\pm$ 1.28**
苦杏仁-苦参	1	35.70 $\pm$ 0.52**	149.69 $\pm$ 11.72**	39.70 $\pm$ 0.40*	48.27 $\pm$ 2.60**
	2	33.43 $\pm$ 0.23**	117.01 $\pm$ 3.20**	32.04 $\pm$ 1.05**	39.30 $\pm$ 1.22**
	4	33.22 $\pm$ 0.23**	73.10 $\pm$ 3.04**	26.35 $\pm$ 2.14**	34.26 $\pm$ 1.18**

3.3 苦杏仁-苦参对 IPF 大鼠肺组织病理变化的影响

如图 2 所示,对照组大鼠肺组织结构清晰完整,肺泡间隔无增厚,无明显炎症细胞浸润^[16];模型组大鼠肺组织结构出现明显破坏,肺泡间隔显著增厚变宽,肺泡代偿性增大或萎缩,肺泡腔内出现大量炎症细胞浸润,Szapiel、Ashcroft 评分显著升高 ($P < 0.01$);给予药物干预后,各给药组大鼠肺组织结构破坏、肺泡间隔以及炎症细胞浸润较模型组明显改善,Szapiel、Ashcroft 评分显著降低 ($P < 0.01$),表明苦杏仁-苦参能够改善 IPF 肺组织病理改变。

3.4 苦杏仁-苦参对 IPF 大鼠肺组织细胞凋亡的影响

如图 3 所示,与对照组比较,模型组大鼠肺组织仅有少量的 TUNEL 染色细胞 ($P < 0.01$);与模型组比较,各给药组大鼠肺组织 TUNEL 染色细胞比例显著升高 ($P < 0.01$),表明苦杏仁-苦参可通过促进肺组织细胞的凋亡来延缓 IPF 的进程。

3.5 苦杏仁-苦参对 IPF 大鼠肺组织 α -SMA、collagen-I 和 Fn-1 蛋白表达的影响

如图 4 所示,与对照组比较,模型组大鼠肺组织中 α -SMA、collagen-I 和 Fn-1 表达显著升高 ($P < 0.01$);与模型组比较,各给药组大鼠肺组织中 α -SMA、collagen-I 和 Fn-1 表达显著降低 ($P < 0.01$),表明苦杏仁-苦参可通过下调肺组织中纤维化相关蛋白表达,从而改善 IPF 的发生与发展。

3.6 苦杏仁-苦参对 IPF 大鼠肺组织 p-p38、p-ERK、p-JNK、Bcl-2 和 Bax 蛋白表达的影响

如图 5 所示,与对照组比较,模型组大鼠肺组织中 p-p38、p-ERK、p-JNK、Bcl-2 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.01$),Bax 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.01$);与模型组比较,各给药组大鼠肺组织中 p-p38、p-ERK、p-JNK、Bcl-2 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.01$),Bax 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.01$),表明苦杏仁-苦参可通过调控 MAPK 信号通路,促进肺组织中细胞凋亡。

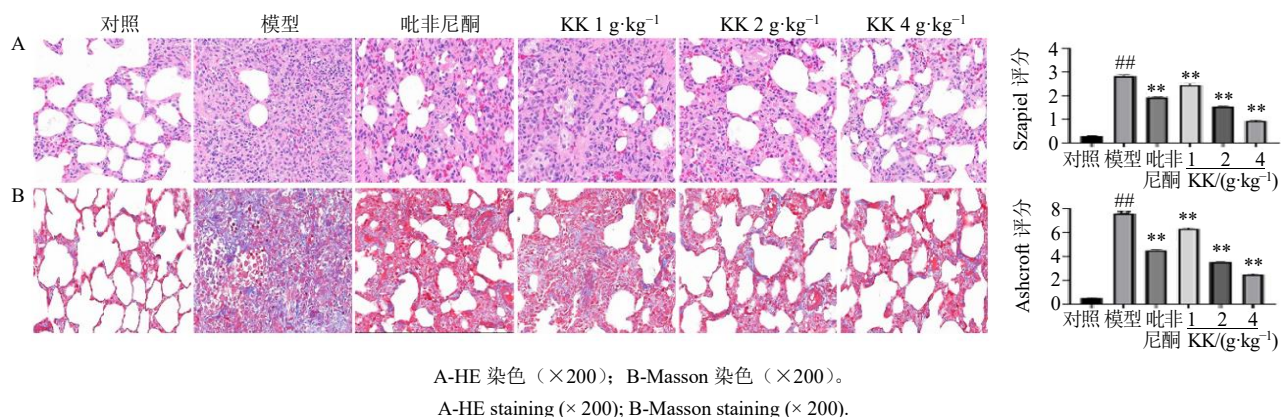


图 2 苦杏仁-苦参对 IPF 大鼠肺组织病理变化的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Fig. 2 Effect of KK on pathological changes of lung tissue in IPF rats ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

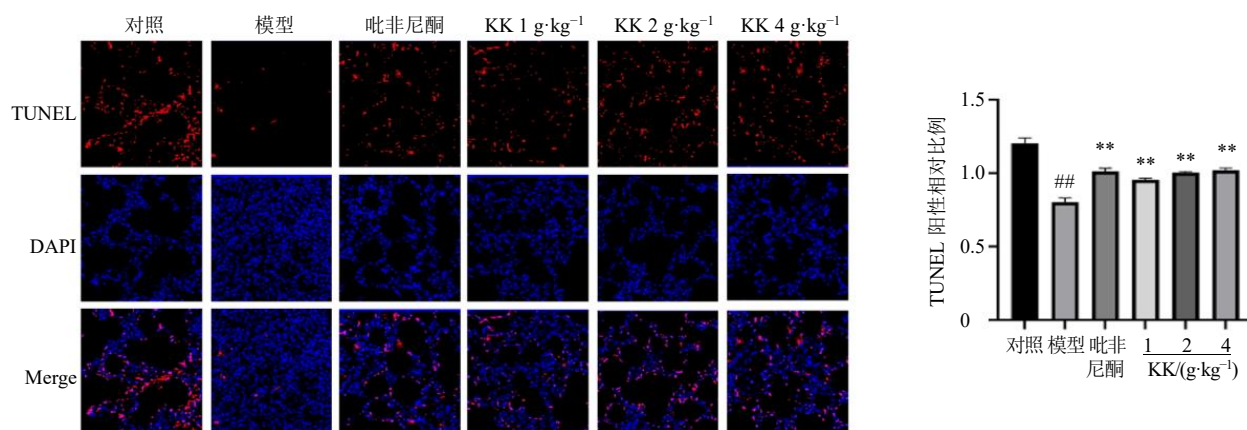


图 3 苦杏仁-苦参对 IPF 大鼠肺组织细胞凋亡的影响 ($\times 200$; $\bar{x} \pm s, n = 4$)

Fig. 3 Effect of KK on cell apoptosis of lung tissue in IPF rats ($\times 200$; $\bar{x} \pm s, n = 4$)

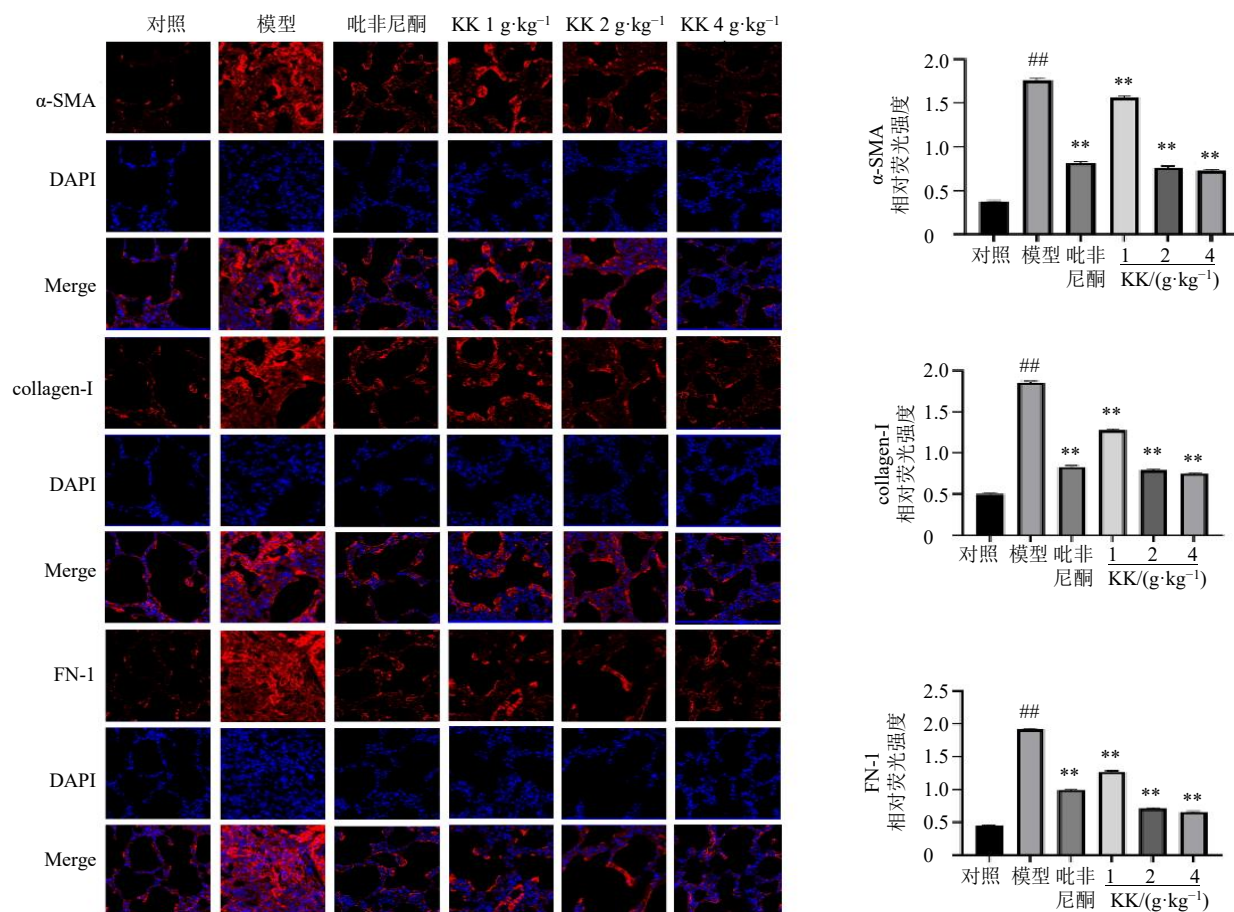


图 4 苦杏仁-苦参对 IPF 大鼠肺组织 α -SMA、collagen-I 和 Fn-1 蛋白表达的影响 ($\times 200$; $\bar{x} \pm s$, $n = 4$)

Fig. 4 Effect of KK on expressions of α -SMA, collagen-I and Fn-1 proteins in lung tissue of IPF rats ($\times 200$; $\bar{x} \pm s$, $n = 4$)

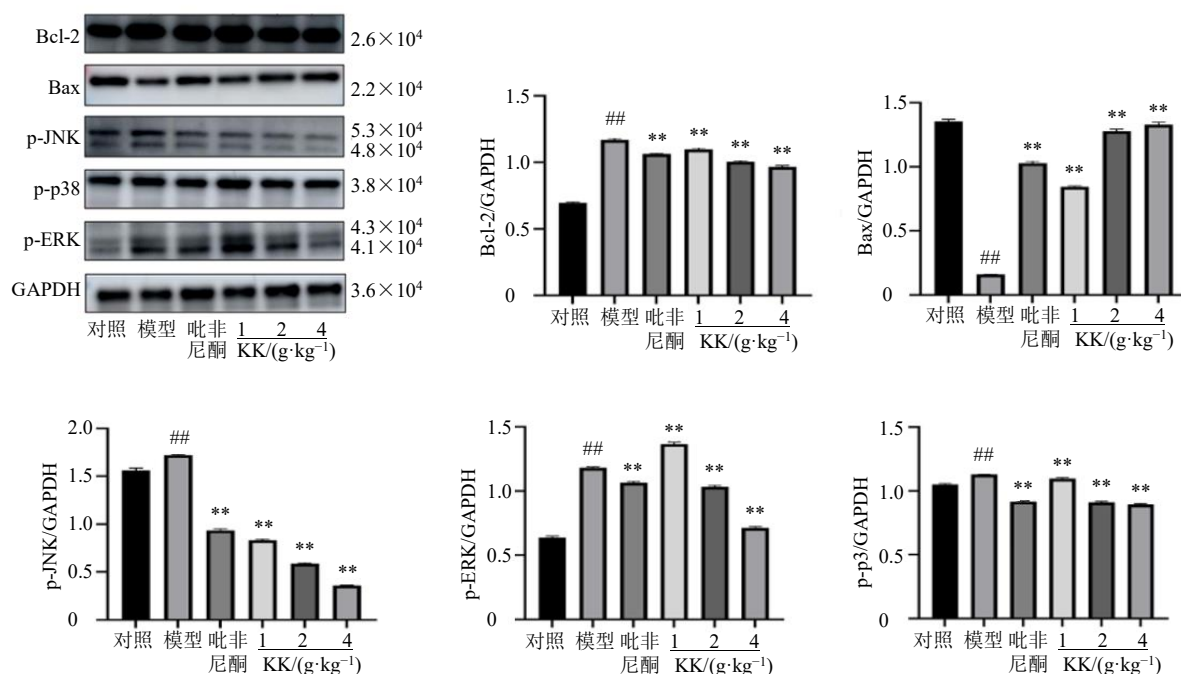


图 5 苦杏仁-苦参对 IPF 大鼠肺组织 p-p38、p-ERK、p-JNK、Bcl-2 和 Bax 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)

Fig. 5 Effect of KK on expressions of p-p38, p-ERK, p-JNK, Bcl-2 and Bax proteins in lung tissue of IPF rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)

3.7 苦杏仁-苦参含药血清对 MRC-5 细胞活力的影响

如图 6-A 所示, 1.25%~80.0%苦杏仁-苦参含药血清作用 24 h 对 MRC-5 细胞活力无明显影响, 表明苦杏仁-苦参含药血清对 MRC-5 细胞无明显毒性作用。如图 6-B 所示, 与对照组比较, TGF- β 1 对 MRC-5 细胞增殖具有明显的促进作用 ($P<0.01$); 经 5%、10%苦杏仁-苦参含药血清以及 GW5074 干预后, 细胞活力显著降低 ($P<0.01$), 表明苦杏仁-

苦参含药血清能够抑制 TGF- β 1 诱导的 MRC-5 细胞增殖。

3.8 苦杏仁-苦参含药血清对 TGF- β 1 诱导的 MRC-5 细胞凋亡的影响

如图 7 所示, 与对照组比较, 模型组细胞凋亡率显著降低 ($P<0.01$); 与模型组比较, 各给药组细胞凋亡率显著升高 ($P<0.01$), 表明苦杏仁-苦参含药血清能够促进 TGF- β 1 诱导的 MRC-5 细胞凋亡。

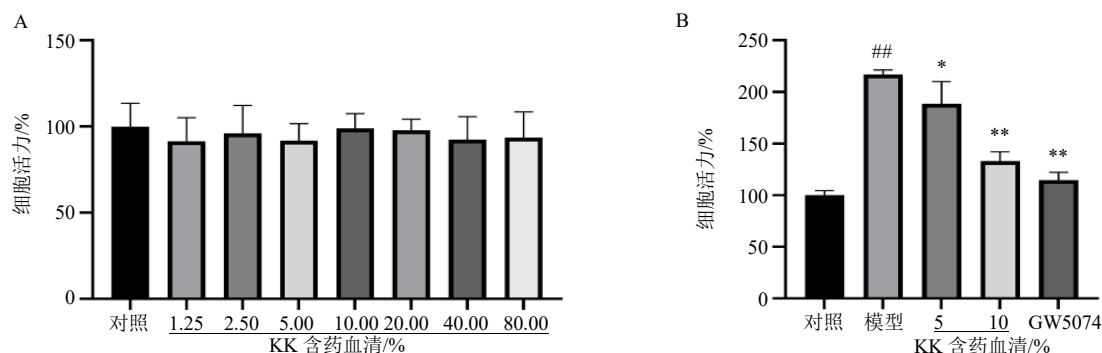


图 6 苦杏仁-苦参含药血清对 MRC-5 细胞 (A) 和 TGF- β 1 诱导的 MRC-5 细胞 (B) 活力的影响 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Fig. 6 Effect of KK drug containing serum on activity of MRC-5 cells (A) and TGF- β 1-induced MRC-5 cells (B) ($\bar{x} \pm s, n=5$)

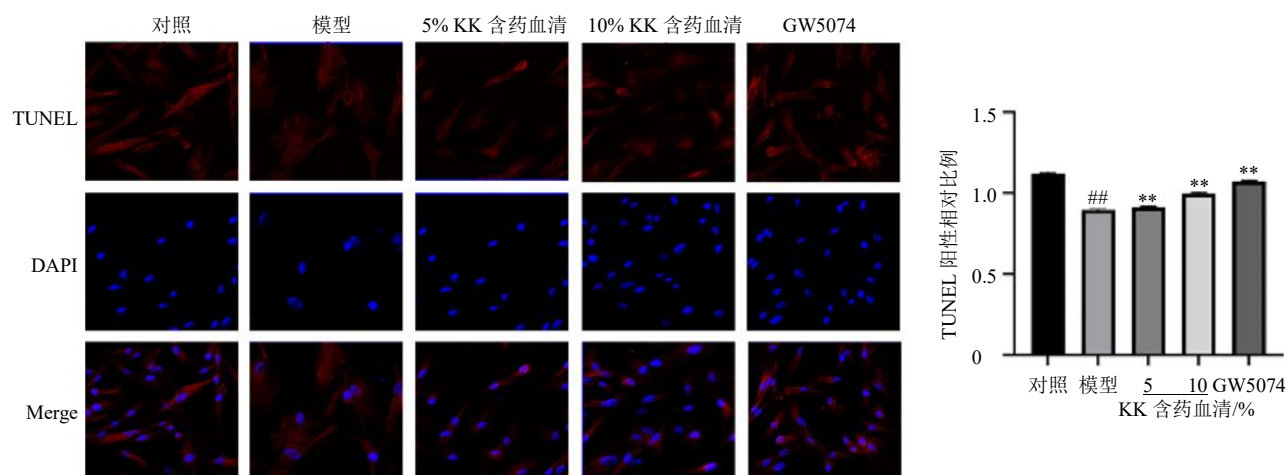


图 7 苦杏仁-苦参含药血清对 TGF- β 1 诱导的 MRC-5 细胞凋亡的影响 ($\times 200$; $\bar{x} \pm s, n=4$)

Fig. 7 Effect of KK drug containing serum on apoptosis of TGF- β 1-induced MRC-5 cells ($\times 200$; $\bar{x} \pm s, n=4$)

3.9 苦杏仁-苦参含药血清对 TGF- β 1 诱导的 MRC-5 细胞中 α -SMA、collagen-I 和 Fn-1 蛋白表达的影响

如图 8 所示, 与对照组比较, 模型组 α -SMA、collagen-I 和 Fn-1 表达显著升高 ($P<0.01$); 与模型组比较, 各给药组 α -SMA、collagen-I 和 Fn-1 表达显著降低 ($P<0.01$), 表明苦杏仁-苦参含药血清能

够抑制 TGF- β 1 诱导的 MRC-5 细胞中纤维化相关蛋白表达。

3.10 苦杏仁-苦参含药血清对 TGF- β 1 诱导的 MRC-5 细胞中 p-RAF、p-MEK、p-ERK、Cyclin D1、PCNA、Bax 和 Bcl-2 蛋白表达的影响

如图 9 所示, 与对照组比较, 模型组 p-RAF、p-MEK、p-ERK、Cyclin D1、PCNA、Bcl-2 蛋白表

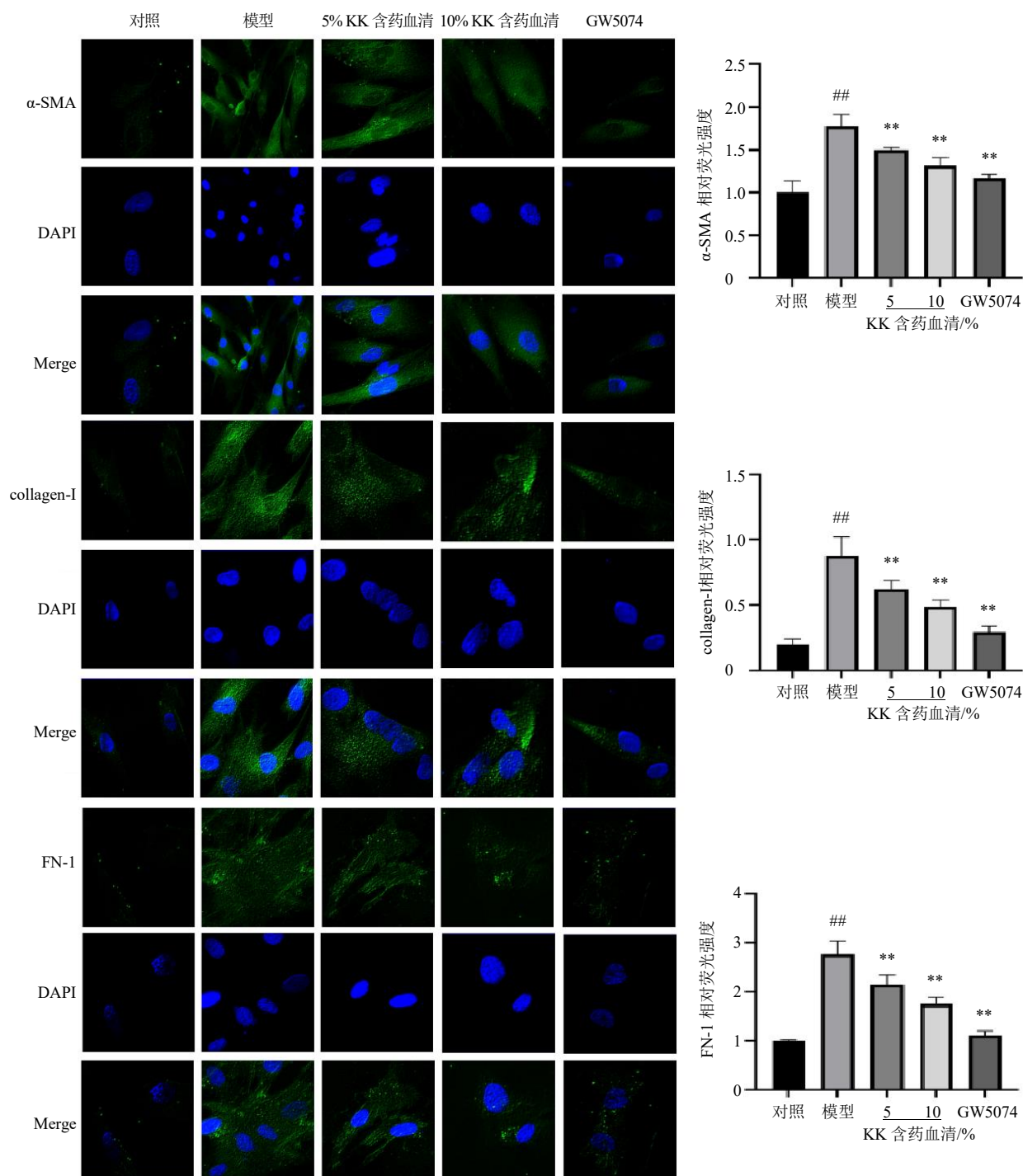


图 8 苦杏仁-苦参对 IPF 大鼠肺组织 α -SMA、collagen-I 和 Fn-1 蛋白表达的影响 ($\times 200$; $\bar{x} \pm s$, $n = 4$)

Fig. 8 Effect of KK drug containing serum on expressions of α -SMA, collagen-I and Fn-1 proteins in TGF- β 1-induced MRC-5 cells ($\times 200$; $\bar{x} \pm s$, $n = 4$)

达水平显著升高 ($P < 0.01$), Bax 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 各给药组 p-RAF、p-MEK、p-ERK、Cyclin D1、PCNA、Bcl-2 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01), Bax 蛋白表达水

平显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01), 表明苦杏仁-苦参含药血清能够抑制 TGF- β 1 诱导的 MRC-5 细胞中 RAF/MEK/ERK 信号通路的激活, 促进细胞凋亡并抑制其增殖。

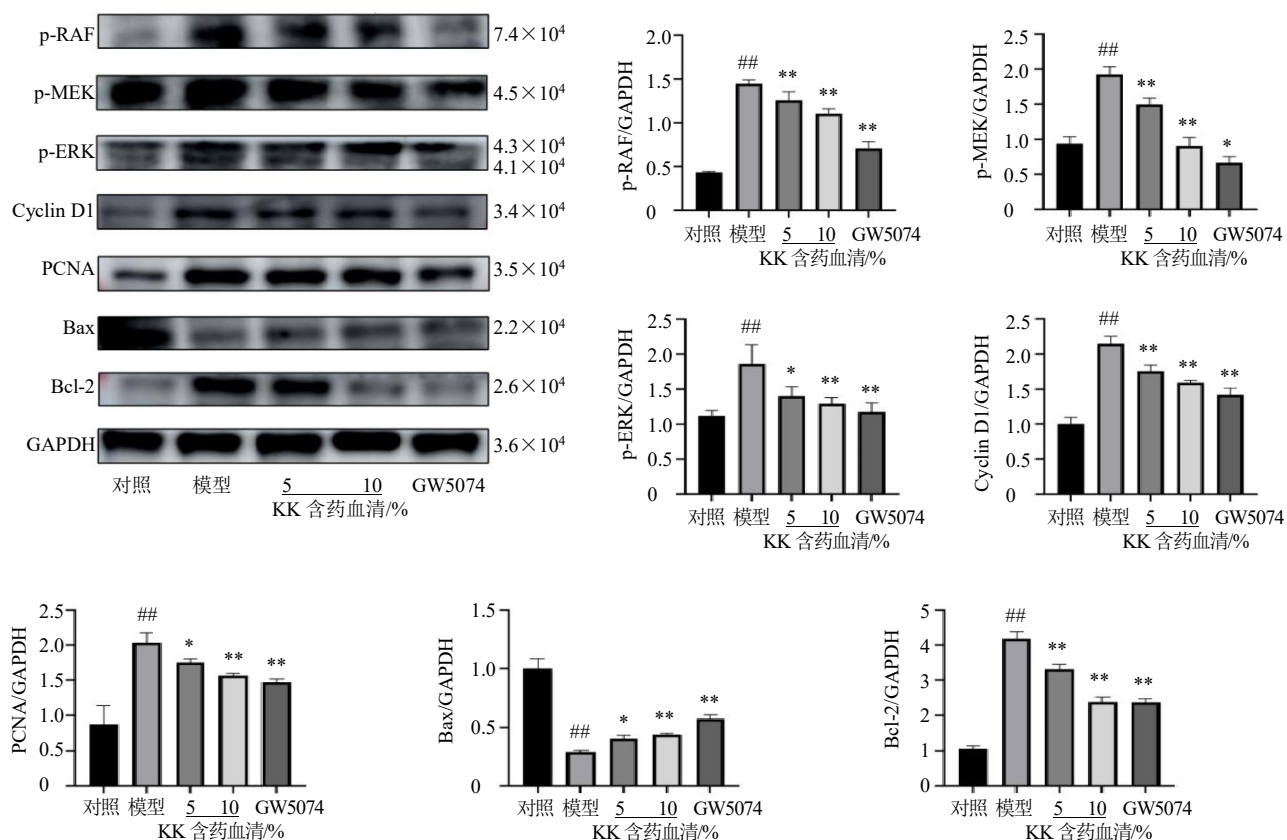


图9 苦杏仁-苦参含药血清对 TGF- β 1 诱导的 MRC-5 细胞中 p-RAF、p-MEK、p-ERK、Cyclin D1、PCNA、Bax 和 Bcl-2 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Fig. 9 Effect of KK drug containing serum on expressions of p-RAF, p-MEK, p-ERK, Cyclin D1, PCNA, Bax and Bcl-2 proteins in TGF- β 1-induced MRC-5 cells ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

4 讨论

丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 信号通路主要包含 p38、ERK 及 JNK 3 条信号通路^[28], 其作为细胞受到刺激产生众多细胞效应 (如细胞增殖、分化、转化及凋亡等) 的介导, 在肺纤维化的发生发展中发挥着关键的作用。p38 信号通路主要介导肺纤维化早期阶段的炎症反应, 激活后会释放多种促炎因子, 最终导致炎症反应失衡^[29]。最为关键的机制是活化的 p38 信号通路可进一步激活其下游核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 信号通路, 从而促进巨噬细胞、中性粒细胞、内皮细胞释放炎症因子与黏附分子, 进一步放大肺纤维化早期炎症反应^[30]。本研究结果显示, 苦杏仁-苦参干预后 IPF 大鼠血清和肺泡灌洗液中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平显著降低, Szapiel 评分降低, p-p38 蛋白表达下调, 表明苦杏仁-苦参可以介导 p-p38 信号通路来抑制大鼠 IPF 进程中的早期炎症反应。小鼠体质量损失程度与 IL-6 等炎症因子

水平呈强负相关^[31], 苦杏仁-苦参可通过抑制大鼠的炎症反应来改善大鼠体质量的减轻, 提高大鼠生存质量。此外, 激活的 p38、NF- κ B 又可以促进肺泡上皮细胞的间质转化与成纤维细胞的增殖分化^[32]。Hyp 是胶原纤维沉积的关键指标, 能间接反映肺组织中胶原代谢情况^[33-34]。苦杏仁-苦参可以下调了血清与肺泡灌洗液中 Hyp 水平, 降低 Ashcroft 评分和肺组织中胶原纤维蛋白的表达, 表明苦杏仁-苦参对 IPF 大鼠细胞外基质具有显著的抑制作用。

JNK 信号通路同样调控炎症反应、氧化应激, 发生磷酸化而通路激活, 调控 Bax 等凋亡基因, 启动下游级联放大凋亡反应, 介导细胞凋亡^[35], 并且是 TGF- β 1 下游的重要信号转导通路^[34]。在体内、外研究中, 苦杏仁-苦参显著增加细胞凋亡, 上调促凋亡蛋白 Bax 的表达, 下调抗凋亡蛋白 Bcl-2 和 p-JNK 的表达, 表明苦杏仁-苦参可介导 JNK 信号通路发挥对 IPF 中凋亡反应的正向调控。

在博来霉素诱导的 IPF 模型中 ERK1 与 ERK2

的表达显著上调,表明该通路与肺纤维化的发生发展关系紧密^[36-37]。而其发挥生物效应的主要机制为通过 RAS/RAF/MEK/ERK 的磷酸化级联反应来实现^[35,38]。其中,活化的 RAF 磷酸化激活下游蛋白 MEK,进一步通过双磷酸化选择性地激活 ERK^[39]。本研究结果显示,模型组大鼠肺组织 p-ERK 蛋白表达显著上调,而苦杏仁-苦参干预后可显著抑制 ERK 的磷酸化水平。ERK 信号通路的激活与许多致纤维化因子 TGF- β 、血小板源性生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF)、结缔组织生长因子(connective tissue growth factor, CTGF)有关,并且参与成纤维细胞的增殖与细胞外基质的沉积^[40-41]。体外实验中,苦杏仁-苦参含药血清对 MRC-5 细胞无明显的毒性作用,而 5%、10%苦杏仁-苦参含药血清对 TGF- β 1 诱导的 MRC-5 细胞增殖表现出抑制作用。PCNA 和 Cyclin D1 蛋白表达的上调与肺纤维化的发展呈正相关^[42-43]。本研究苦杏仁-苦参含药血清干预后 Cyclin D1、PCNA 蛋白表达下调,提示苦杏仁-苦参含药血清对 TGF- β 1 诱导的 MRC-5 细胞增殖具有抑制作用。免疫荧光染色结果显示,与模型组比较,苦杏仁-苦参含药血清显著下调 TGF- β 1 诱导的 MRC-5 细胞中 α -SMA、collagen-I、FN-1 蛋白的表达,表明苦杏仁-苦参含药血清对细胞外基质沉积具有抑制作用。Western blotting 结果显示,苦杏仁-苦参含药血清干预后 MRC-5 细胞中 p-RAF、p-MEK、p-ERK 蛋白表达降低,表明苦杏仁-苦参含药血清介导了 RAF/MEK/ERK 信号轴。以上结果表明苦杏仁-苦参可介导 RAF/MEK/ERK 信号通路实现对 IPF 中增殖与凋亡反应的双向调控,从而达到治疗 IPF 的作用。

肺纤维化是现代医学中概念,根据其刺激性干咳、呼吸苦难等^[43-45]临床病理表现,归属中医“肺痹”“肺痿”范畴^[46]。王昊等^[47]认为湿热与肺纤维化的发生发展关系密切,提出湿热蕴肺致“瘀”、湿热蕴肺致“虚”、湿热蕴肺致“毒”的证候理论。陈凤等^[48]以“伏毒”(湿毒、热毒、瘀毒、痰毒)理论类比现代医学中细胞自噬,来论述肺纤维化的微观病理机制。此外,从运气视域来讲,任玥等^[49]通过就诊的肺间质纤维化门诊及病房患者临床数据分析,指出客气为太阴湿土最易患该病。可见在肺纤维化的发生发展中存在湿热毒邪的致病因素。本研究苦杏仁、苦参 2 味中药润燥相配,标本兼治,既可宣肺理气化湿、润燥止咳化痰,又可清热燥湿解毒,

加之 2 药味苦的特性,也正合《内经》“肺苦气上逆,急食苦以泄之”的气味辨治法。同时,也正中上述肺纤维化湿热毒邪为患的病理特征。

综上,苦杏仁-苦参通过调控 MAPK 信号通路抑制 IPF 大鼠炎症反应,并通过 RAF/MEK/ERK 信号轴促进 MRC-5 细胞凋亡、抑制增殖;此外,苦杏仁-苦参还能抑制细胞外基质过度沉积,多途径协同调控 IPF 的病理进程。苦杏仁-苦参对 IPF 的防治充分体现在多通路、多机制等综合方面,正是现代中药复方具有多靶点调控、个性化治疗、局部到整体调节的应用优势。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Savin I A, Zenkova M A, Sen'kova A V. Pulmonary fibrosis as a result of acute lung inflammation: Molecular mechanisms, relevant *in vivo* models, prognostic and therapeutic approaches [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(23): 14959.
- [2] Spagnolo P, Kropski J A, Jones M G, *et al*. Idiopathic pulmonary fibrosis: Disease mechanisms and drug development [J]. *Pharmacol Ther*, 2021, 222: 107798.
- [3] 孙梦迪, 孙志运, 卢芳, 等. 五味子乙素联合桔梗皂苷 D 通过抑制 JAK2/STAT6 通路调控巨噬细胞 M1/M2 极化改善肺纤维化 [J]. *中草药*, 2026, 57(3): 968-980.
- [4] Chanda D, Otoupalova E, Smith S R, *et al*. Developmental pathways in the pathogenesis of lung fibrosis [J]. *Mol Aspects Med*, 2019, 65: 56-69.
- [5] Burgstaller G, Oehrle B, Gerckens M, *et al*. The instructive extracellular matrix of the lung: Basic composition and alterations in chronic lung disease [J]. *Eur Respir J*, 2017, 50(1). DOI:10.1183/13993003.01805-2016.
- [6] 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.
- [7] Xie B B, Ren Y H, Geng J, *et al*. Idiopathic Pulmonary Fibrosis Registry China study (PORTRAY): Protocol for a prospective, multicentre registry study [J]. *BMJ Open*, 2020, 10(11): e036809.
- [8] Thannickal V J, Toews G B, White E S, *et al*. Mechanisms of pulmonary fibrosis [J]. *Annu Rev Med*, 2004, 55: 395-417.
- [9] Justet A, Klay D, Porcher R, *et al*. Safety and efficacy of pirfenidone and nintedanib in patients with idiopathic pulmonary fibrosis and carrying a telomere-related gene

- mutation [J]. *Eur Respir J*, 2021, 57(2): 2003198.
- [10] 张丽雯, 李优优, 姜东华, 等. 基于网络药理学和生物信息学探讨小檗胺治疗特发性肺纤维化的作用机制 [J]. *现代药物与临床*, 2025, 40(4): 878-888.
- [11] Zhang Y K, Lu P, Qin H, *et al*. Traditional Chinese medicine combined with pulmonary drug delivery system and idiopathic pulmonary fibrosis: Rationale and therapeutic potential [J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 133: 111072.
- [12] 马玉玮, 李占涛, 贾孟辉, 等. 麻黄-苦杏仁药对通过调控巨噬细胞极化和 PI3K/Akt/mTOR 通路缓解急性肺损伤 [J]. *中草药*, 2025, 56(20): 7407-7421.
- [13] 韩兴稷, 焦太强, 高晨曦, 等. 基于 TGF- β /Smad 信号通路探讨麻杏苦甘汤对急性肺损伤大鼠肺纤维化的影响 [J]. *中成药*, 2025, 47(12): 3943-3950.
- [14] 罗浩睿, 庄雪菲, 李曦东 等. 黄连-苦参不同配比中特征性成分的量-质变化相关性研究 [J]. *中草药*, 2024, 55(12): 3977-3986.
- [15] 孙翠鸽, 郑潇楠, 邸晴, 等. 苦杏仁成分及其在肺癌防治中的靶点预测研究进展 [J]. *药学前沿*, 2025, 29(10): 1738-1747.
- [16] Feldstein A E, Papouchado B G, Angulo P, *et al*. Hepatic stellate cells and fibrosis progression in patients with nonalcoholic fatty liver disease [J]. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2005, 3(4): 384-389.
- [17] 赵鑫, 吕文良, 李娟梅, 等. 苦杏仁苷抗纤维化作用机制研究进展 [J]. *中华中医药学刊*, 2020, 38(10): 109-112.
- [18] 刘梦肖, 陈林林, 王彦, 等. 中药苦参的研究进展 [J]. *药学实践与服务*, 2025, 43(4): 156-162.
- [19] Fu L Y, Xu Y N, Tu L, *et al*. Oxymatrine inhibits aldosterone-induced rat cardiac fibroblast proliferation and differentiation by attenuating smad-2, -3 and -4 expression: An *in vitro* study [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2016, 16: 241.
- [20] Liu L, Lu W, Ma Z, *et al*. Oxymatrine attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice via the inhibition of inducible nitric oxide synthase expression and the TGF- β /Smad signaling pathway [J]. *Int J Mol Med*, 2012, 29(5): 815-822.
- [21] Fuentes-Calvo I, Martinez-Salgado C. Sos1 modulates extracellular matrix synthesis, proliferation, and migration in fibroblasts [J]. *Front Physiol*, 2021, 12: 645044.
- [22] 安宁, 许涛, 张晓霞, 等. Mfn2 通过 Ras-Raf-ERK1/2 信号通路抑制 ARDS 肺纤维化及其机制 [J]. *中国老年学杂志*, 2024, 44(1): 217-220.
- [23] Liu T J, De Los Santos F G, Phan S H. The bleomycin model of pulmonary fibrosis [M] // Laure R. *Fibrosis*. New York, NY: Springer New York, 2017: 27-42.
- [24] Zuo H, Zhou W T, Zhou B Q, *et al*. CCDC59 alleviates bleomycin-induced inflammation and pulmonary fibrosis by increasing SP-B and SP-C expression in mice [J]. *Int Immunopharmacol*, 2024, 138: 112645.
- [25] Du W J, Tang Z, Yang F Y, *et al*. Icaritin attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis by targeting Hippo/YAP pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 143: 112152.
- [26] Cheng D M, Xu Q, Wang Y, *et al*. Metformin attenuates silica-induced pulmonary fibrosis via AMPK signaling [J]. *J Transl Med*, 2021, 19(1): 349.
- [27] 李家树, 史家欣, 胡蓉, 等. 敲低金属蛋白酶组织抑制物 1 (TIMP-1) 抑制 TGF- β 1 诱导的 MRC-5 人胚肺成纤维细胞增殖和胶原蛋白合成 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2019, 35(1): 25-30.
- [28] Cargnello M, Roux P P. Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases [J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2011, 75(1): 50-83.
- [29] Kang H. Role of microRNAs in TGF- β signaling pathway-mediated pulmonary fibrosis [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(12): 2527.
- [30] Tian M M, Chang X H, Zhang Q, *et al*. TGF- β 1 mediated MAPK signaling pathway promotes collagen formation induced by Nano NiO in A549 cells [J]. *Environ Toxicol*, 2019, 34(6): 719-727.
- [31] Liu T J, Gonzalez De Los Santos F, Hirsch M, *et al*. Noncanonical Wnt signaling promotes myofibroblast differentiation in pulmonary fibrosis [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2021, 65(5): 489-499.
- [32] Mirzaei S, Saghari S, Bassiri F, *et al*. NF- κ B as a regulator of cancer metastasis and therapy response: A focus on epithelial-mesenchymal transition [J]. *J Cell Physiol*, 2022, 237(7): 2770-2795.
- [33] Lu F Q, Sun X H, Xu X F, *et al*. SILAC-based proteomic profiling of the suppression of TGF- β 1-induced lung fibroblast-to-myofibroblast differentiation by trehalose [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2020, 391: 114916.
- [34] Xu J F, Li W, Xu S F, *et al*. Effect of dermatan sulphate on a C57-mouse model of pulmonary fibrosis [J]. *J Int Med Res*, 2019, 47(6): 2655-2665.
- [35] Mebratu Y, Tesfagzi Y. How ERK1/2 activation controls cell proliferation and cell death: Is subcellular localization the answer? [J]. *Cell Cycle*, 2009, 8(8): 1168-1175.
- [36] Grogan L, Shapiro P. Progress in the development of ERK1/2 inhibitors for treating cancer and other diseases [J]. *Adv Pharmacol*, 2024, 100: 181-207.
- [37] Roskoski R Jr. ERK1/2 MAP kinases: Structure, function,

- and regulation [J]. *Pharmacol Res*, 2012, 66(2): 105-143.
- [38] 纪文雯, 何程, 朱恩惠, 等. 基于 ASS1 介导的 Src/STAT3、MAPK/ERK 级联反应探究参七虫草方对 IPF 模型大鼠成纤维细胞的影响 [J]. 辽宁中医杂志, 2025, 52(9): 192-196.
- [39] Wang M L, Pan W, Xu Y, *et al.* Microglia-mediated neuroinflammation: A potential target for the treatment of cardiovascular diseases [J]. *J Inflamm Res*, 2022, 15: 3083-3094.
- [40] Sun X J, Zhao J W, Ma Y T, *et al.* Combatting pulmonary fibrosis with *Astragalus membranaceus*: A review of active components and multifaceted mechanisms [J]. *Chin Herb Med*, 2026, 18(3): 541-554.
- [41] Reyes-Jiménez E, Ramírez-Hernández A A, Santos-Álvarez J C, *et al.* Coadministration of 3',5'-dimaleamylbenzoic acid and quercetin decrease pulmonary fibrosis in a systemic sclerosis model [J]. *Int Immunopharmacol*, 2023, 122: 110664.
- [42] Conte E, Gili E, Fruciano M, *et al.* PI3K p110 γ overexpression in idiopathic pulmonary fibrosis lung tissue and fibroblast cells: *In vitro* effects of its inhibition [J]. *Lab Investig*, 2013, 93(5): 566-576.
- [43] Dragunow M, Preston K. The role of inducible transcription factors in apoptotic nerve cell death [J]. *Brain Res Brain Res Rev*, 1995, 21(1): 1-28.
- [44] 亓永杰, 陈晨, 李学军, 等. 吡非尼酮联合尼达尼布治疗特发性肺间质纤维化的疗效及安全性 [J]. 中国老年学杂志, 2024, 44(20): 4937-4941.
- [45] 宋宁, 段林, 贺文舒. 特发性肺间质纤维化的全球发病率和病死率 [J]. 临床荟萃, 2015, 30(7): 744.
- [46] 陈军, 杜晓楠, 徐仕宏. 基于网络药理学探讨桃红化瘀方治疗肺纤维化机制 [J]. 光明中医, 2024, 39(13): 2551-2555.
- [47] 王昊, 宋莉莎, 周佩夏, 等. 从“湿热”辨治特发性肺纤维化探析 [J]. 中医药临床杂志, 2024, 36(9): 1710-1714.
- [48] 陈凤, 张伟, 杨公涛. 基于细胞自噬论“伏毒”的微观机制及在特发性肺纤维化中的作用 [J]. 世界中医药, 2021, 16(18): 2742-2746.
- [49] 任玥, 王燕青, 胡海波. 肺间质纤维化患者的出生日期与五运六气相关性分析 [J]. 中医药临床杂志, 2019, 31(8): 1487-1490.

[责任编辑 李亚楠]