

- [20] XIAO L, LIU L, GUO X, et al. Quercetin attenuates high fat diet-induced atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice: A critical role of NADPH oxidase. *Food Chem Toxicol*, 2017, 105: 22–33
- [21] BAUERMEISTER A, MANNOCHIO-RUSSO H, COSTA-LOTUFO L V, et al. Mass spectrometry-based metabolomics in microbiome investigations. *Nat Rev Microbiol*, 2022, 20(3): 143–160
- [22] STORCH J, CORSICO B. The emerging functions and mechanisms of mammalian fatty acid-binding proteins. *Annu Rev Nutr*, 2008, 28: 73–95
- [23] YANG S, WU H, LI Y, et al. Inhibition of PFKP in renal tubular epithelial cell restrains TGF- β induced glycolysis and renal fibrosis. *Cell Death Dis*, 2023, 14(12): 816
- [24] 吕婕, 朱永俊, 林子艳, 等. 巨噬细胞代谢重编程在慢性肾脏病炎症损伤中的研究. *临床肾脏病杂志*, 2024, 24(5): 417–421
- [25] SEMENZA G L. Regulation of mammalian O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 1999, 15: 551–578
- [26] ZHANG Y, ZHU L, LI X, et al. M2 macrophage exosome-derived lncRNA AK083884 protects mice from CVB3-induced viral myocarditis through regulating PKM2/HIF-1 α axis mediated metabolic reprogramming of macrophages. *Redox Biol*, 2024, 69: 103016
- [27] TU C, WANG L, WEI L. The role of PKM2 in diabetic microangiopathy. *Diabetes Metab Syndr Obes*, 2022, 15: 1405–1412
- [28] ZHAO H, JIANG N, HAN Y, et al. Aristolochic acid induces renal fibrosis by arresting proximal tubular cells in G₂/M phase mediated by HIF-1 α . *FASEB J*, 2020, 34(9): 12599–12614
- [29] DING H, JIANG L, XU J, et al. Inhibiting aerobic glycolysis suppresses renal interstitial fibroblast activation and renal fibrosis. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2017, 313(3): F561–F575
- [30] LIU X Y, ZHANG F R, SHANG J Y, et al. Renal inhibition of miR-181a ameliorates 5-fluorouracil-induced mesangial cell apoptosis and nephrotoxicity. *Cell Death Dis*, 2018, 9(6): 610
- [31] QIAN L, REN S, XU Z, et al. Qian Yang Yu Yin Granule improves renal injury of hypertension by regulating metabolic reprogramming mediated by HIF-1 α /PKM2 positive feedback loop. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 667433
- [32] HOSNY G, ISMAIL W, MAKBOUL R, et al. Increased glomerular Bax/Bcl2 ratio is positively correlated with glomerular sclerosis in lupus nephritis. *Pathophysiology*, 2018, 25(2): 83–88
- [33] 苗芷若. SelenoW靶向PKM2-HIF-1 α 信号调控小鼠HFD性脂肪肝作用机制的研究. 哈尔滨: 东北农业大学, 2021

(收稿日期: 2024年12月18日)

论著·卓越

基于“大气理论”研究升陷汤调控铁自噬介导的铁死亡途径改善特发性肺纤维化大鼠肺功能机制

闫亚男¹, 方芳^{1,2}, 王浩^{2,3}, 郝瑞文¹, 李伟¹, 唐禹为¹, 王杰鹏^{1,2}, 方朝义^{1,2}(¹河北中医药大学, 石家庄 050200; ²河北省中西医结合肺病研究重点实验室, 石家庄 050091;³河北中医药大学第一附属医院, 石家庄 050011)

摘要: 目的: 基于铁自噬介导的铁死亡途径探讨升陷汤对特发性肺纤维化(IPF)大鼠肺功能的影响, 揭示“大气理论”辨治IPF的科学意义。方法: 将48只SPF级大鼠随机分为假手术组、模型组、升陷汤组、尼达尼布组。气管内滴注博来霉素(5 mg/kg)制备IPF大鼠模型。造模次日起, 两用药组分别以0.81、0.1 g/kg灌胃升陷汤中药配方颗粒和尼达尼布水溶液, 模型组和假手术组均以去离子水(10 mL/kg)灌胃, 日1次, 连续28 d。行肺

基金资助: 中央引导地方科技发展资金项目(No.206Z7704G), 河北省自然科学基金项目(No.H2022423309, No.H2023423061), 河北省中医药管理局科研计划项目(No.Z2022002), 河北中医学院燕赵医学研究项目(No.YZZZ2023001), 河北省高等学校科学技术研究项目(No.QN2024023, No.QN2021108), 国家级大学生创新创业训练计划项目(No.202314432009)

通信作者: 方朝义, 河北省石家庄市鹿泉区杏苑路3号河北中医药大学中医诊断学教研室, 邮编: 050200, 电话: 0311-89926698

E-mail: hbfey@163.com

王杰鹏, 河北省石家庄市鹿泉区杏苑路3号河北中医药大学中医诊断学教研室, 邮编: 050200, E-mail: hbzyxywjp@163.com

功能检测后,取肺组织。HE和Masson染色观察肺组织病理形态特征并行Szapiel和Ashcroft评分;Western Blot检测间充质标志物 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)和波形蛋白(Vimentin)表达,评估肺纤维化程度;比色法检测肺组织 Fe^{2+} 、丙二醛(MDA)含量和超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性,评价铁死亡情况;Western Blot检测铁自噬相关指标核受体共激活因子4(NCOA4)、腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)、苡氯素1(Beclin1)和铁死亡相关指标溶质载体家族7成员11(SLC7A11)、铁蛋白重链1(FTH1)、谷胱甘肽过氧化物酶4(GPX4)蛋白表达。结果:与假手术组比较,模型组大鼠呼吸频率(f)显著升高($P<0.01$),最大呼气流速(PEF)、每分钟通气量(MV)显著降低($P<0.01$);Szapiel评分、Ashcroft评分显著升高($P<0.01$); α -SMA、Vimentin蛋白水平显著升高($P<0.01$); Fe^{2+} 、MDA含量显著升高($P<0.01$),SOD、GSH-Px活性显著降低($P<0.01$);NCOA4、AMPK、Beclin1蛋白表达显著升高($P<0.01$),SLC7A11、GPX4、FTH1蛋白表达显著降低($P<0.01$)。与模型组比较,升降汤组大鼠f显著降低($P<0.01$),PEF、MV显著升高($P<0.01$);Szapiel评分、Ashcroft评分显著降低($P<0.05$, $P<0.01$); α -SMA、Vimentin蛋白表达显著降低($P<0.01$); Fe^{2+} 、MDA含量降低($P<0.05$, $P<0.01$),SOD、GSH-Px活性显著升高($P<0.01$, $P<0.05$);NCOA4、AMPK、Beclin1蛋白表达显著降低($P<0.05$),SLC7A11、GPX4、FTH1蛋白表达显著升高($P<0.01$, $P<0.05$)。结论:大气下陷是IPF肺功能障碍的重要机制,铁自噬介导的铁死亡参与了这一过程;升降汤可通过调控铁自噬介导的铁死亡途径对IPF肺功能产生保护作用。

关键词: 特发性肺纤维化;铁自噬;铁死亡;肺功能;大气下陷;升降汤;机制

Study on mechanism of iron autophagy-ferroptosis pathway regulated by Shengxian Decoction based on 'Da qi theory' to improve lung function in rat with idiopathic pulmonary fibrosis

YAN Yanan^{1,2}, FANG Fang^{1,2}, WANG Hao^{2,3}, HAO Ruiwen¹, LI Wei¹, TANG Yuwei¹,
WANG Jiepeng^{1,2}, FANG Chaoyi^{1,2}

(¹Hebei University of Chinese Medicine, Shijiazhuang 050200, China; ²Hebei Key Laboratory of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine for Lung Disease Research, Shijiazhuang 050091, China; ³The First Affiliated Hospital of Hebei University of Chinese Medicine, Shijiazhuang 050011, China)

Abstract: Objective: To observe the changes of lung function in rats with idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) under the regulation of iron autophagy-ferroptosis pathway by Shengxian Decoction, and revealing the scientific significance of IPF under the guidance of the 'Da qi theory'. Methods: Forty-eight SPF rats were randomly divided into Sham group, Model group, Nintedanib group, and Shengxian Decoction group. Intratracheal drip Bleomycin (5 mg/kg) was used in order to prepare a rat model of IPF. Starting from the next day of modeling, the rats of Shengxian Decoction group were gavaged with an aqueous solution of Shengxian Decoction Chinese medicine granules (0.81 g/kg), the rats of Nintedanib group were gavaged with an aqueous solution of Nintedanib (0.1 g/kg), the rats of Model group and Sham group were gavaged with physiological saline solution (10 mL/kg), once a day for 28 consecutive days. Lung function was detected by awake and unrestrained animal lung function test system; pathomorphologic change in lung tissue was observed by HE and Masson staining; the expressions of α -smooth muscle actin (α -SMA) and Vimentin were detected by Western Blot to assess the degree of lung tissue fibrosis; the contents of Fe^{2+} , malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD), and glutathione peroxidase (GSH-Px) were detected by chemiluminescence assay, and the expressions of solute carrier family 7 member 11 (SLC7A11), ferritin heavy chain 1 (FTH1), glutathione peroxidase 4 (GPX4) were detected by Western Blot, in order to observe the changes in ferroptosis of lung tissues; the expressions of nuclear receptor coactivator 4 (NCOA4), adenylate-activated protein kinase (AMPK), and Beclin1 were detected by Western Blot to observe the changes of iron autophagy in lung tissues. Results: Compared with the Sham group, the lung function indexes of rats in Model group significantly increased respiratory frequency (f) ($P<0.01$), and peak expiratory flow (PEF) and minute ventilation volume (MV) were significantly decreased ($P<0.01$); the lung tissue Szapiel score and Ashcroft score were significantly higher ($P<0.01$); the lung fibrosis indexes of α -SMA and Vimentin were significantly increased ($P<0.01$); Fe^{2+} , MDA content were significantly increased ($P<0.01$), SOD, GSH-Px activitve were significantly decreased ($P<0.01$); the expression of NCOA4, AMPK, Beclin1 protein were significantly increased ($P<0.01$); the expression of SLC7A11, GPX4, FTH1 protein were significantly decreased ($P<0.01$). Compared with Model group, the lung function indexes of rats in Shengxian Decoction group, f was significantly decreased ($P<0.01$), PEF, MV were significantly increased ($P<0.01$); Szapiel score and Ashcroft score were significantly decreased ($P<0.05$, $P<0.01$); α -SMA, Vimentin were significantly decreased ($P<0.01$); Fe^{2+} , MDA content

were significantly decreased ($P<0.05$, $P<0.01$), SOD and GSH-Px active were significantly increased ($P<0.01$, $P<0.05$); the expression of NCOA4, AMPK, Beclin1 protein significantly decreased ($P<0.05$); the expression of SLC7A11, GPX4, FTH1 protein significantly increased ($P<0.01$, $P<0.05$). Conclusion: Qi subsidence is an important mechanism of pulmonary dysfunction in IPF, and iron atophagy-ferroptosis pathway is involved in this process; Shengxian Decoction may exert a protective effect on pulmonary function in IPF by regulating the iron atophagy-ferroptosis pathway.

Keywords: Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF); Iron atophagy; Ferroptosis; Lung function; Qi subsidence; Shengxian Decoction; Mechanism

特发性肺纤维化(idiopathic pulmonary fibrosis, IPF)是一种以呼吸困难、肺功能进行性减退为主要临床症状的慢性肺间质疾病,患者常因呼吸衰竭而死亡^[1]。流行病学研究显示,全球范围内IPF发病率和患病率呈逐年上升趋势,且尚无理想的治疗策略^[2]。因此,改善IPF患者肺功能障碍,提高患者生活质量成为重要的研究课题。中医药治疗IPF疗效肯定^[3],但致病机制其说不一。张锡纯描述的大气下陷“气短不足以息,或努力呼吸,有似乎喘,或呼吸将停,危在顷刻”之候,与IPF呼吸困难、肺功能障碍临床特征颇相类似,此为揭示IPF发病机制并开辟新的诊疗路径提供了新的思路。

研究显示,具有益气升陷功效的升陷汤可改善IPF患者肺功能,提升其生活质量^[4]。课题组前期研究亦表明,升陷汤可通过泛凋亡和细胞衰老途径改善IPF大鼠肺功能^[5-6]。研究证实,铁死亡在IPF病理进程中发挥着重要作用,调控铁死亡被认为是延缓IPF病理进程的潜在途径^[7]。作为一种铁依赖性的细胞死亡方式,其以 Fe^{2+} 和脂质过氧化物积累为主要特征^[8]。铁自噬在调节铁离子稳态中具有重要意义,其可通过降解铁蛋白,增加 Fe^{2+} 浓度诱导铁死亡^[9]。那么,升陷汤是否可通过作用于铁自噬介导的铁死亡途径从而抑制IPF病理进程并影响肺功能?“大气下陷”能否作为IPF发生的内在机制?以上均未见相关报道。

本研究以博来霉素诱导IPF模型,检测铁死亡和铁自噬相关指标,并以具有益气升陷功效的升陷汤为干预用药,观察其调控铁自噬介导的铁死亡途径过程中IPF大鼠肺功能的变化特征,揭示IPF可能的形成机制,以期在“大气”理论指导下,丰富中医药肺脏病证研究的科学内涵。

材料与方法

1. 动物 SPF级雄性SD大鼠48只,6~8周龄,体重180~200 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,生产许可证号:SCXK(京)2021-0011。大鼠饲养于河北中医药大学实验动物中心,饲养条件:温

度20~24℃、湿度40%~60%、12 h/12 h光照黑暗交替,自由进食水。本研究经河北中医药大学实验动物管理与伦理委员会审核(批号:DWLL202205002)。

2. 药物与试剂 升陷汤方[黄芪3.6 g(批号:A2102113,1 g配方颗粒相当于5 g饮片)、知母2.25 g(批号:A3020463,1 g配方颗粒相当于4 g饮片)、柴胡0.52 g(批号:A21212333,1 g配方颗粒相当于8.6 g饮片)、桔梗1.125 g(批号:A3020673,1 g配方颗粒相当于4 g饮片)、升麻0.25 g(批号:A3011173,1 g配方颗粒相当于12 g饮片)]均购自广东一方制药有限公司;注射用盐酸博来霉素(瀚晖制药有限公司,批号:20067411);乙磺酸尼达尼布软胶囊(石药集团恩必普药业有限公司,批号:H20213164)。

Fe^{2+} 、丙二醛(malondialdehyde, MDA)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)测定试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号:A039-2-1、A003-2、A001-3、A005-1);溶质载体家族7成员11(solute carrier family 7 member 11, SLC7A11)、铁蛋白重链1(ferritin heavy chain 1 gene, FTH1)、腺苷酸活化蛋白激酶(adenosine monophosphate activated protein kinase, AMPK)抗体(英国abcam公司,货号:ab307601、ab75973、ab32047);核受体共激活因子4(nuclear receptor coactivator 4, NCOA4)抗体(美国Invitrogen公司,货号:PA5-115626);苜氯素1(Beclin1)抗体(美国Bioworld Technology公司,货号:AP6020); α -平滑肌肌动蛋白(alpha-smooth muscle actin, α -SMA)抗体(美国Thermo Fisher公司,货号:701457);谷胱甘肽过氧化物酶4(glutathione peroxidase 4, GPX4)、3-磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)抗体(江苏亲科生物研究中心有限公司,货号:DF6701、AF7021);波形蛋白(Vimentin)抗体、辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗兔免疫球蛋白G(IgG)抗体(上海Abways公司,货号:CY5134、AB0101)。

3. 仪器 WBP-RT4型清醒无束缚肺功能检测系统(法国EMKA公司); Plus384型酶标仪(美国Molecular Devices公司); BX53型光学显微镜(日本Olympus公司); Chemic Doc型超高灵敏化学发光成像系统(美国Bio-Rad公司)。

4. 造模、分组与给药 大鼠适应性喂养1周后, 随机分为假手术组、模型组、模型+升陷汤组(以下简称升陷汤组)、模型+尼达尼布组(以下简称尼达尼布组), 每组12只。根据文献[10], 气管内一次性滴注博来霉素制备IPF模型: 以2%戊巴比妥钠(4 mg/kg)麻醉大鼠, 并固定于解剖板, 暴露气管后经环状软骨间隙注入0.9%氯化钠溶解的博来霉素(5 mg/kg), 假手术组滴注等容量0.9%氯化钠溶液。操作结束后, 将大鼠直立并进行旋转。造模24 h后灌胃。依据文献[11]和前期工作基础^[5-6], 升陷汤组以中药配方颗粒水溶液(0.81 g/kg, 相当于4.06 g/kg生药量)灌胃, 尼达尼布组以尼达尼布水溶液(0.1 g/kg)灌胃, 模型组和假手术组大鼠予以等容量去离子水(10 mL/kg)灌胃, 每日1次, 连续28 d。

5. 观察指标与检测方法

5.1 一般状态观察 观察各组大鼠精神状态、活动状态、呼吸情况等一般表征和生存率。

5.2 肺功能检测 实验第28天, 根据文献[12], 采用清醒无束缚肺功能检测系统检测大鼠肺功能。检测指标包括呼吸频率(frequency, f)、最大呼气流量(peak expiratory flow, PEF)、每分钟通气量(minute ventilation volume, MV)。

5.3 肺组织病理形态特征观察 行肺功能检测结束后, 大鼠以2%戊巴比妥钠(4 mg/kg)腹腔注射麻醉, 断头处死, 取肺组织, 经固定、石蜡包埋, 制成4 μ m切片, 分别行HE和Masson染色, 并根据文献[13-14], 分别采用Szapiel评分系统和Ashcroft评分系统, 评定肺组织炎症损伤和纤维化程度。

5.4 肺组织铁死亡检测 依据试剂盒说明书, 采用比色法检测大鼠肺组织Fe²⁺、MDA含量和SOD、GSH-Px活性。

5.5 Western Blot检测肺组织间充质、铁自噬、铁死亡相关指标表达情况 取50 mg肺组织, 经裂解后, 提取总蛋白, BCA法测定蛋白浓度。取20~30 μ g样本蛋白经变性后, 行SDS-PAGE电泳并转膜、封闭, 滴加稀释的一抗(α -SMA稀释比例为1:500,

Vimentin、NCOA4、AMPK、Beclin1、SLC7A11、FTH1、GPX4稀释比例均为1:1 000, GAPDH稀释比例为1:5 000), 4 $^{\circ}$ C孵育过夜, 加入二抗(稀释比例均为1:10 000), 显色后, 超高灵敏化学发光成像系统成像, Image J软件分析蛋白条带灰度值, 计算目的蛋白相对表达量(目的蛋白相对表达量=目的蛋白灰度值/GAPDH灰度值)。

6. 统计学方法 采用SPSS 26.0软件对实验数据进行统计分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。若数据满足正态性和方差齐性, 组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA), 两两比较采用Bonferroni法; 若数据满足正态性, 方差不齐时, 两两比较采用Tamhane's T2检验; 若数据不满足正态性, 则采用非参数检验中的多个独立样本Kruskal-Wallis H检验。设定检验水准 $\alpha=0.05$ 。

结果

1. 各组大鼠一般状态观察及生存率变化 术后第1天, 各组大鼠均现精神委顿, 活动度少, 懒动蜷卧, 呼吸急促, 频率加快。假手术组在第4天后恢复至造模前状态, 精神状态良好, 活动度如常, 反应灵敏, 呼吸平稳。模型组逐渐出现精神呆顿, 目光少采, 造模后期伴见哮鸣音。升陷汤组大鼠造模14 d后, 总体状态渐趋改善, 精神状态渐佳, 活动度增加, 但呼吸仍较急促。实验过程中, 共计脱落12只大鼠, 其中, 模型组于第2、4、7、8、11天各脱落1只; 升陷汤组于第2、4天脱落各1只, 第5天脱落2只; 尼达尼布组于第2、4、6天各脱落1只。统计各组大鼠的生存率, 结果见图1, 假手术组为100%, 模型组为58%, 尼达尼布组为75%, 升陷汤组为67%。

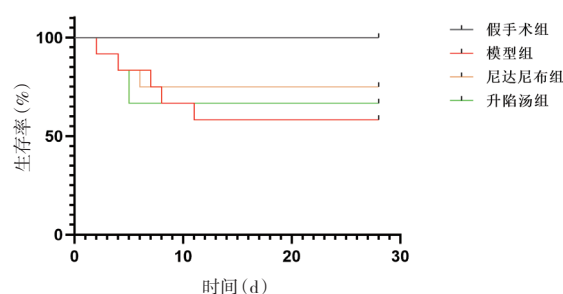


图1 各组大鼠生存率变化

2. 各组大鼠肺功能变化 见表1。与假手术组比较, 模型组大鼠f显著升高, PEF、MV显著降低($P<0.01$); 与模型组比较, 两给药组大鼠f显著降低, PEF、MV显著升高($P<0.01$)。

表1 各组大鼠肺功能变化情况($\bar{x} \pm s$)

组别	n	f (bpm)	PEF (mL/s)	MV (mL)
假手术组	12	153.09±19.90	23.35±2.87	327.95±20.89
模型组	7	408.34±14.47**	12.17±1.55**	206.60±12.08**
尼达尼布组	9	343.20±22.78 ^{△△}	17.71±1.26 ^{△△}	272.36±16.37 ^{△△}
升陷汤组	8	331.18±12.71 ^{△△}	19.17±2.19 ^{△△}	275.73±16.78 ^{△△}

注:与假手术组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,[△] $P<0.05$,^{△△} $P<0.01$ 。下表同。

3. 各组大鼠肺组织病理形态改变 见图2,表2。假手术组大鼠肺组织形态结构清晰,未见炎症细胞浸润和胶原纤维沉积;模型组大鼠肺泡结构塌陷、萎缩,部分肺泡融合,肺泡间隔明显增宽,出现炎症细胞浸润和成条索状分布的蓝色胶原纤维沉积,Szapiel评分、Ashcroft评分较假手术组显著升高($P<0.01$)。两给药组大鼠肺组织炎症细胞浸润和胶原纤维沉积程度明显减轻,Szapiel评分、Ashcroft评分较模型组显著降低($P<0.05$, $P<0.01$)。

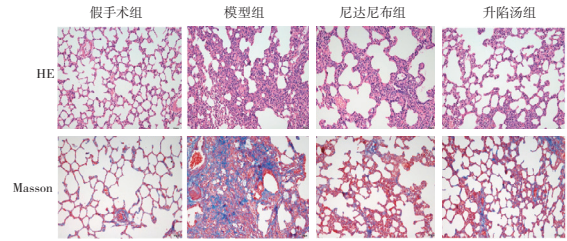


图2 各组大鼠肺组织病理形态观察($\times 200$)

表2 各组大鼠Szapiel评分、Ashcroft评分比较($\bar{x} \pm s$,分)

组别	n	Szapiel评分	Ashcroft评分
假手术组	12	0.75±0.75	1.25±1.06
模型组	7	2.71±0.49**	7.14±0.69**
尼达尼布组	9	1.44±0.89 [△]	3.78±1.48 ^{△△}
升陷汤组	8	1.38±0.92 [△]	4.25±1.39 ^{△△}

4. 各组大鼠肺组织间充质标志物 α -SMA和Vimentin表达情况 见图3,表3。与假手术组比较,模型组大鼠肺组织 α -SMA和Vimentin蛋白表达水

平显著升高($P<0.01$);与模型组比较,两给药组大鼠肺组织 α -SMA和Vimentin蛋白表达水平显著降低($P<0.01$)。

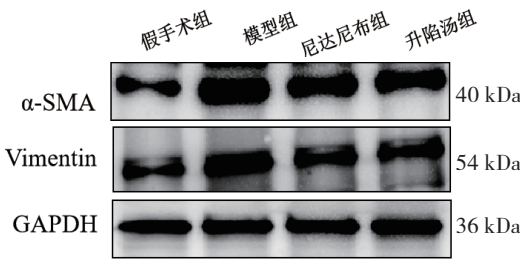


图3 各组大鼠肺组织 α -SMA和Vimentin蛋白表达条带

表3 各组大鼠肺组织 α -SMA和Vimentin蛋白相对表达情况比较($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	α -SMA/GAPDH	Vimentin/GAPDH
假手术组	1.06±0.12	0.92±0.17
模型组	2.40±0.15**	1.94±0.13**
尼达尼布组	1.38±0.07 ^{△△}	1.36±0.20 ^{△△}
升陷汤组	1.43±0.09 ^{△△}	1.32±0.10 ^{△△}

5. 各组大鼠肺组织 Fe^{2+} 、MDA含量及SOD、GSH-Px活性比较情况 见表4。与假手术组比较,模型组大鼠肺组织 Fe^{2+} 、MDA含量显著升高,SOD、GSH-Px活性显著降低($P<0.01$);与模型组比较,两给药组大鼠肺组织 Fe^{2+} 、MDA含量显著降低,SOD、GSH-Px活性显著升高($P<0.05$, $P<0.01$)。

6. 各组大鼠肺组织铁自噬相关指标NCOA4、AMPK、Beclin1表达情况 见图4,表5。与假手术组比较,模型组大鼠肺组织NCOA4、AMPK、Beclin1蛋白表达水平显著升高($P<0.01$);与模型组比较,两给药组大鼠肺组织NCOA4、AMPK、Beclin1蛋白表达水平显著降低($P<0.05$)。

7. 各组大鼠肺组织铁死亡相关指标SLC7A11、FTH1、GPX4表达情况 见图5,表6。与假手术组比较,模型组大鼠肺组织SLC7A11、GPX4、FTH1蛋白表达水平显著降低($P<0.01$);与模型组比较,两给

表4 各组大鼠肺组织 Fe^{2+} 、MDA含量及SOD、GSH-Px活性比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Fe^{2+} (μ mol/gpro)	MDA (nmol/g)	SOD (U/mgprot)	GSH-Px (U/mgprot)
假手术组	12	3.45±0.55	1.01±0.16	29.15±1.94	183.04±24.43
模型组	7	4.74±0.44**	1.62±0.14**	17.71±2.29**	108.63±13.24**
尼达尼布组	9	3.95±0.17 [△]	1.30±0.15 ^{△△}	23.68±2.42 ^{△△}	141.05±23.87 [△]
升陷汤组	8	3.99±0.10 [△]	1.26±0.18 ^{△△}	23.16±2.21 ^{△△}	143.62±10.47 [△]

药组大鼠肺组织SLC7A11、GPX4、FTH1蛋白表达水平显著升高 ($P<0.05$, $P<0.01$)。

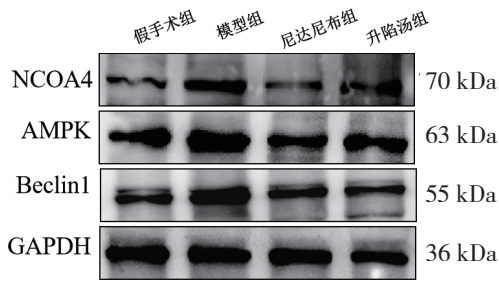


图4 各组大鼠肺组织铁自噬相关指标NCOA4、AMPK、Beclin1蛋白表达条带

表5 各组大鼠肺组织NCOA4、AMPK、Beclin1蛋白相对表达情况比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	NCOA4/ GAPDH	AMPK/ GAPDH	Beclin1/ GAPDH
假手术组	0.44±0.05	0.58±0.24	0.52±0.04
模型组	0.95±0.22**	1.65±0.42**	1.31±0.30**
尼达尼布组	0.53±0.13 [△]	0.79±0.13 [△]	0.72±0.05 [△]
升陷汤组	0.54±0.06 [△]	0.79±0.18 [△]	0.75±0.06 [△]

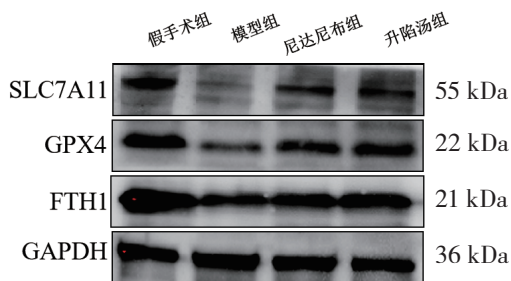


图5 各组大鼠肺组织铁死亡相关指标SLC7A11、GPX4、FTH1蛋白表达条带

表6 各组大鼠肺组织SLC7A11、GPX4、FTH1蛋白相对表达情况比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	SLC7A11/ GAPDH	GPX4/ GAPDH	FTH1/ GAPDH
假手术组	0.92±0.13	1.52±0.12	2.34±0.40
模型组	0.28±0.03**	0.51±0.14**	0.80±0.05**
尼达尼布组	0.57±0.08 [△]	1.02±0.13 [△]	1.52±0.24 [△]
升陷汤组	0.64±0.04 ^{△△}	0.94±0.16 [△]	1.53±0.11 [△]

讨论

张锡纯宗《黄帝内经》“大气举之也”之述，提出大气乃“宗气”“胸中之气”，其“以元气为根本，以水谷之气为养料，以胸中之地为宅窟”“能斡旋全身，为诸气之纲领；包举肺外，司呼吸之枢机”。若大

气虚极，则不执其功，“无气包举肺外以鼓动其翕辟之机”，故而出现“人觉有胸中之内气与呼吸之外气不相续接”“喘不觉吸气难而转觉呼气难”的大气下陷之征，此象与IPF肺功能进行性减退和呼吸衰竭等相合，这为从益气升陷角度论治IPF肺功能障碍提供了重要理论依据。本研究结果显示，IPF大鼠呈现f加快、PEF和MV降低，结合前期研究IPF大鼠呼吸系统阻力、主气道阻力、组织弹性和呼吸系统弹性升高以及呼吸顺应性、组织衰减降低^[15]等表现，说明IPF大鼠彰显出“此气一虚，呼吸即觉不利”的大气下陷之候，亦表明胸中“大气下陷”当为IPF发生的病机枢要。

升陷汤为张锡纯所制用于胸中大气下陷的代表方剂。其方由黄芪、知母、柴胡、桔梗、升麻组成。方中重用黄芪为君，“既善补气，又善升气，且其质轻松，中含氧气，与胸中大气有同气相求之妙用”；柴胡、升麻共用为臣，升阳举陷以助黄芪升举之力；凉润之知母为佐，可制黄芪之温燥；桔梗用为使，入胸中肺经，可载药上行，直达病所。诸药合用，虽药少但益气升陷之力宏。本研究结果显示，升陷汤可降低f、升高PEF和MV，说明升陷汤对IPF大鼠肺功能具有显著的保护作用。

新近研究显示，铁自噬介导的铁死亡是IPF重要的病理机制^[16]，这为靶向抑制IPF病理进程、改善IPF肺组织损伤和肺功能提供新的工作思路。自噬是由溶酶体介导，通过降解受损的细胞器和大分子来维持细胞稳态的过程^[17]。自噬的缺失会加快肺泡上皮细胞的衰老、加速成纤维细胞向肌成纤维分化，进而促进肺纤维化的发展^[18]；铁自噬的过度激活，引起上皮间质转化，从而加重肺纤维化^[19]。铁自噬是一种选择性自噬，利用自噬小体表面的NCOA4识别铁蛋白上的FTH1，并将其转移至自噬小体，之后被溶酶体降解，释放Fe²⁺进而诱导铁死亡。Beclin1是自噬关键调节因子，System Xc⁻/GPX4途径是调控铁死亡的经典途径，Beclin1可作为System Xc⁻抑制剂，由其上游分子AMPK于Beclin1的Ser90/93/96位点磷酸化后所激活，与System Xc⁻核心蛋白成分SLC7A11形成Beclin1-SLC7A11复合物，直接抑制System Xc⁻活性，促进细胞铁死亡^[20-22]。同时，SLC7A11还能与下游GPX4结合，促进GPX4的表达，抑制脂质过氧化氢的积累进而减轻铁死亡^[23]。GPX4是铁死亡重要的抑制因子，当GPX4失活时，细胞内有害的氧化物尤其是脂质过氧化物和氧化应激产物不能被及时清除，

进而诱导脂质过氧化和氧化应激进而导致铁死亡的发生^[24-25]。本研究结果显示,升陷汤可抑制铁自噬蛋白NCOA4、AMPK、Beclin1的表达,升高铁死亡蛋白SLC7A11、GPX4、FTH1的表达,说明升陷汤对IPF大鼠肺功能产生保护作用的环节可能是通过调节铁自噬介导的铁死亡实现。

不难看出,“大气理论”源于《黄帝内经》,详于寿甫。证之本研究所见,铁自噬介导的铁死亡是升陷汤对IPF大鼠肺功能发挥保护作用的重要途径。《医学衷中参西录》所立“大气下陷”一说,对于当今揭示IPF等肺脏病症形成机制具有重要指导意义;所创升陷汤一方,对于扩大IPF中医诊疗视野、创新临床路径有着重要的科学价值。

参 考 文 献

- [1] RAUTAJOKI T, LEHTO J T, SUTINEN E, et al. Dyspnea associates with a widely impaired quality of life in idiopathic pulmonary fibrosis patients: A longitudinal study using 15D. *J Palliat Med*, 2023, 26(10):1357-1364
- [2] MAHER T M, BENDSTRUP E, DRON L, et al. Global incidence and prevalence of idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Res*, 2021, 22(1):197
- [3] HAO Y, LI J, DAN L, et al. Chinese medicine as a therapeutic option for pulmonary fibrosis: Clinical efficacies and underlying mechanisms. *J Ethnopharmacol*, 2024, 318(Pt A):116836
- [4] 郝伟欣,董振华.升陷汤加味治疗结缔组织病合并肺间质纤维化体会. *中华中医药杂志*, 2008, 23(8):707-709
- [5] 闫亚男,梁玉磊,王杰鹏,等.升陷汤调节Wnt3a/ β -catenin信号途径介导的细胞衰老改善特发性肺纤维化大鼠肺功能. *中国实验方剂学杂志*, 2024, 30(12):31-38
- [6] LIANG Y, YAN Y, LIU N, et al. Shengxian decoction improves lung function in rats with bleomycin-induced idiopathic pulmonary fibrosis through the inhibition of PANoptosis. *J Ethnopharmacol*, 2024, 329:118153
- [7] 丁梦,张永萍,谢学恒,等.铁死亡的发生机制及其在特发性肺纤维化中的调控作用研究进展. *中药药理与临床*, 2023, 39(12):118-122
- [8] LI J, CAO F, YIN H L, et al. Ferroptosis: Past, present and future. *Cell Death Dis*, 2020, 11(2):88
- [9] ZHAI X, ZHU J, LI J, et al. Fraxetin alleviates BLM-induced idiopathic pulmonary fibrosis by inhibiting NCOA4-mediated epithelial cell ferroptosis. *Inflamm Res*, 2023, 72(10-11):1999-2012
- [10] 王杰鹏,王浩,方朝义,等.基于肺脏生理特性的络通纤溶饮调节细胞焦亡抑制肺纤维化机制研究. *中华中医药杂志*, 2020, 35(5):2349-2354
- [11] 徐叔云,卞如谦,陈修. *药理实验方法学*. 北京:人民卫生出版社, 2002:1937
- [12] 陈琦,宋纪显,唐毅,等.补中益气汤基于ACE2-Ang(1-7)-Mas轴减轻CIH诱发的肺脏炎症损伤. *中国实验方剂学杂志*, 2023, 29(17):18-25
- [13] SZAPIEL S V, ELSON N A, FULMER J D, et al. Bleomycin-induced interstitial pulmonary disease in the nude athymic mouse. *Am Rev Respir Dis*, 1979, 120(4):893-899
- [14] ASHCROFT T, SIMPSON J M, TIMBRELL V. Simple method of estimating severity of pulmonary fibrosis on a numerical scale. *J Clin Pathol*, 1988, 41(4):467-470
- [15] 王杰鹏.基于TLR4/NLRP3信号通路研究IPF气虚血瘀状态物质基础及当归补血汤干预机制. 石家庄:河北中医学院, 2020
- [16] YUE D, ZHANG Q, ZHANG J, et al. Diesel exhaust PM_{2.5} greatly deteriorates fibrosis process in pre-existing pulmonary fibrosis via ferroptosis. *Environ Int*, 2023, 171:107706
- [17] ZHAO J, LIANG Q, FU C, et al. Autophagy in sepsis-induced acute lung injury: Friend or foe? *Cell Signal*, 2023, 111:110867
- [18] XU M, ZHANG D, YAN J. Targeting ferroptosis using Chinese herbal compounds to treat respiratory diseases. *Phytomedicine*, 2024, 130:155738
- [19] SIOUTAS A, VAINIKKA L K, KENTSON M, et al. Oxidant-induced autophagy and ferritin degradation contribute to epithelial-mesenchymal transition through lysosomal iron. *J Inflamm Res*, 2017, 10:29-39
- [20] 闫坤. PM_{2.5}通过调控AMPK-Beclin1信号通路诱导铁死亡导致急性肺损伤的机制研究. 长春:吉林大学, 2023
- [21] 刘炀. Beclin1-SLC7A11复合物调控K562/ADM细胞铁死亡及对细胞耐药性的影响. 衡阳:南华大学, 2021
- [22] CHEN H, CAO L, HAN K, et al. Patulin disrupts SLC7A11-cystine-cysteine-GSH antioxidant system and promotes renal cell ferroptosis both in vitro and in vivo. *Food Chem Toxicol*, 2022, 166:113255
- [23] YANG W S, STOCKWELL B R. Ferroptosis: Death by lipid peroxidation. *Trends Cell Biol*, 2016, 26(3):165-176
- [24] CHEN X, YU C, KANG R, et al. Cellular degradation systems in ferroptosis. *Cell Death Differ*, 2021, 28(4):1135-1148
- [25] URSINI F, MAIORINO M. Lipid peroxidation and ferroptosis: The role of GSH and GPX4. *Free Radic Biol Med*, 2020, 152:175-185

(收稿日期: 2024年12月18日)