

# 络通纤溶饮调控铁死亡 改善特发性肺纤维化大鼠肺功能机制研究

刘 娜<sup>1</sup>, 王杰鹏<sup>1,2\*</sup>, 闫亚男<sup>1</sup>, 王 浩<sup>1,2</sup>, 方 芳<sup>1,2</sup>, 唐禹为<sup>1</sup>, 方朝义<sup>1,2\*</sup>

(1. 河北中医药大学, 河北 石家庄 050200; 2. 河北省中西医结合肺病研究重点实验室, 河北 石家庄 050091)

**【摘要】目的** 基于 SLC7A11/GPX4/ACSL4 介导的铁死亡研究络通纤溶饮改善特发性肺纤维化(IPF)大鼠肺功能机制。**方法** 48 只大鼠随机分为假手术组、模型组、络通纤溶饮组、尼达尼布组。气管内滴注博来霉素( $5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )制备 IPF 大鼠模型。相应药物连续灌胃 4 周后,测定肺功能,HE 和 Masson 染色观察肺组织病理学特征,透射电镜观察肺组织超微结构,试剂盒检测 GSH 活力、MDA 和  $\text{Fe}^{2+}$  含量,RT-qPCR 和 Western blot 实验检测肺组织 ACSL4、TFR1、GPX4、SLC7A11 mRNA 和蛋白表达。**结果** 与假手术组比较,模型组大鼠肺功能减退,肺组织线粒体嵴减少、消失,肺组织中 MDA 和  $\text{Fe}^{2+}$  含量、TFR1 和 ACSL4 蛋白与 mRNA 表达升高,SOD 活力、SLC7A11 和 GPX4 蛋白与 mRNA 表达降低( $P<0.05$ )。与模型组比较,络通纤溶饮组大鼠肺功能和线粒体损伤显著改善,肺组织 MDA 和  $\text{Fe}^{2+}$  含量、TFR1 和 ACSL4 蛋白与 mRNA 表达降低,SOD 活力、SLC7A11 和 GPX4 蛋白与 mRNA 表达升高( $P<0.05$ )。**结论** 络通纤溶饮对 IPF 大鼠肺功能具有保护作用,其机制可能是通过调控 SLC7A11/GPX4/ACSL4 介导的铁死亡实现。

**【关键词】** 络通纤溶饮; 特发性肺纤维化; SLC7A11/GPX4/ACSL4; 铁死亡; 肺功能

DOI:10.70976/j.1008-0805.SZGYGY-2025-1205

CSTR:32392.14.j.1008-0805.SZGYGY-2025-1205

【中图分类号】R285.5 【文献标识码】A 【文章编号】1008-0805(2025)12-2232-05

特发性肺纤维化(idiopathic pulmonary fibrosis, IPF)是以肺功能的进行性减退为主要临床特征、以纤维增生和胶原沉积导致肺组织损伤为病理特征的间质性肺疾病<sup>[1]</sup>。铁死亡被认为是 IPF 的关键病理环节之一,可介导氧化损伤、肺泡上皮损伤、线粒体损伤等过程参与 IPF 病理进程,可作为减轻 IPF 肺组织损伤的重要靶点<sup>[2]</sup>。基于肺脏“肺体喜润,肺用(气)主降(升已而降)”生理特性的创新认识,课题组制方络通纤溶饮治 IPF 临床疗效确当<sup>[3]</sup>,前期研究工作证实了络通纤溶饮可通过调控细胞焦亡改善 IPF 肺功能、抑制 IPF 肺组织损伤<sup>[4]</sup>。在此基础上,观察络通纤溶饮对 IPF 大鼠模型肺组织铁死亡的影响,进一步阐释其改善 IPF 大鼠肺组织损伤的作用机制。

## 1 材料与仪器

### 1.1 动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 48 只,6~8 周龄,体质量 180~200 g,购自北京维通利华实验动物科技有限公司。动物生产许可证号为 SCXK(京)2021-0011。动物实

验经河北中医药大学实验动物福利伦理委员会审查通过(批号:DWLL202401025)。

### 1.2 药品与试剂

注射用盐酸博来霉素(日本化药株式会社,批号:970592);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:H20170354);络通纤溶饮配方颗粒。药物组成:黄芪(4 g;产地:甘肃;批号 AB45L413,相当于生药量 10 g),麦冬(11 g;产地:四川;批号 AB45L253,相当于生药量 12 g),丹参(5 g;产地:山东;批号 AB45A323,相当于生药量 10 g),白果(2.9 g;产地:广西;批号 A3011603,相当于生药量 9 g),太子参(6 g;产地:福建;批号 AB451813,相当于生药量 15 g),百合(2 g;产地:湖北;批号 AB460323,相当于生药量 10 g),地龙(2.25 g;产地:广东;批号 AB470493;相当于生药量 9 g),虎杖(2.2 g;产地:江西;批号 A301B173;相当于生药量 10 g)均购自广东一方制药有限公司。

丙二醛(malondialdehyde,MDA)含量检测试剂盒、还原型谷胱甘肽(glutathione,GSH)活性检测试剂盒均购自南京建成生物工程研究所(货号分别为:A003-1-2、

收稿日期:2024-11-26; 修订日期:2025-03-07

基金项目:河北省自然科学基金中医药联合基金重点项目(H2022423309);中央引导地方科技发展资金项目(206Z7704G);

河北省高等学校科学技术研究项目(QN2021108);河北省中医药管理局科研计划项目(Z2022002,2022082);

河北中医药大学博士科研基金项目(BSZ2021004);河北省研究生创新资助项目(CXZZBS2023144)

作者简介:刘 娜(1993-),女(汉族),河北衡水人,河北中医药大学博士研究生,博士学位,主要从事肺脏病证基础与临床研究工作。

\*通讯作者简介:方朝义(1965-),男(汉族),河北衡水人,河北中医药大学教授,博士研究生导师,博士学位,主要从事肺脏病证基础与临床研究工作。

\*通讯作者简介:王杰鹏(1990-),男(汉族),河北邯郸人,河北中医药大学讲师,硕士研究生导师,博士学位,主要从事肺脏病证基础与临床研究工作。

A006-1-1、A030-2-1);BCA 蛋白浓度测定试剂盒、RIPA 裂解液、抗体稀释液均购自碧云天生物技术有限公司(货号分别为 P1102、P0013C、P0268);重组酰基辅酶 A 合成酶长链家族成员 4(acyl coenzymeA synthetase longchain family member4,ACSL4)抗体、重组溶质载体家族 7 成员 11(solute carrier family 7 member 11,SLC7A11)抗体和重组谷胱甘肽过氧化物酶 4( glutathione peroxidase 4,GPX4)抗体均购于美国 Abcam 公司(货号分别为:ab155282、ab175186、ab125066),兔抗转铁蛋白受体(transferrin receptor,TFRC)抗体购于北京博奥森生物技术有限公司(货号:BS-0988R)。兔抗  $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)抗体购自武汉三鹰生物技术有限公司(货号:20536-1-AP)。辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG(H+L)抗体购于上海碧云天生物技术有限公司(货号:A0208)。

1.3 仪器

Precellys Evolution 生物样品研磨器,法国 Bertin 公司产品;ChemiDoc 超高灵敏度化学发光成像系统,美国 Bio-Rad 公司产品;Plus384 酶标仪,美国 Molecular Devices 公司产品;DM6B 研究级正置荧光显微镜,德国 Leica 公司产品;HT770 透射电子显微镜,日本 Hitachi 公司产品。

2 方法

2.1 药液配置

根据课题组前期研究结果<sup>[4]</sup>,络通纤溶饮中药饮片煎液灌胃剂量为  $15.18\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ,据此,取络通纤溶饮中药配方颗粒  $10.53\text{ g}$  溶解于  $10\text{ mL}$  去离子水中,制成浓度为  $1.053\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$  的溶液;尼达尼布以去离子水溶解制成浓度为  $0.01\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$  的溶液。博来霉素以  $5\text{ mL }0.9\%$  NaCl 溶液溶解,制成  $0.001\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$  浓度的溶液。

2.2 IPF 大鼠模型建立

参照文献和课题组既往研究方法<sup>[4,5]</sup>,采用一次性气管内滴注博来霉素( $0.005\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )制备 IPF 大鼠模型:大鼠以 2% 戊巴比妥钠麻醉,颈部切开约  $0.5\text{ cm}$  左右切口, $1\text{ mL}$  注射器抽取  $0.9\%$  NaCl 溶液溶解的博来霉素经气管环装间隙缓慢滴入,术毕,缝合伤口并碘伏消毒。假手术组按照同样步骤一次性气管内滴注  $0.9\%$  NaCl 溶液。

2.3 分组与处置方法

参照课题组既往研究结果<sup>[4]</sup>,术后次日,经气管滴注博来霉素的大鼠随机分为模型组、络通纤溶饮组和尼达尼布组,络通纤溶饮组大鼠灌胃配方颗粒水溶液( $10.53\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ),尼达尼布组大鼠灌服药物水溶液( $0.1\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ),模型组灌胃  $0.9\%$  NaCl 溶液( $10\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ )。假手术组大鼠处置方式同模型组。

2.4 肺功能检测

末次给药后  $4\text{ h}$ ,依据文献<sup>[6]</sup>,每组随机选取 3 只

大鼠行肺功能检测。检测指标:主气道阻力(newtonian resistance,  $R_n$ )、呼吸系统阻力(respiratory resistance,  $R_{rs}$ )、呼吸系统顺应性(compliance,  $C_{rs}$ )、组织衰减(tissue damping,  $G$ )、组织弹性(tissue elastance,  $H$ )、呼吸系统弹力(elastance,  $E_{rs}$ )。

2.5 苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)和马松(Masson)染色观察大鼠肺组织病理形态学特征

除外 3 只肺功能检测大鼠,其余大鼠以 2% 戊巴比妥钠麻醉后取肺组织。依据文献<sup>[5]</sup>,经固定后石蜡包埋、切片,行 HE 和 Masson 染色。据 Szapiel 评分标准对 HE 染色肺组织病理行肺泡炎程度评分,根据 Ashcroft 评分标准对 Masson 染色肺组织进行纤维化程度评分。

2.6 透射电镜观察肺组织超微结构

依据文献<sup>[5]</sup>,切取  $1\text{ mm}\times 1\text{ mm}\times 1\text{ mm}$  大小的新鲜肺组织,迅速置于电镜固定液, $4^{\circ}\text{C}$  固定  $4\text{ h}$ ,再以 1% 的锇酸于室温固定  $2\text{ h}$ ,经梯度酒精、100% 丙酮脱水,包埋剂渗透后包埋,制成  $80\text{ nm}$  切片,铀铅双染色法染色,透射电子显微镜镜检并采集图像。

2.7 肺组织 GSH 活力、MDA 和  $\text{Fe}^{2+}$  含量测定

依据文献<sup>[7]</sup>,冻存的大鼠肺组织经匀浆后,酶标仪分别于  $530\text{ nm}$  和  $405\text{ nm}$  处测定 MDA 含量和 GSH 活力, $593\text{ nm}$  处测定  $\text{Fe}^{2+}$  含量。

2.8 实时荧光定量 PCR 检测肺组织 ACSL4、TFRC、GPX4、SLC7A11 mRNA 表达水平

提取各组大鼠肺组织总 RNA,检测 RNA 含量和纯度后,逆转录为 cDNA,后进行 PCR 扩增反应: $95^{\circ}\text{C}$  预变性  $10\text{ min}$ , $95^{\circ}\text{C}$  变性  $15\text{ s}$ , $60^{\circ}\text{C}$  退火  $1\text{ min}$ , $60^{\circ}\text{C}$  延伸  $30\text{ s}$ ,共 40 个循环;以  $\beta$ -actin 为内参,采用  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  法计算 ACSL4、SLC7A11、TFRC、GPX4 mRNA 相对表达水平。引物由武汉赛维尔生物科技有限公司设计并合成。引物序列见表 1。

表 1 PCR 引物序列

| 引物名称           | 引物序列(5'-3')                             |
|----------------|-----------------------------------------|
| ACSL4          | Forward primer: TCACTGTGGATCCCAAACTGT   |
|                | Reverse primer: CAAGAAGAATGTGACGTGCTG   |
| SLC7A11        | Forward primer: CCGTGGCTGTGGTCTTATCTC   |
|                | Reverse primer: TTGGGATAGAGGTCTTTACGG   |
| TFRC           | Forward primer: AACAAGAAGAATGTGACGTGCTG |
|                | Reverse primer: TGATGCTGTTCCACGGGTT     |
| GPX4           | Forward primer: CATCACTGTGGACCCCAAACTGT |
|                | Reverse primer: GTCCGTGGCTGTGGTCTTATCTC |
| $\beta$ -actin | Forward primer: GTGACGTTGACATCCGTAAGA   |
|                | Reverse primer: GCCGGACTCATCGTACTCC     |

2.9 蛋白印迹法(Western blot)检测肺组织 ACSL4、TFRC、GPX4、SLC7A11 蛋白表达水平

依据文献<sup>[7,8]</sup>, $100\text{ mg}$  肺组织加入  $900\text{ }\mu\text{L}$  含 PMSF 的 RAPI 裂解液,研磨机破碎组织,BCA 蛋白浓

度检测试剂盒测定总蛋白浓度。取 20  $\mu\text{g}$  蛋白样品加入缓冲液中,100℃煮沸 10 min,行 SDS-PAGE 电泳后转膜至 PVDF 膜,5% 脱脂奶粉封闭 2 h。加入一抗 (ACSL4、TFRC、GPX4、SLC7A11,稀释比例分别为:1:5000、1:1000、1:5000、1:5000)4℃过夜孵育,次日以 TBST 漂洗 5 min  $\times$  4 次后,加入二抗(稀释比例为 1:25000),室温孵育 2 h 后 TBST 漂洗 5 min  $\times$  4 次。使用 ECL 试剂显影,化学发光成像系统进行曝光、拍照,以  $\beta$ -actin 为内参,使用 Image J 软件分析蛋白条带灰度值,通过目的蛋白灰度值/ $\beta$ -actin 灰度值计算目的蛋白相对表达量。

2.10 统计学分析

采用 SPSS 26.0 软件对实验数据进行统计学分析,

计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示。对于符合正态分布且方差齐性的数据,采用单因素方差分析(One-way ANOVA)进行分析,组间比较采用 SNK 法;数据呈正态分布但方差不齐时,选用 Dunnett's T3 检验;对于不呈正态分布的数据,采用非参数检验。检验水准  $\alpha$  设定为 0.05。

3 结果

3.1 络通纤溶饮对各组大鼠肺功能的影响

与假手术组比较,模型组大鼠  $Rrs$ 、 $Ers$ 、 $H$ 、 $Rn$  显著升高(均  $P < 0.05$ ), $G$ 、 $Crs$  明显降低(均  $P < 0.05$ )。与模型组比较,络通纤溶饮组  $Rrs$ 、 $Ers$ 、 $H$ 、 $Rn$  显著降低(均  $P < 0.05$ ), $G$ 、 $Crs$  均明显升高(均  $P < 0.05$ )。见表 2。

表 2 各组大鼠肺功能比较( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别     | $Rrs$                                                       | $Ers$                                        | $Crs$                                               | $Rn$                                                        | $G$                                          | $H$                                          |
|--------|-------------------------------------------------------------|----------------------------------------------|-----------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|----------------------------------------------|----------------------------------------------|
|        | $/\text{cmH}_2\text{O} \cdot \text{s} \cdot \text{mL}^{-1}$ | $/\text{cmH}_2\text{O} \cdot \text{mL}^{-1}$ | $/\text{mL}^{-1} \cdot (\text{cmH}_2\text{O})^{-1}$ | $/\text{cmH}_2\text{O} \cdot \text{s} \cdot \text{mL}^{-1}$ | $/\text{cmH}_2\text{O} \cdot \text{mL}^{-1}$ | $/\text{cmH}_2\text{O} \cdot \text{mL}^{-1}$ |
| 假手术组   | $0.14 \pm 0.005$                                            | $2.61 \pm 0.061$                             | $0.50 \pm 0.060$                                    | $0.06 \pm 0.03$                                             | $1.15 \pm 0.02$                              | $1.42 \pm 0.121$                             |
| 模型组    | $0.63 \pm 0.049^*$                                          | $5.03 \pm 0.298^*$                           | $0.21 \pm 0.009^*$                                  | $0.20 \pm 0.015^*$                                          | $0.38 \pm 0.043^*$                           | $3.15 \pm 0.113^*$                           |
| 络通纤溶饮组 | $0.15 \pm 0.004^*$                                          | $3.78 \pm 0.122^{\#}$                        | $0.33 \pm 0.030^{\#}$                               | $0.08 \pm 0.015^*$                                          | $0.64 \pm 0.012^{\#}$                        | $2.95 \pm 0.052^{\#}$                        |
| 尼达尼布组  | $0.18 \pm 0.011^*$                                          | $2.99 \pm 0.233^{\#}$                        | $0.31 \pm 0.024^{\#}$                               | $0.11 \pm 0.019^*$                                          | $0.62 \pm 0.069^{\#}$                        | $2.65 \pm 0.047^{\#}$                        |

与假手术组比较,\* $P < 0.05$ ;与模型组比较, $^{\#}P < 0.05$ ;  $n = 3$

3.2 络通纤溶饮对各组大鼠肺组织病理特征的影响

假手术组大鼠肺泡结构完整,肺间质偶见炎性细胞浸润,无胶原沉积和成纤维细胞聚积现象。模型组大鼠肺组织结构紊乱,肺泡结构有不同程度破坏,肺泡腔及肺间质可见大量炎性细胞浸润,肺间质中可见大

量成纤维细胞聚集和胶原沉积。络通纤溶饮组大鼠肺泡结构较模型组完整,炎性细胞浸润、胶原沉积和成纤维细胞聚积明显减轻。结果表明,络通纤溶饮能够改善 IPF 大鼠肺组织炎症及纤维化程度。见图 1。

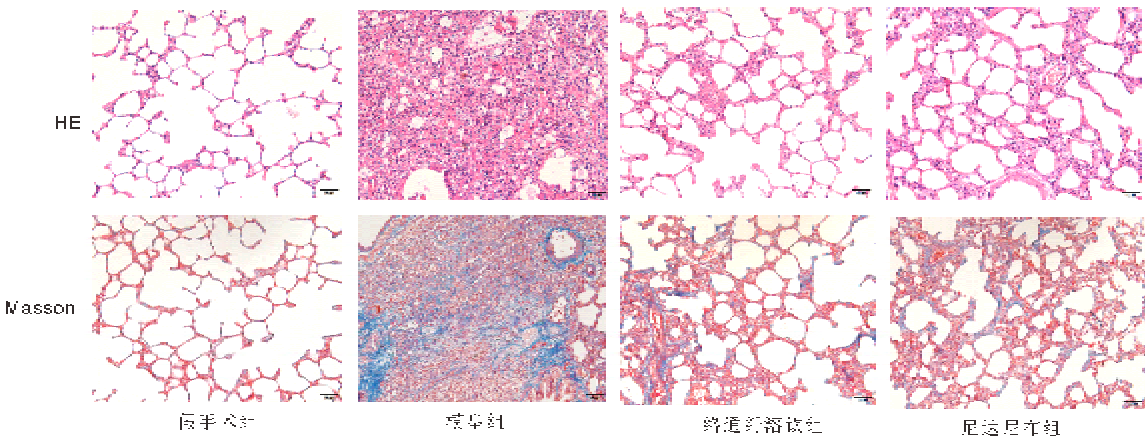


图 1 络通纤溶饮对各组大鼠肺组织病理学的影响(HE 染色,Masson 染色,200  $\times$ )

3.3 络通纤溶饮对各组大鼠超微结构的影响

假手术组大鼠肺组织线粒体嵴清晰,可见少量断裂和轻微扩张。模型组大鼠肺组织线粒体严重肿胀、空泡化,嵴减少、消失,线粒体基质呈絮状、致密化。络通纤溶饮组大鼠肺组织线粒体轻微肿胀,嵴大多排列整齐,少量断裂。见图 2。

3.4 络通纤溶饮对各组大鼠肺组织 GSH 活力、MDA 和  $\text{Fe}^{2+}$  含量的影响

与假手术组比较,模型组大鼠肺组织中 MDA 和  $\text{Fe}^{2+}$  含量显著升高,GSH 活力显著下降(均  $P < 0.05$ )。与模型组比较,络通纤溶饮组大鼠肺组织中 MDA 和  $\text{Fe}^{2+}$  含量显著降低,GSH 活力显著升高(均  $P < 0.05$ )。见表 3。

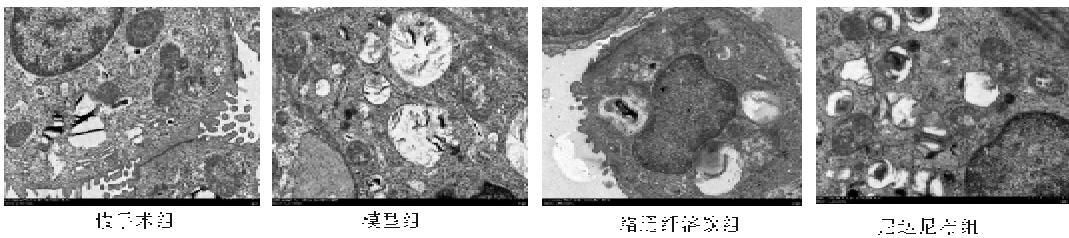


图2 络通纤溶饮对各组大鼠肺组织超微结构的影响(电镜,5000×)

3.5 络通纤溶饮对各组大鼠肺组织 ACSL4、SLC7A11、TFRC、GPX4 mRNA 表达的影响

与假手术组比较,模型组大鼠肺组织 TFRC 和 ACSL4 mRNA 水平升高,SLC7A11 和 GPX4 mRNA 水平降低(均  $P < 0.05$ )。与模型组比较,络通纤溶饮组大鼠肺组织中 TFRC 和 ACSL4 mRNA 水平降低,SLC7A11 和 GPX4 mRNA 水平升高(均  $P < 0.05$ )。见表 4。

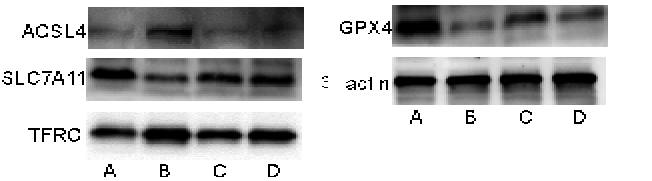
3.6 络通纤溶饮对各组大鼠肺组织 ACSL4、SLC7A11、TFRC、GPX4 蛋白表达的影响

与假手术组比较,模型组大鼠肺组织 TFRC 和 ACSL4 蛋白表达水平显著升高,SLC7A11 和 GPX4 蛋白表达水平显著减低(均  $P < 0.01$ )。与模型组比较,络通纤溶饮组大鼠肺组织 TFRC 和 ACSL4 蛋白表达水平显著降低,SLC7A11 和 GPX4 蛋白表达水平显著升高(均  $P < 0.01$ )。见图 3、表 5。

表 3 络通纤溶饮对各组大鼠肺组织 GSH 活力、MDA 和  $Fe^{2+}$  含量的影响( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别     | GSH<br>/ $U \cdot L^{-1}$    | MDA<br>/ $nmol \cdot L^{-1}$ | $Fe^{2+}$<br>/ $\mu mol \cdot kg^{-1}$ |
|--------|------------------------------|------------------------------|----------------------------------------|
| 假手术组   | 1110.14 ± 210.66             | 7.23 ± 1.42                  | 1.53 ± 0.47                            |
| 模型组    | 670.23 ± 120.18 <sup>*</sup> | 12.14 ± 1.38 <sup>*</sup>    | 3.57 ± 0.76 <sup>*</sup>               |
| 络通纤溶饮组 | 953.98 ± 275.42 <sup>#</sup> | 7.60 ± 0.67 <sup>#</sup>     | 2.39 ± 0.60 <sup>#</sup>               |
| 尼达尼布组  | 942.53 ± 270.90 <sup>#</sup> | 7.92 ± 1.22 <sup>#</sup>     | 2.56 ± 0.51 <sup>#</sup>               |

与假手术组比较,<sup>\*</sup> $P < 0.05$ ;与模型组比较,<sup>#</sup> $P < 0.05$ ;n = 6



A. 假手术组 B. 模型组 C. 络通纤溶饮组 D. 尼达尼布组

图3 各组大鼠肺组织 ACSL4、SLC7A11、TFRC、GPX4 蛋白表达电泳

表 4 络通纤溶饮对各组大鼠肺组织 ACSL4、SLC7A11、TFRC、GPX4 mRNA 表达的影响( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别     | ACSL4                    | SLC7A11                  | TFRC                     | GPX4                     |
|--------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| 假手术组   | 1.00 ± 0.32              | 1.04 ± 0.24              | 1.00 ± 0.30              | 1.03 ± 0.29              |
| 模型组    | 1.76 ± 0.50 <sup>*</sup> | 0.78 ± 0.12 <sup>*</sup> | 1.93 ± 0.49 <sup>*</sup> | 0.57 ± 0.13 <sup>*</sup> |
| 络通纤溶饮组 | 1.13 ± 0.45 <sup>#</sup> | 1.55 ± 0.34 <sup>#</sup> | 1.46 ± 0.43 <sup>#</sup> | 1.49 ± 0.41 <sup>#</sup> |
| 尼达尼布组  | 1.14 ± 0.32 <sup>#</sup> | 1.54 ± 0.42 <sup>#</sup> | 1.45 ± 0.46 <sup>#</sup> | 1.57 ± 0.44 <sup>#</sup> |

与假手术组比较,<sup>\*</sup> $P < 0.05$ ;与模型组比较,<sup>#</sup> $P < 0.05$ ;n = 6

表 5 络通纤溶饮对各组大鼠肺组织 ACSL4、SLC7A11、TFRC、GPX4 蛋白表达的影响( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别     | ACSL4                    | SLC7A11                  | TFRC                     | GPX4                     |
|--------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| 假手术组   | 0.23 ± 0.06              | 0.54 ± 0.05              | 0.64 ± 0.04              | 0.33 ± 0.02              |
| 模型组    | 0.50 ± 0.28 <sup>*</sup> | 0.23 ± 0.02 <sup>*</sup> | 1.00 ± 0.06 <sup>*</sup> | 0.09 ± 0.01 <sup>*</sup> |
| 络通纤溶饮组 | 0.41 ± 0.19 <sup>#</sup> | 0.36 ± 0.01 <sup>#</sup> | 0.79 ± 0.05 <sup>#</sup> | 0.20 ± 0.01 <sup>#</sup> |
| 尼达尼布组  | 0.37 ± 0.20 <sup>#</sup> | 0.31 ± 0.01 <sup>#</sup> | 0.68 ± 0.03 <sup>#</sup> | 0.18 ± 0.01 <sup>#</sup> |

与假手术组比较,<sup>\*</sup> $P < 0.05$ ;与模型组比较,<sup>#</sup> $P < 0.05$ ;n = 3

4 讨论

铁死亡是以铁稳态失衡和脂质活性氧积累为特征的细胞死亡模式,以线粒体皱缩、膜密度增加、嵴减少或消失为形态学特征,其机制涉及铁超载、脂质过氧化和谷胱甘肽耗竭等病理过程<sup>[9]</sup>。研究发现,IPF 患者肺

组织呈现明显的铁沉积现象<sup>[10]</sup>,且支气管肺泡灌洗液中存在铁死亡相关基因表达(如 NRAS、EMP1、SLC40A1 等)<sup>[11]</sup>,说明铁死亡是参与 IPF 病理进程的重要环节。在铁死亡发生时,细胞内出现“铁过载”现象,升高的  $Fe^{2+}$  与过氧化物发生芬顿反应产生大量的 ROS 导致脂质过氧化损伤。GPX4 通过将 GSH 转化成

氧化型谷胱甘肽(GSSG),参与清除磷脂过氧化物过程,以减少细胞氧化损伤发挥抑制铁死亡效应;当 GPX4 活性降低时,ROS 以及 MDA 等脂质过氧化产物蓄积从而驱动铁死亡过程。本研究结果显示,博来霉素可致大鼠肺组织出现炎性细胞浸润、胶原沉积等表现,电镜所示肺组织超微结构出现线粒体皱缩、嵴减少或消失等特征;同时,肺组织 MDA 和  $\text{Fe}^{2+}$  含量显著升高,GSH 活力显著下降,提示肺组织出现“铁过载”和氧化损伤,结合 GPX4 表达水平下降,证实博来霉素诱导的 IPF 大鼠出现明显的铁死亡征象。

细胞外的  $\text{Fe}^{3+}$  通过转铁蛋白受体(TFRC)摄取到细胞质被还原成  $\text{Fe}^{2+}$  并释放到细胞不稳定铁池,调控铁的氧化还原反应;当 TFRC 过度活化,可增加  $\text{Fe}^{2+}$  的摄取并转化为  $\text{Fe}^{3+}$ ,激发脂质活性氧积累过程,故被认为是铁死亡的重要标志之一<sup>[12]</sup>。SLC7A11 是拮抗铁死亡的重要调节因子,可维持细胞氧化还原稳态;若 SLC7A11 活化,可导致 GSH 消耗增加,进而下调 GPX4,导致铁依赖性脂质过氧化物积累引起的细胞/亚细胞膜损伤<sup>[13]</sup>。可见,GPX4 和 SLC7A11 相互作用,共同维护氧化还原平衡,发挥抑制脂质过氧化所致铁死亡的生物学效应。ACSL4 是长链酰基酰基 CoA 合成酶 ACSL 家族的成员,通过参与脂肪酸代谢进而催化脂质过氧化物的生成,被认为是铁死亡的关键预测因子<sup>[14]</sup>。本实验观察到博来霉素诱导的 IPF 大鼠肺组织 TFRC 和 ACSL4 蛋白表达水平显著升高,SLC7A11 表达水平下降,说明铁死亡可作为干预 IPF 的重要靶点。

围绕铁死亡在 IPF 中的调控作用,相关研究证实了中药的有效调控作用<sup>[15]</sup>。课题组基于前期肺脏病证研究基础和研究成果,认为“气阴耗损(本),痰瘀阻络(标)”为 IPF 基本病机特征,其治当以益气养阴、祛痰通络为要,拟制功具“益气养阴,祛痰通络”之效的络通纤溶饮,用治 IPF 效用确切<sup>[13]</sup>。前期研究工作证实,络通纤溶饮通过调控细胞焦亡<sup>[4]</sup>、改善氧化损伤<sup>[16]</sup>等环节对 IPF 产生治疗作用。本研究在前期研究工作的基础上,发现络通纤溶饮可显著改善 IPF 大鼠肺组织损伤和肺功能,肺组织电镜检测发现线粒体皱缩、嵴减少或消失等表现减轻,且 MDA 和  $\text{Fe}^{2+}$  含量降低、GSH 活力升高,TFRC 和 ACSL4 蛋白水平降低、SLC7A11 和 GPX4 蛋白水平升高,明确了络通纤溶饮调控铁死亡抑制 IPF 的功用特点。

本研究以铁死亡为研究切入点,证实了络通纤溶饮影响 IPF 病理进程的潜在效应靶点,为深入解析络通纤溶饮的功用基础提供了研究证据,从基础研究角度为 IPF 临床诊治提供工作思路和科学依据。

## 参考文献:

- [1] MURI J, DURCOVA B, SLIVKA R, et al. Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Review of Current Knowledge[J]. *Physiol Res*, 2024, 73(4): 487.
- [2] 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[J]. *中药药理与临床*, 2023, 39(12):118.
- [3] 方朝义,王玉栋,陈分乔,等.络通纤溶饮治疗特发性肺纤维化的临床研究[J]. *河北中医药学报*, 2019, 34(3):8.
- [4] 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[J]. *中华中医药杂志*, 2020, 35(5):2349.
- [5] 廖一羲,王博,邱志广,等.博来霉素诱导的肺纤维化大鼠肺组织病理和超微结构变化[J]. *中国病理生理杂志*, 2023, 39(12):2296.
- [6] WANG J, WANG H, FANG F, et al. Donggui Buxue Tang Ameliorates Bleomycin - Induced Pulmonary Fibrosis by Suppressing the TLR4/NLRP3 Signaling Pathway in Rats[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2021, 2021: 9030143.
- [7] PEI Z, QIN Y, FU X, et al. Inhibition of ferroptosis and iron accumulation alleviates pulmonary fibrosis in a bleomycin model[J]. *Redox Biol*, 2022, 57: 102509.
- [8] 杨勤平,王卉,徐淑钰,等.参芪调肾方减轻慢性阻塞性肺病大鼠气道炎症的机制:基于铁死亡途径[J]. *南方医科大学学报*, 2024, 44(10):1937.
- [9] BERNDT C, ALBORZINIA H, AMEN V S, et al. Ferroptosis in health and disease[J]. *Redox Biol*, 2024, 75: 103211.
- [10] CHENG H, FENG D, LI X, et al. Iron deposition - induced ferroptosis in alveolar type II cells promotes the development of pulmonary fibrosis[J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2021, 1867(12): 166204.
- [11] LI M, WANG K, ZHANG Y, et al. Ferroptosis - Related Genes in Bronchoalveolar Lavage Fluid Serves as Prognostic Biomarkers for Idiopathic Pulmonary Fibrosis[J]. *Front Med (Lausanne)*, 2021, 8: 693959.
- [12] ZHAO Y, ZHANG H, CUI J G, et al. Ferroptosis is critical for phthalates driving the blood - testis barrier dysfunction via targeting transferrin receptor[J]. *Redox Biol*, 2023, 59: 102584.
- [13] LIU Y, TANG A, LIU M, et al. Tuberosinone may enhance the function of the SLC7A11/glutamate antiporter to restrain the ferroptosis to alleviate pulmonary fibrosis[J]. *J Ethnopharmacol*, 2024, 318(Pt B): 116983.
- [14] WEN J, WANG C, SONG L Y, et al. Ferroptosis Mediates Pulmonary Fibrosis: Implications for the Effect of Astragalus and Panax notoginseng Decoction[J]. *Can Respir J*, 2024, 2024: 5554886.
- [15] XU M, ZHANG D, YAN J. Targeting ferroptosis using Chinese herbal compounds to treat respiratory diseases[J]. *Phytomedicine*, 2024, 130: 155738.
- [16] 支政,邱刚,赵静,等.益气养阴祛痰方药对特发性肺纤维化大鼠氧化损伤的影响[J]. *解放军医药杂志*, 2018, 30(12):6.

(责任编辑:王诗涵)