

金银花石油醚部位抗肺纤维化药效作用及其成分分析

李雅群^{1,2}, 杨勇^{1,3}, 王旭¹, 王萍¹, 田景振^{1,3}, 朱庆军^{1,3}, 容蓉^{1,3}(1. 山东中医药大学, 山东 济南 250355; 2. 复旦大学附属华山医院, 上海 200000; 3. 山东省高校中医药抗病毒协同创新中心, 山东 济南 250355)

摘要: **目的** 对金银花石油醚部位提取物抗肺纤维化药效作用进行探究, 并对其药效成分进行分析。 **方法** 体外实验采用 $5 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 转化生长因子(TGF)- $\beta 1$ 诱导 A549 细胞建立上皮间质转化(epithelial mesenchymal transition, EMT)细胞模型, 设置空白对照组、模型组、金银花石油醚部位组, RT-PCR 法检测药物干预后 A549 细胞 EMT 标志性基因(Col I、Vimentin、E-cadherin、 α -SMA)mRNA 表达水平, ELISA 法检测羟脯氨酸(HYP)含量变化。将 36 只雄性 C57BL/6 小鼠随机分为假手术组、模型组、吡非尼酮组 and 金银花石油醚部位组, 暴露式气管内注入博来霉素 $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 进行模型复制, 第 7 天开始给药, 第 28 天处死小鼠。HE、Masson 染色观察小鼠肺组织病理形态变化, ELISA 法检测肺组织 HYP 含量, RT-PCR 法检测肺组织 EMT 标志性基因表达水平。并对金银花石油醚部位进行 UPLC-Q-Extractive/MS 成分定性分析。 **结果** 与模型组比较, 金银花石油醚部位可有效抑制 TGF- $\beta 1$ 诱导后 A549 细胞内 Col I、 α -SMA、Vimentin($P < 0.05$, $P < 0.01$)mRNA 表达, 促进 E-cadherin mRNA($P < 0.01$, $P < 0.05$)表达, 降低细胞内羟脯氨酸($P < 0.05$, $P < 0.01$)含量; 金银花石油醚部位可改善小鼠肺组织炎症与纤维化程度, 使肺组织 Col I、 α -SMA、Vimentin mRNA($P < 0.05$, $P < 0.01$)的表达量下降, E-cadherin mRNA 表达量上升($P < 0.05$, $P < 0.01$), 羟脯氨酸含量下降($P < 0.05$, $P < 0.01$)。LC-MS 共鉴定出金银花石油醚部位中 14 种化学成分, 以酚类和黄酮类成分为主。 **结论** 金银花石油醚部位通过抑制上皮间质转化过程产生抗肺纤维化作用。酚类和黄酮类成分是其潜在药效物质基础。

关键词: 金银花石油醚部位; 肺纤维化; 上皮间质转化(EMT); TGF- $\beta 1$; 博来霉素; A549; 小鼠

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2021)09-1268-08

doi: 10.19378/j. issn. 1003-9783.2021.09.006

Anti-pulmonary Fibrosis Effect of Petroleum Ether Part of *Lonicera Japonica* and Its Potential Active Components

LI Yaquin^{1,2}, YANG Yong^{1,3}, WANG Xu¹, WANG Ping¹, TIAN Jingzhen^{1,3}, ZHU Qingjun^{1,3}, RONG Rong^{1,3}

(1. Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355 Shandong, China; 2. Huashan Hospital of Fudan University, Shanghai 200000, China; 3. Antiviral Synergistic Innovation Center of Traditional Chinese Medicine in Universities of Shandong Province, Jinan 250355 Shandong, China)

Abstract: **Objective** To study the anti-pulmonary fibrosis effect of the petroleum ether extract of *Lonicerae japonicae*(PLJ) and predict its potential pharmacodynamic components. **Methods** An *in vitro* EMT cell model was established in A549 cells incubated with $5 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ of TGF- $\beta 1$, blank control group, model group and petroleum ether part of *Lonicera japonica* groups were set up. RT-PCR was applied to detect mRNA expression level of EMT related genes(Col I, Vimentin, E-cadherin and α -SMA) in A549 after drug intervention; ELISA was used to detect the content of HYP. 36 C57BL/6 male mice were randomly divided into sham operation group, bleomycin model group, pirfenidone group and petroleum ether part of *Lonicera japonica* groups at different doses, $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ of bleomycin was intratracheally injected to establish the pulmonary fibrosis mice model. 7 days later, pirfenidone and petroleum ether part of *Lonicera japonica* were daily orally administered, and all mice were sacrificed on the

收稿日期: 2021-05-06

作者简介: 李雅群, 女, 博士研究生, 研究方向: 药物疗效、耐药性不良反应相关的药物基因组学、蛋白组学及代谢组学新靶点研究。Email: 20111220003@fudan.edu.cn。通信作者: 容蓉, 女, 博士, 教授, 研究方向: 中药及复方活性成分与质量控制。Email: lanma90@sina.com。

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81873220, 81774167); 山东省重点研发计划项目(重大科技创新工程, 2020CXGC010505)。

28th day. The pathology of lung tissues was observed by HE and Masson staining, ELISA was used to detect HYP in lung tissues, and the expression of EMT related genes was detected by RT-PCR. The components of petroleum ether extract of *Lonicerae japonica* were qualitatively analyzed by the UPLC-Q-extractive/MS. **Results** Compared with the model group, petroleum ether part of *Lonicera japonica* can effectively inhibit the expression of Col I, α -SMA and Vimentin ($P < 0.05$, $P < 0.01$) mRNA in TGF- β 1-induced A549, promote the expression of E-cadherin mRNA ($P < 0.01$, $P < 0.05$), reduce the content of HYP ($P < 0.05$, $P < 0.01$). In addition, petroleum ether part of *Lonicera japonica* can improve the degree of pulmonary inflammation and fibrosis in mice, decrease the expressions of Col I, α -SMA and Vimentin ($P < 0.05$, $P < 0.01$) mRNA, increase the expression of E-cadherin mRNA ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and decrease the content of HYP ($P < 0.05$, $P < 0.01$). LC-MS results showed that a total of 14 chemical constituents were identified from the PLJ, among which phenols and flavonoids were the main constituents. **Conclusion** PLJ has anti-pulmonary fibrosis effect via inhibiting the process of EMT, phenols and flavonoids are potential medicinal components.

Keywords: Petroleum ether part of *Lonicerae japonicae*; pulmonary fibrosis; epithelial mesenchymal transition; TGF- β 1; bleomycin; A549; mice

肺纤维化(pumonary fibrosis, PF)是以肺实质内成纤维细胞灶为特征的高死亡率肺部疾病,患者临床多出现肺间质变厚、僵硬、肺膨胀性 O₂/CO₂扩散障碍^[1]。2019 年爆发的新型冠状病毒肺炎(coronavirus disease 2019, COVID-19)是呼吸综合征冠状病毒 2 (SARS-CoV-2)感染导致的急性呼吸道传染病,该病患者胸部 CT 影像常出现浸润影、肺间质改变等肺纤维化病理表现,多数患者因肺部出现进展性纤维化,生活质量受到影响^[2-3]。COVID-19 基因序列与 SARS 具有 79.5%的相似性,肺纤维化发病率占 SARS 患者人群后遗症首位,尽管 COVID-19 后遗症情况尚未经大样本量临床数据验证,但根据基因序列相似性分析,可推断肺纤维化在 COVID-19 后遗症中呈高风险趋势^[4]。因此,如何缓解或逆转患者肺部纤维化疾病进程,迫在眉睫。

金银花为忍冬科忍冬属植物忍冬 *Lonicera japonica* Thunb. 的干燥花蕾或带初开的花,味甘,性寒,归肺、心、胃经,具有清热解毒、抗菌消炎等功效,广泛应用于肺部疾病的治疗^[5-6]。通过检索临床用于治疗肺纤维化的中药及其复方,发现金银花在中药抗肺纤维化治疗中使用频率较高,加之金银花的清热解毒基础药效以及在肺部疾病治疗中的良好效果,无论在基础研究还是临床探索中均具有非常大的潜力和前景^[7-10]。因此,本课题选择金银花作为抗肺纤维化的潜在治疗药物。

本课题组通过转化生长因子(TGF)- β 1 诱导的肺泡上皮来源的 A549 体外细胞模型,对金银花各提取

部位进行了初步活性筛选,发现石油醚部位抗肺纤维化效果明显,故本研究以该部位作为研究对象,并探究其潜在的药效成分,为改善肺纤维化患者及 COVID-19 恢复期患者的临床用药提供实验指导依据。

1 材料与方法

1.1 细胞株及实验动物 肺泡 II 型上皮细胞 A549 细胞株,由山东省医学科学院孟红教授提供。细胞贴壁生长,用 RMPI1640 培养基(含 10%新生牛血清)、37 °C、饱和湿度、5% CO₂培养箱培养。

SPF 级 C57BL/6 小鼠,6~7 周龄,雄性,体重(20 $\pm$ 2)g,36 只,购自济南朋悦实验动物繁育有限公司。实验动物许可证号: SCKX(鲁)20140007,动物质量合格证号: 37009200003495。12 h 昼夜交替循环,20~25 °C,湿度 50%~70%环境中常规饲养。本研究所涉及的实验部分均符合伦理委员会的准则,由山东中医药大学实验动物福利伦理审查委员会批准,批准号: SDUTCM2018091901。

1.2 药物及试剂 金银花(批号: 131201),购于天马(安徽)中药饮片科技有限公司,由山东中医药大学药理学系徐凌川教授鉴定,药材标本保存于山东中医药大学天然药物实验室。金银花石油醚部位需用二甲基亚砜配置成高浓度母液 4 °C 保存,使用前用细胞培养液稀释为所需浓度。

RMPI 1640 培养液,美国 Gibco 公司,批号: 1503141;新生牛血清,杭州四季青工程材料有限公

司,批号:8115273;四甲基偶氮唑盐(MTT),美国 Solarbio 公司,批号:M8180;重组人 TGF- β 1,美国 Pero tech 公司,批号:0614209-1;RNA 提取试剂 RNAisoPlu(批号:NZM1305)、逆转录试剂盒 PrimeScript[®] RT reagent Kit with gDNA Eraser(批号:AK3001)、qPCR 试剂盒 SYBR[®] Premix Ex Taq[™]II(批号:AK7001),大连生物工程有限公司;细胞羟脯氨酸(HYP)ELISA 试剂盒,北京方程生物有限公司,批号:201512;小鼠 HYP-ELISA 试剂盒,美国 biofine 公司,批号:FU-X0804;盐酸博来霉素,日本化药株式会社,批号:650472;戊巴比妥钠,中国医药集团上海化学试剂公司,批号:F981104;吡啡尼酮,北京康蒂尼药业有限公司,批号:150603。

1.3 仪器 JB-P5 型包埋机,武汉俊杰电子有限公司;RM2016 型病理切片机,上海徕卡仪器有限公司;KD-P 型组织摊片机,浙江省金华市科迪仪器设备有限公司;7300/7500 Fast 实时定量 PCR 仪(美国应用生物系统公司);四级杆-静电场轨道阱超高分辨质谱仪 Q Exactive[™] hybrid quadrupole-Orbitrap mass spectrometer、UltiMate 3000 超高效液相色谱仪 UHPLC,美国 Thermo Scientific 公司;CS-15R 超速冷冻离心机,美国 Beckman 公司。

1.4 金银花石油醚部位的提取及成分分析

1.4.1 供试品溶液的制备 精确称取金银花药材粉碎粗粉 100 g,先后以药材质量 10、8、8、8 倍量的 80%乙醇冷浸提取 4 次,每次 24 h;合并滤液并减压浓缩干燥,得干膏后加水分散;用石油醚(60~90℃)萃取 3 次[萃取剂:母液(V/V)=1:5],得 2.3 g 金银花石油醚部位;精密称取 10 mg 溶解于 10 mL 乙醚中,以 825 $\times$ g 离心 10 min,0.22 μ m 滤头过滤。

1.4.2 液相、质谱及核磁测定条件 色谱柱:Halo-C₁₈柱(Advanced technology, 100 mm $\times$ 2.1mm, 2.7 μ m);柱温:45℃;进样器温度:10℃;每次进样量 10 μ L;流动相:0.05%甲酸水(A)、0.05%甲酸乙腈(B);流速:0.30 mL $\cdot$ min⁻¹。正离子模式梯度洗脱:0~1 min, 2% B; 1~3 min, 2%~20% B; 3~4 min, 20% B; 4~7 min, 20%~40% B; 7~9 min, 40%~70% B; 9~15 min, 70%~98% B; 15~17 min, 98% B; 17~17.1 min, 98%~2% B。负离子模式检测:离子源 HESI;毛细管温度 300℃;毛细管电压 3 200 V;源内温度 350℃;鞘气 45;辅助气 10;质谱采集范围 80~1 000 m $\cdot$ z⁻¹;分辨率 70 000;S-Lens RF Level:55。

1.5 分组及给药方法 取对数生长 A549 细胞以每孔

15 $\times$ 10⁴个接种于 6 孔板中,培养 24 h 后分为空白对照组(RMPI1640 培养液)、模型组(5 ng $\cdot$ mL⁻¹ TGF- β 1)、金银花石油醚部位(2.5、5、10 μ g $\cdot$ mL⁻¹)组,用于 RT-PCR 和 ELISA 检测。

小鼠预饲养 3 d 后,将 36 只 C57BL/6 雄性小鼠随机均分为假手术组(生理盐水 0.3 mL $\cdot$ d⁻¹)、模型组(5 mg $\cdot$ kg⁻¹ 博来霉素)、吡啡尼酮(0.3 mL $\cdot$ d⁻¹)组、金银花石油醚部位(0.1、0.2、0.4 mg $\cdot$ kg)组,每组 6 只。模型复制后第 7 天开始灌胃,连续灌胃 21 d 后,腹腔注射 2%的戊巴比妥钠(0.2 mL $\cdot$ 100 g⁻¹)麻醉,眼球取血后取小鼠肺组织。取右上肺固定于 4%多聚甲醛,石蜡包埋、切片;剩余肺组织保存于 -80℃冰箱。

1.6 模型的制备^[11-12] C57BL/6 小鼠术前 12 h 禁食,腹腔注射 2%戊巴比妥钠,颈部正中纵向切开,钝性分离肌肉组织,使气管暴露。经气管软骨环间隙朝向心端缓慢注入 100 μ L 博来霉素(1.5 mg $\cdot$ kg⁻¹),假手术组注入同体积生理盐水。注射后将鼠板直立并旋转抖动,使药液在小鼠肺内分布均匀。缝合切口,右侧卧位,待其自然苏醒。小鼠注射博来霉素后肺组织出现纤维化样病变,且 EMT 标志物表达变化符合肺纤维化疾病特征,证明模型复制成功。

1.7 A549 细胞生长抑制率的检测 将对数生长期 A549 细胞以每孔 1 $\times$ 10⁵个接种于 96 孔板中,待细胞贴壁后,加入金银花石油醚部位(5、10、20、40、80、160、320 μ g $\cdot$ mL⁻¹),48 h 后加入 10 μ L 5 μ g $\cdot$ mL⁻¹ MTT 溶液,2 h 后吸弃上清,每孔加入 100 μ L 二甲基亚砷,震荡混匀。于酶标仪 490 nm 处测定吸光度值。细胞抑制率(IR)%=[1-(OD_{加药组}-OD_{调零组})/(OD_{空白对照组}-OD_{调零组})] $\times$ 100%。

1.8 小鼠肺组织病理形态学观察 取小鼠肺组织石蜡切片,HE、Masson 染色,光学显微镜下观察肺部炎症与纤维化程度。

1.9 RT-PCR 法检测 A549 细胞和小鼠肺组织中 Col I、 α -SMA、Vimentin、E-cadherin mRNA 的表达水平 采用 Trizol 法裂解各组 A549 细胞,用于提取 mRNA,UV 5500 紫外分光光度计测定吸光度值,A_{260/280}值为 1.8~2.0,反转录为 cDNA 并扩增基因片段。检测 Col I、 α -SMA、Vimentin 和 E-cadherin mRNA 表达水平。逆转录反应条件:37℃ 30 min,85℃ 5 s。RT-PCR 反应条件:50℃ 10 min, Cycle1(1 $\times$)95℃ 30 s, Cycle2(40 $\times$):95℃ 5 s, 57℃ 30 s, 72℃ 30 s, 95℃ 15 s, 60℃ 1 min, 95℃ 15 s。采用 Trizol 法组织匀浆裂解小鼠肺组织

25 mg，用于后续操作，同上。mRNA 相对表达强度为 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 。引物由上海生物工程有限公司合成，引物序列见表 1。

表 1 RT-PCR 引物序列

Table 1 Primer sequences for RT-PCR	
基因名称	引物序列(5'→3')
E-cadherin (NM_004360.3)	Forward: GAGTGCCAACTGGACCATTGACGTA
	Reverse: CACAGTCACACACGCTGACCTCA
Vimentin (NM_003380)	Forward: TGACATTGAGATTGCCACCTACAG
	Reverse: TCAACCGTCTTAATCAGAAGTGTCC
α -SMA (NM_001613.2)	Forward: CTGGCCGAGATCTCACTGACTA
	Reverse: GCCCATCAGGCAACTCGTAA
Col I (NM_000088)	Forward: GCTTGCTCCACTTGCTTGAAGA
	Reverse: GAGCATTGCCTTTGATTGCTG
β -actin (NM_001101.3)	Forward: TGACGTGGACATCCGCAAG
	Reverse: CTGGAAGGTGGACAGCGAGG

1.10 ELISA 法检测 A549 细胞和小鼠肺组织羟脯氨酸含量 PBS 冲洗 A549 各组细胞，-80 ℃反复冻融使其结构破坏释放出细胞内成分，以 825×g 离心 10 min 后取上清液；取各组小鼠相同部位肺组织 50 mg，具体操作均按照试剂盒说明书进行。

1.11 统计学处理方法 用 SPSS 17.0 统计软件对实验结果进行统计学分析处理，计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。采用单因素方差分析，若方差齐性则

用 LSD-*t* 法进行两两比较，若方法不齐则用 Dunnett's *T3* 法进行两两比较。以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 金银花石油醚部位组分分析 经过 UPLC-Q-Extractive/MS 分析，得到总离子流图，见图 1。采用 Xcalibur 软件预测自建数据库中各化合物理论分子量，查找化合物精确质量数，生成可能分子式，结合各色谱峰的分子离子峰[M-H]⁻及主要碎片峰，推测出可能成分 14 个，见表 2。

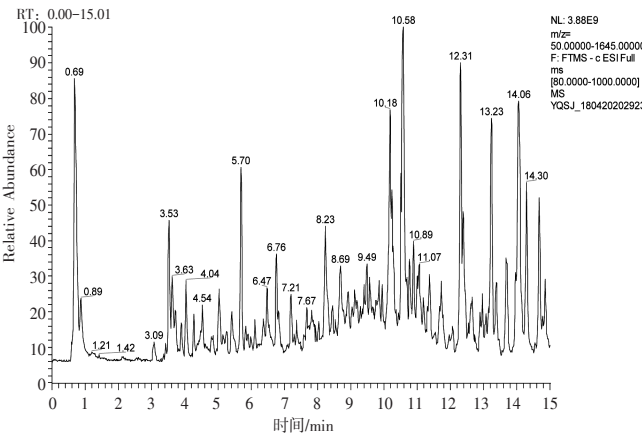


图 1 金银花石油醚部位(PLJ)的 LC-MS 总离子流图
Figure 1 LC-MS total ion chromatogram of PLJ

表 2 金银花石油醚部位(PLJ)UPLC-Q-Extractive/MS 分析结果

Table 2 UPLC-Q-Extractive/MS analysis results of PLJ								
峰号	保留时间 (RT)/min	化合物名称	分子式	实测相对 分子质量	理论相对 分子质量	偏差	参考文献序号	特征碎片
1	0.65	D-吡喃葡萄糖	C ₆ H ₁₂ O ₆	179.055 2	179.055 0	0.195	[34, 35]	161.044 4, 119.033 5, 101.022 9, 89.022 8, 71.012 2, 59.012 2
2	1.95	香草酸	C ₈ H ₈ O ₄	167.033 9	167.033 8	0.025	[35, 36]	123.043 7, 152.009 5, 120.897 5
3	2.98	新绿原酸	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	353.086 7	353.087 5	0.841	[36, 38, 41, 42]	191.055 3, 179.034 0, 135.043 8, 173.044 5, 127.039 1, 111.043 6
4	3.82	咖啡酸	C ₉ H ₈ O ₄	179.034 1	179.033 8	0.215	[36]	161.044 6, 135.043 8, 93.033 0, 178.021 3
5	3.87	绿原酸	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	354.087 1	353.087 1	1.998	[38, 41, 42]	191.055 2, 179.033 9, 173.044 6, 135.043 6, 161.023 3
6	3.92	3-对香豆酰基奎宁酸	C ₁₆ H ₁₈ O ₈	337.093 9	337.091 7	2.196	[38]	191.055 2, 163.038 9, 119.048 7, 173.044 5, 93.033 0
7	4.19	3-O-阿魏酰奎宁酸	C ₁₇ H ₂₀ O ₉	367.102 6	367.102 3	0.331	[36, 38]	191.055 3, 173.044 6, 193.049 8, 127.038 7, 109.028 0
8	4.58	金丝桃苷	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	463.088 7	463.087 1	1.648	[35, 38]	301.035 4, 300.027 8, 315.051 1, 151.002 4, 285.040 8
9	4.85	4,5-二咖啡酰奎宁酸	C ₂₅ H ₂₀ O ₁₂	515.119 7	515.118 4	1.348	[39]	353.087 9, 173.044 5, 179.033 9, 135.043 8, 161.023 2, 93.032 9, 335.077 5
10	5.09	木樨草苷	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	447.093 5	447.092 1	1.292	[36]	284.032 9, 357.063 1, 327.051 0
11	5.34	苯甲酸	C ₇ H ₆ O ₂	121.028 0	121.028 4	0.326	[34, 35]	77.037 9
12	5.4	隐绿原酸	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	353.088 5	353.086 7	2.052	[38, 41, 42]	173.044 5, 135.043 8, 179.034 0, 93.032 9, 85.027 7
13	7.34	咖啡酸甲酯	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	193.049 8	193.049 5	3.896	[34, 36, 38]	108.020 2, 109.023 3, 93.033 0
14	7.84	异鼠李素	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	315.051 2	315.049 9	0.584	[35, 36, 40]	151.002 3, 300.027 8

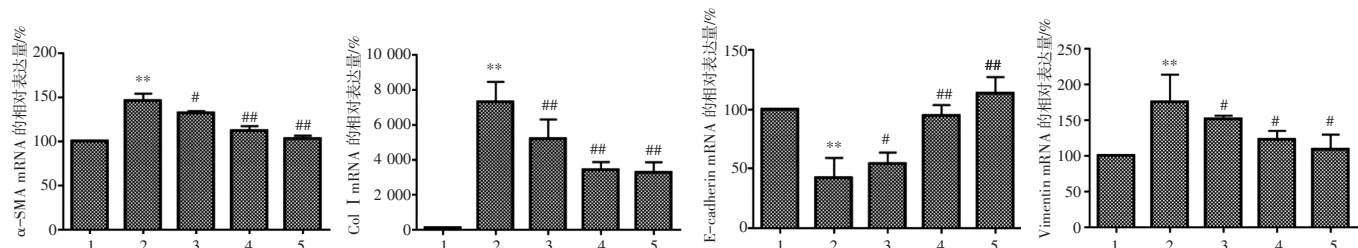
2.2 金银花石油醚部位对 A549 细胞增殖的抑制作用 金银花石油醚部对 A549 细胞的生长抑制作用呈浓度依赖性。加药 48 h 后，药物对细胞的 IC₅₀ 为

59.519 $\mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。
2.3 A549 细胞和小鼠肺组织 RT-PCR 分析结果 如图 2 所示，与空白对照组比较，模型组细胞的 Col I、

α -SMA 和 Vimentin mRNA 表达明显升高($P<0.01$), E-cadherin mRNA 表达明显降低($P<0.01$); 与模型组比较, 金银花石油醚部位组 Col I、 α -SMA 和 Vimentin mRNA 表达降低($P<0.05$, $P<0.01$), E-cadherin mRNA 表达升高($P<0.05$, $P<0.01$)。

如图 3 所示, 与假手术组比较, 模型组小鼠肺组

织 Col I、 α -SMA 和 Vimentin mRNA 表达明显升高($P<0.01$), E-cadherin mRNA 表达明显降低($P<0.01$); 与模型组比较, 吡非尼酮组和金银花石油醚部位组小鼠肺组织 E-cadherin mRNA 表达升高($P<0.05$, $P<0.01$), Col I、 α -SMA 和 Vimentin mRNA 表达降低($P<0.05$, $P<0.01$)。

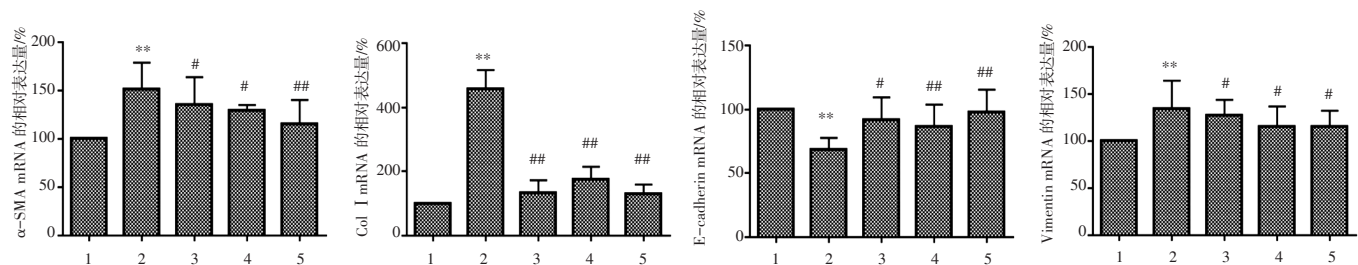


注: 1. 空白对照组; 2. 模型组; 3. 金银花石油醚部位 2.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组; 4. 金银花石油醚部位 5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组; 5. 金银花石油醚部位 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组。

与空白对照组比较, ** $P<0.01$; 与模型组比较, # $P<0.05$, ## $P<0.01$

图 2 金银花石油醚部位(PLJ)对 A549 细胞内 E-cadherin、Vimentin、 α -SMA、Col I mRNA 表达的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Figure 2 Effect of PLJ on the expression of E-cadherin, Vimentin, α -SMA, Col I mRNA in A549 cells($\bar{x} \pm s$, $n=3$)



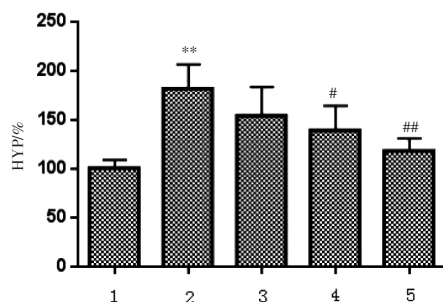
注: 1. 假手术组; 2. 博来霉素诱导的模型组; 3. 金银花石油醚部位 0.1 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组; 4. 金银花石油醚部位 0.2 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组; 5. 金银花石油醚部位 0.4 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组。与假手术组比较, ** $P<0.01$; 与模型组比较, # $P<0.05$, ## $P<0.01$

图 3 金银花石油醚部位(PLJ)对小鼠肺组织 E-cadherin、Vimentin、 α -SMA、Col I mRNA 表达的影响($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Figure 3 Effect of PLJ on the expression of E-cadherin, Vimentin, α -SMA, Col I mRNA in lung tissues($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

2.4 A549 细胞和小鼠肺组织中羟脯氨酸的含量 如图 4 所示, 与空白对照组比较, 模型组细胞羟脯氨酸含量升高($P<0.01$); 与模型组比较, 金银花石油醚部位作用于 A549 细胞后, 羟脯氨酸含量降低, 除 5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组外, 差异有统计学意义($P<0.05$, $P<0.01$)。如图 5 所示, 与假手术组小鼠比较, 模型组小鼠肺组织羟脯氨酸含量升高($P<0.01$); 与模型组比较, 吡非尼酮组和金银花石油醚部位组羟脯氨酸含量降低($P<0.05$, $P<0.01$)。

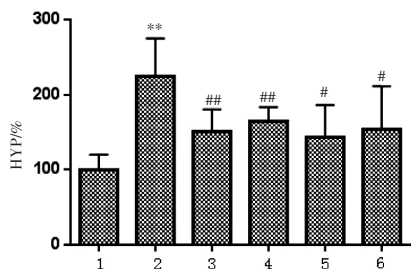
2.5 小鼠肺组织病理学变化 见图 6~8。HE 与 Masson 染色结果显示, 假手术组肺组织结构清晰, 有少量胶原沉积; 模型组肺间隔缩小, 炎性细胞大面积浸润肺泡组织, 肺泡壁明显增厚, 胶原大量沉积, 纤维化病变明显($P<0.01$); 与模型组比较, 吡非尼酮组和金银花石油醚部位组纤维化及炎症程度均有不同程度减轻, 差异均具有统计学意义($P<0.01$)。



注: 1. 空白对照组; 2. 模型组; 3. 金银花石油醚部位 2.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组; 4. 金银花石油醚部位 5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组; 5. 金银花石油醚部位 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组。与空白对照组比较, ** $P<0.01$; 与模型组比较, # $P<0.05$, ## $P<0.01$

图 4 金银花石油醚部位(PLJ)对 TGF- β 1 诱导的 A549 细胞的羟脯氨酸(HYP)含量的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Figure 4 Effect of PLJ on TGF- β 1-induced HYP content in A549 cells($\bar{x} \pm s$, $n=3$)



注：1. 假手术组；2. 博来霉素诱导的模型组；3. 吡非尼酮组；4. 金银花石油醚部位 0.1 mg·kg⁻¹ 组；5. 金银花石油醚部位 0.2 mg·kg⁻¹ 组；6. 金银花石油醚部位 0.4 mg·kg⁻¹ 组。与假手术组比较，***P* < 0.01；与模型组比较，**P* < 0.05，##*P* < 0.01

图 5 金银花石油醚部位 (PLJ) 对博来霉素诱导小鼠肺脏组织中羟脯氨酸(HYP)含量的影响($\bar{x} \pm s$, *n*=6)

Figure 5 Effect of PLJ on bleomycin-induced HYP content in lung tissues($\bar{x} \pm s$, *n*=6)

3 讨论

新型冠状病毒肺炎(COVID-19)常见后遗症——肺纤维化属于继发性病变，患者病情发展呈进行性，临床多见呼吸衰竭^[13-14]。中医药防治以其副作用

小、作用全面、疗效明显、不易产生依赖性等特点引起越来越多学者的关注，从中医药中寻找疾病治疗药效成分被认为是新药研发的有效途径和主要来源，并且植物提取物和中药活性化合物具有成分多样和多靶点的治疗优势，被称为“天然组合化学库”^[15]。专利数据分析^[16]显示，金银花是临床防治病毒性肺炎的主要中药材，仅次于甘草，居于第二位。其在 SARS 预防时期的中医组方中具有较高的使用频率^[17]。在防治 COVID-19 的中医组方中，金银花出现频率也超过 15%^[18]。目前金银花已作为重要组成药物出现在国家及地方发布的 COVID-19 预防和治疗方案^[19-23]中。

TGF-β1 是肺纤维化最常见的细胞诱导因子，可诱导上皮间质转化(epithelial mesenchymal transition, EMT)发生^[24-25]。通过抑制肺泡上皮细胞分子标志物钙依赖性黏附分子(E-cadherin)表达，破坏细胞极性和黏附性，增强细胞迁移能力；促进间质型细胞标志物胶原蛋白 I (Col I)、肌成纤维细胞特征性分泌物 α-平滑肌激动蛋白(α-SMA)以及与细胞修复相关

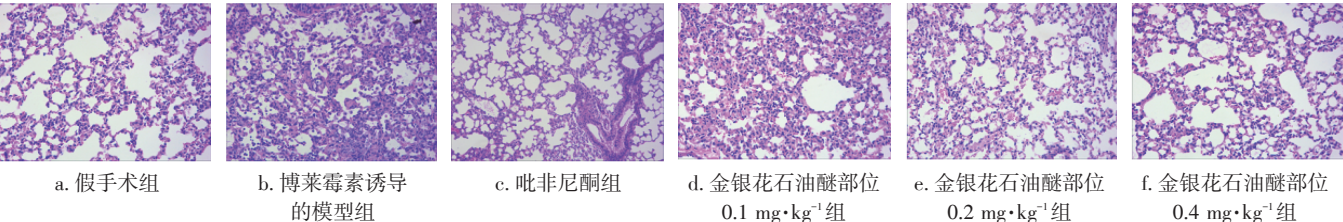


图 6 HE 染色的肺组织病理形态学改变(HE 染色，×200)

Figure 6 The pathomorphological changes of lung tissues(HE, ×200)

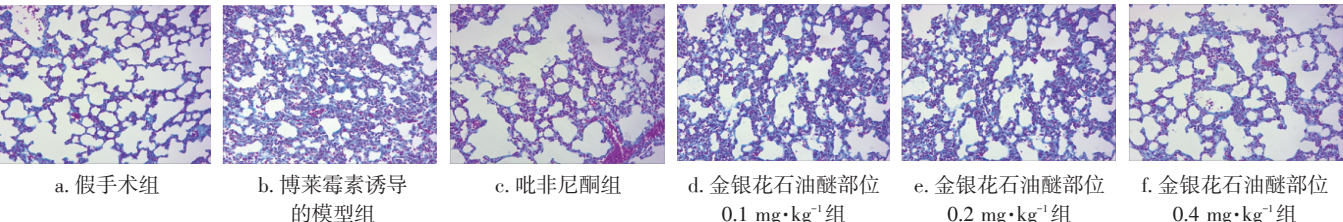
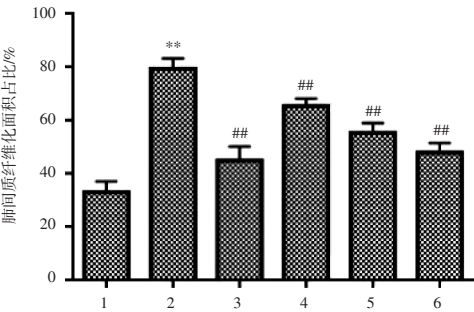


图 7 Masson 染色的肺组织病理形态学改变(Masson 染色，×200)

Figure 7 The pathomorphological changes of lung tissues (Masson staining, ×200)



注：1. 假手术组；2. 博来霉素诱导的模型组；3. 吡非尼酮组；4. 金银花石油醚部位 0.1 mg·kg⁻¹ 组；5. 金银花石油醚部位 0.2 mg·kg⁻¹ 组；6. 金银花石油醚部位 0.4 mg·kg⁻¹ 组。与假手术组比较，***P* < 0.01；与模型组比较，##*P* < 0.01

图 8 各组肺间质纤维化占比情况($\bar{x} \pm s$, *n*=6)

Figure 8 The percentage of pulmonary interstitial fibrosis in each group ($\bar{x} \pm s$, *n*=6)

的波形蛋白(Vimentin)表达,使细胞外基质过度沉积,纤维母细胞/肌纤维细母细胞异常增值,肺泡组织结构破坏^[26-27]。博来霉素(BLM)是新药药效评价及药物靶点探究中常用的肺纤维化动物模型诱导剂,其诱导的肺纤维化最符合临床病理组织学特征,可模拟人类肺纤维化进程^[28]。本研究以 TGF- β 1 诱导的 A549 细胞模型和博来霉素诱导的 C57BL/6 小鼠肺纤维化动物模型为研究对象,通过检测金银花石油醚部位对体内、体外 EMT 过程的干预作用,以探究其抗肺纤维化药效。研究发现,金银花石油醚部位给药后,与模型组比较,金银花石油醚部位组 A549 细胞和小鼠肺组织中 E-cadherin mRNA 表达均上调,Col I、 α -SMA、Vimentin mRNA 表达均下调。与模型组比较,细胞外基质胶原特殊氨基酸成分 HYP 表达均下降。小鼠肺组织 HE 和 Masson 染色结果显示,金银花石油醚部位可减少小鼠肺组织出现的区域实质性病变及胶原沉积,与目前美国食品药品监督管理局(FDA)承认的肺纤维化治疗药物——吡非尼酮治疗结果相近^[29]。提示金银花石油醚部位提取物通过抑制上皮间质转化过程发挥抗肺纤维化药效作用。此外,金银花石油醚部位 LC-MS 成分分析结果与以往治疗肺纤维化的植物提取物及活性化合物药物成分具有类别相似性,均为酚类或黄酮类成分^[30-33],进一步提示金银花具有抗肺纤维化药效活性。

综上所述,植物源性金银花石油醚部位可作为肺纤维化的潜在治疗药物,具有良好的开发前景。本课题组后续将对其提取物中具体抑制肺纤维化的单分子化合物进行鉴定,并对分子间的相互作用进一步分析。

参考文献:

- [1] LIU R M, LIU G. Cell senescence and fibrotic lung disease[J]. *Exp Gerontol*, 2020, 132(12): 110836-110843.
- [2] YE Z, ZHANG Y, WANG Y, et al. Chest CT manifestation of new coronavirus disease 2019 (COVID-19): a pictorial review[J]. *Eur Radiol*, 2020, 30(8): 4381-4389.
- [3] 马林纳,王瑞,苗明三. 基于数据挖掘的治疗肺纤维化中药用药规律分析[J]. *中草药*, 2020, 51(6): 1406-1411.
- [4] 刘清泉,夏文广,安长青,等. 中西医结合治疗新型冠状病毒肺炎作用的思考[J]. *中医杂志*, 2020, 61(6): 463-464.
- [5] 于生兰. 金银花的研究进展[J]. *时珍国医国药*, 2002, 13(8): 498-500.
- [6] 林丽美,王智民,王金华,等. 金银花、连翘及银翘药对水煎剂的抗炎、解热作用研究[J]. *中国中药杂志*, 2008, 33(4): 473-475.
- [7] 李琳,林轶静,王红阳. 清金补肺汤对博来霉素致大鼠肺纤维化干预作用的研究[J]. *现代中西医结合杂志*, 2012, 21(20): 2188-2190.
- [8] 王国亮,朱信强,王金凤,等. 豫北平原栽培金银花精油化学成分分析[J]. *中国中药杂志*, 1992, 17(5): 268-279.
- [9] DIMITROULIS I A. Nintedanib: a novel therapeutic approach for idiopathic pulmonary fibrosis[J]. *Resp Care*, 2014, 59(9): 1450-1455.
- [10] 于生兰. 金银花的研究进展[J]. *时珍国医国药*, 2002, 13(8): 498-500.
- [11] YILDIRIM A, ERSOY Y, ERCAN F, et al. Phosphodiesterase-5 inhibition by sildenafil citrate in a rat model of bleomycin-induced lung fibrosis[J]. *PulmPharmacolTher*, 2010, 23(3): 215-221.
- [12] CHEN L, WANG T, WANG X, et al. Blockade of advanced glycation end product formation attenuates bleomycin induced pulmonary fibrosis in rats[J]. *RespRes*, 2009, 10(1): 55-63.
- [13] DHARMAWATI I G A A, MAHADEWA T G B, WIDYADHARMA I P G. Antibacterial activity of lumbricus rubellus earthworm extract against porphyromonas gingivalis the bacterial cause of periodontitis [J]. *Open Access Maced J Med Sci*, 2019, 7(6): 1032-1036.
- [14] KHANUM I, SAMAR F, FATIMAH Y, et al. Role of awake prone positioning in patients with moderate-to-severe COVID-19: an experience from a developing country[J]. *Monaldi Arch Chest Dis*, 2021, 91(2): 1561-1565.
- [15] HOSSEINI S A, ZAHEDIPOUR F, SATHYAPALAN T, et al. Pulmonary fibrosis: therapeutic and mechanistic insights into the role of phytochemicals[J]. *Biofactors*, 2021, 2(6): 1713-1733.
- [16] 陈慧君,刘化冰. 利用专利大数据探索防治新型冠状病毒肺炎的中药材[J]. *中国发明与专利*, 2020, 17(3): 57-61.
- [17] VENKATARAMAN T, FRIEMAN M B. The role of epidermal growth factor receptor(EGFR) signaling in SARS coronavirus-induced pulmonary fibrosis[J]. *Antiviral Res*, 2017, 5(143): 142-150.
- [18] 沈洁,郑敏霞,谢升阳,等. 新型冠状病毒肺炎中医药防治组方规律分析[J]. *中国药业*, 2020, 29(6): 25-28.
- [19] 谢又佳,梁虹艺,林伟斌,等. 中西医结合治疗新型冠状病毒肺炎中潜在药物相互作用途径[J]. *实用医学杂志*, 2020, 36(7): 842-848.
- [20] 郑文科,张俊华,杨丰文,等. 中医药防治新型冠状病毒肺炎各地诊疗方案综合分析[J]. *中医杂志*, 2020, 61(4): 277-280.
- [21] 王玉光,齐文升,马家驹,等. 新型冠状病毒肺炎中医临床特征与辨证治疗初探[J]. *中医杂志*, 2020, 61(4): 281-285.
- [22] 岳丽娜,陈纲,牛玉兰,等. 150例新型冠状病毒肺炎CT影像表现分析[J]. *医疗卫生装备*, 2020, 41(5): 1-5.
- [23] 张思依,向阳,高清华,等. 新冠康复颗粒对于新型冠状病毒肺炎痊愈后肺纤维化保护机制的网络药理研究[J]. *湖北中医药大学学报*, 2020, 22(5): 16-21.
- [24] LI J, ZHANG X, WANG T, et al. The MIR155 host gene/micro RNA-627/HMGB1/NF- κ B loop modulates fibroblast proliferation and extracellular matrix deposition[J]. *Life sciences vol*, 269(1): 119085-119115.

- [25] HUANG G, ZHANG J, QING G, et al. S100A2 silencing relieves epithelial-mesenchymal transition in pulmonary fibrosis by inhibiting the Wnt/ β -Catenin signaling pathway[J]. *DNA Cell Biol*, 2021, 40(1): 18-25.
- [26] PHILP C J, SIEBEKE I, CLEMENTS D, et al. Extracellular matrix cross-linking enhances fibroblast growth and protects against matrix proteolysis in lung fibrosis[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2018, 58(5): 594-603.
- [27] UPAGUPTA C, SHIMBORI C, ALSILMI R, et al. Matrix abnormalities in pulmonary fibrosis[J]. *Eur Respir Rev*, 2018, 27(148): 180033-180038.
- [28] GAMAD N, MALIK S, SUCHAL K, et al. Metformin alleviates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats: pharmacological effects and molecular mechanisms[J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 97: 1544-1553.
- [29] SEIFIRAD S, ALQURAN L. Commentary: antifibrotics in COVID-19 lung disease: let us stay focused[J]. *Front Med (Lausanne)*, 2021, 1(7): 625440-625443.
- [30] IMPELLIZZERI D, TALERO E, SIRACUSA R, et al. Protective effect of polyphenols in an inflammatory process associated with experimental pulmonary fibrosis in mice[J]. *Br J Nutr*, 2015, 114(6): 853-865.
- [31] IMPELLIZZERI D, BRUSCHETTA G, DI P R, et al. The anti-inflammatory and antioxidant effects of bergamot juice extract (BJe) in an experimental model of inflammatory bowel disease[J]. *Clin Nutr*, 2015, 34(6): 1146-1154.
- [32] LIU Q, JIANG J X, LIU Y N, et al. Grape seed extract ameliorates bleomycin-induced mouse pulmonary fibrosis[J]. *Toxicol Lett*, 2017, 5(273): 1-9.
- [33] KHAZRI O, CHARRADI K, LIMAN F, et al. Grape seed and skin extract protects against bleomycin-induced oxidative stress in rat lung[J]. *Biomed Pharmacother*, 2016, 4(81): 242-249.
- [34] 王旭, 周洪雷, 容蓉. 金银花化学成分研究[J]. *中药材*, 2016, 39(9): 2030-2032.
- [35] 倪付勇, 温建辉, 李明, 等. 金银花化学成分研究[J]. *中草药*, 2017, 48(18): 3689-3692.
- [36] 万昶宸, 刘艳艳, 杨浩天, 等. HPLC-MS/MS法同时测定紫菀中 9 种化学成分[J]. *中草药*, 2016, 47(14): 2534-2539.
- [37] 白雪, 黄惠锋, 吴修红, 等. HPLC-DAD-MS/MS法分析金银花中化学成分[J]. *食品与药品*, 2015, 17(1): 5-8.
- [38] 赵娜娜, 孟令文, 孙道磊, 等. 金银花体外抑制乙酰胆碱酯酶活性部位筛选及液质联用分析研究[J]. *时珍国医国药*, 2017, 28(10): 2358-2360.
- [39] 张倩, 张加余, 隋丞琳, 等. HPLC-DAD-ESI-MS/MS研究金银花水提工艺中绿原酸类成分的变化规律[J]. *中国中药杂志*, 2012, 37(23): 3564-3568.
- [40] 李云. 基于LC-HR-MS-n的小儿清解颗粒成分分析与体内代谢研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2016.
- [41] 张阿琴, 李迦娜, 张仓, 等. LC-MS分析消癌平注射液中有有机酸类成分[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2012, 18(4): 88-90.
- [42] 霍江燕. LC-MS测定复方脑得生多元组合样品中有效成分含量研究[D]. 广州: 广东药科大学, 2016.

(编辑: 修春)