

## 环杷明与香青兰总黄酮联合用药对肺纤维化小鼠的影响

吕佳敏<sup>1,2</sup>, 唐云辉<sup>2</sup>, 何承辉<sup>1\*</sup>, 翟科峰<sup>2\*</sup>, 段红<sup>2</sup><sup>1</sup>新疆维吾尔自治区药物研究所, 乌鲁木齐 830004; <sup>2</sup>宿州学院生物与食品工程学院, 宿州 234000

**摘要:** 研究环杷明 (Cyc) 和香青兰总黄酮 (TFDM) 联合用药对肺纤维化 (PF) 小鼠的影响及作用机制。将 C57BL/6 小鼠随机分成 5 组, 每组 10 只, 即正常对照组、模型组、TFDM 组 (360 mg/kg)、Cyc 组 (5 mg/kg) 和 TFDM 组 (360 mg/kg) + Cyc 组 (5 mg/kg)。采用气管内滴注博来霉素 (4 mg/kg) 构建小鼠 PF 模型, 正常对照组给予等量蒸馏水, 建模第二天, 给予相应药物干预, 连续给药 28 d。肺功能检测采用 AniRes2005 动物肺功能分析系统进行。肺组织进行冰冻切片的制作, 使用 HE 染色和 Masson 染色观察肺组织病理情况; 水解法测定肺组织羟脯氨酸 (HYP) 含量; 采用 Western blot 检测各组小鼠 1 型胶原蛋白 (Col-1)、纤维连接蛋白 (FN1)、 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白 ( $\alpha$ -SMA)、SHH、Pth1、SMO、Gli1 和 SUFU 蛋白表达。结果显示与正常对照组比较, HE 染色中模型组肺组织结构异常, 出现炎性细胞浸润; Masson 染色中出现较多被染成蓝色的胶原纤维化组织, 肺组织被严重损伤; HYP 含量显著升高 ( $P < 0.01$ ); 肺功能检测显示吸气相气道阻力 (RL)、呼气相气道阻力 (RE) 和 FEV0.1/FVC 显著升高, 肺动态顺应性 (Cdyn)、用力肺活量 (FVC) 和呼气峰流速 (PEF) 显著降低 ( $P < 0.01$ ); Western blot 的结果可得知模型组肺组织中 Col-1、FN1、 $\alpha$ -SMA、SHH、Pth1、SMO 和 Gli1 蛋白表达水平显著升高, SUFU 蛋白表达水平显著减低 ( $P < 0.01$ )。与模型组相比, Cyc 组和 TFDM 组肺组织结构正常, 几乎无炎性细胞浸润; Masson 染色可以看出, 蓝色纤维组织较少, 肺组织纤维化程度得到缓解; HYP 含量上调 ( $P < 0.01$ ); 肺功能检测显示 RL、RE 和 FEV0.1/FVC 显著下降, Cdyn 和 FVC 和 PEF 显著升高 ( $P < 0.01$ ); Western blot 显示 PF 小鼠肺组织中 Col-1、FN1、 $\alpha$ -SMA、SHH、Pth1、SMO 和 Gli1 蛋白表达水平显著下调, SUFU 蛋白表达水平显著升高 ( $P < 0.01$ )。TFDM 可以在一定程度上改善小鼠 PF, 进一步得出结论 Cyc 和 TFDM 联合用药能更好地发挥作用。

**关键词:** 香青兰总黄酮; 肺纤维化; 博来霉素; 环杷明; Hedgehog 信号通路

中图分类号: R961

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2024)1-0109-08

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2024.1.013

Effects of the combination of cycloheximide and total flavonoid from *Dracocephalum moldavica* L. on mice with pulmonary fibrosisLYU Jia-min<sup>1,2</sup>, TANG Yun-hui<sup>2</sup>, HE Cheng-hui<sup>1\*</sup>, ZHAI Ke-feng<sup>2\*</sup>, DUAN Hong<sup>2</sup><sup>1</sup>Xinjiang Medicine Research Institute, Urumqi 830004, China;<sup>2</sup>College of biological and food engineering, Suzhou University, Suzhou 234000, China

**Abstract:** To study the effect and mechanism of the combination of cycloheximide (Cyc) and total flavonoids from *Dracocephalum moldavica* (TFDM) on mice with pulmonary fibrosis (PF). Fifty C57BL/6 mice were randomly divided into five groups of 10 mice each according to body weight, namely, normal group, model group, TFDM group (360 mg/kg), Cyc group (5 mg/kg) and TFDM group (360 mg/kg) + Cyc group (5 mg/kg). A mouse pulmonary fibrosis model was constructed using intratracheal drip bleomycin (4 mg/kg), and the normal control group was given equal amounts of distilled water, and after the second day of modeling, the corresponding drug was given for 28 consecutive days. After the final dose, lung function tests were performed using the AniRes2005 animal lung function analysis system. The lung tissues were removed for HE staining to observe the degree of inflammation and Masson staining to observe the degree of fibrosis. The hydroxyproline (HYP) content of lung tissues was determined by hydrolysis. The expression of collagen Type 1 (Col-1), fibronectin (FN1),  $\alpha$ -Smooth mus-

收稿日期: 2023-07-25 接受日期: 2023-11-06

基金项目: 国家自然科学基金 (81960788, 82170481); 安徽省自然科学基金 (2008085J39); 高校优秀青年骨干人才国外访学研修项目 (gxfw2021038)

\* 通信作者 E-mail: hchxywyjs@163.com, kcfengzhai@163.com

cle actin ( $\alpha$ -SMA), SHH, Ptc1, SMO, Gli1 and SUFU proteins in each group of mice were detected by Western blot. Compared with the blank group, HE staining showed abnormal lung tissue structure and inflammatory cell infiltration in the model group. Masson staining showed more collagenous fibrotic tissue stained blue and severe lung tissue damage. HYP content was significantly higher ( $P < 0.01$ ). Pulmonary function tests showed significantly higher inhalation phase airway resistance of lung (RL), expiratory phase airway resistance of expiration (RE) and FEV0.1/FVC and significantly lower significant increases in respiratory dynamic compliance (Cdyn), force vital capacity (FVC) and peak expiratory flow rate (PEF) ( $P < 0.01$ ). The results of Western blot showed that the lung tissues of model group showed elevated expression levels of Col-1, FN1,  $\alpha$ -SMA, SHH, Ptc1, SMO and Gli1 proteins and significantly reduced expression levels of SUFU protein ( $P < 0.01$ ). Compared with the model group, the normal lung tissue structure and reduced inflammatory cell infiltration in the Cyc group and TFDM groups. Less blue fibrous tissue and remission of fibrosis in the lung tissue as evidenced by Masson staining. HYP content was upregulated ( $P < 0.01$ ). Pulmonary function tests showed significant decreases in RL, RE and FEV0.1/FVC and Cdyn and FVC and PEF ( $P < 0.01$ ). Western blot showed that the expression levels of Col-1, FN1,  $\alpha$ -SMA, SHH, Ptc1, SMO and Gli1 proteins were significantly downregulated and the expression level of SUFU protein was significantly increased in lung tissues of mice with PF ( $P < 0.01$ ). TFDM can improve mouse PF to some extent, further concluding that the combination of Cyc and TFDM works better.

**Key words:** total flavonoid from *Dracocephalum moldavica* L.; pulmonary fibrosis; bleomycin; cyclopamine; Hedgehog signaling pathway

肺纤维化(pulmonary fibrosis, PF)是一种慢性进行性肺疾病,具有明显的组织病理模式,包括大量慢性呼吸系统病变,并伴有各肺间室结缔组织生长,其中间质性肺疾病和特发性肺纤维化(idiopathic pulmonary fibrosis, IPF)是肺实质进行性纤维化的最严重且不可逆的疾病<sup>[1,2]</sup>。PF是由组织修复异常引起的,并与持续严重的组织损伤和细胞应激有关。这种异常的性质涉及上皮细胞屏障修复不足,并伴有成纤维细胞的调节受损,从而导致肺泡上皮细胞和成纤维细胞的深刻变化,导致不受控制的纤维化,其特征是纤维化肺泡壁增厚,导致气体传递受损,通气模式受限,从而导致呼吸衰竭<sup>[3]</sup>。近几年,在现代医学领域中PF疾病严重危害了人的健康,由于诊断方法的不断进步以及人口老龄化,PF的死亡率和发病率持续上升,该疾病发病原因复杂,病理机制尚不清楚,患者临床表现为进行性肺组织顺应性减退,弥散功能降低,通气/血流比例失调,导致患者出现难治性呼吸困难,最终呼吸衰竭而死亡<sup>[4]</sup>。

Hedgehog(Hh)通路在胚胎发生发育以及组织重塑中有重要作用。Hh信号转导通路主要由信号分子(SHH、IHH、DHH)、跨膜受体(Ptc、SMO)、下游转录因子(Gli1蛋白家族)组成,Hh通路激活后主要通过Gli1蛋白家族发挥作用<sup>[5]</sup>。IPF中已证实Hh通路活性增加,在进行纤维化重塑的区域,分别在肺泡上皮和下层成纤维细胞中检测到SHH及其信号效应物的显著表达<sup>[6]</sup>。在肺中,SHH处理增加了成纤维细胞的增殖、存活、迁移和细胞外基质(ex-

tracellular matrix, ECM)的产生,但没有升高 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -smooth muscle actin,  $\alpha$ -SMA)的表达<sup>[7]</sup>。在博来霉素诱导的PF模型中,气道和肺泡上皮细胞中SHH表达升高。在博来霉素模型中,抑制Hh信号传导不能阻止纤维化,但纤维化期SHH过表达会加重PF<sup>[8]</sup>。因此,尽管SHH信号对正常肺发育和维持间质静止至关重要,但它在PF中也被慢性激活。

环杷明(cyclopamine, Cyc)是一种异甾体类生物碱,同时是Hh信号通路的抑制剂。通过改变SMO的空间构象,从而抑制SMO的活性,来抑制Hh信号通路的下游信号传导,从而使Hh通路处于抑制状态<sup>[9]</sup>。Cyc能够抑制肿瘤基因的转录与表达,干预SHH介导的Hh信号通路,发挥抗肿瘤与抗PF的作用,进而抑制相关疾病进程<sup>[10]</sup>。相关研究表明,通过与Hh信号通路中的SMO蛋白结合,影响SMO蛋白下游信号的传导,可减少 $\alpha$ -SMA和I型胶原蛋白(collagen type 1, Col-1)蛋白的相关表达,从而减弱甚至阻止超敏C反应蛋白的这种变化,进而改善门静脉高压症<sup>[11]</sup>。另外Cyc等干扰Hh信号的药物可能有助于预防前列腺癌细胞的雄激素抵抗和疾病进展<sup>[12]</sup>。Hh信号通路影响疾病的发生和发展,然而,Cyc在PF相关疾病中的作用尚不清楚。

香青兰(*Dracocephalum moldavica* L.)是唇形科植物,以全草地上部分入药,主要化学成分为挥发油、多糖、萜类、黄酮类、氨基酸、微量元素,具有保护心脑血管、抗动脉粥样硬化、防哮喘、清热解毒、活血

通络、抗氧化、调节血脂异常等多种药理作用,同时具有疏风清热、感冒发热、咳嗽气喘等功效<sup>[13,14]</sup>。研究发现,香青兰含有的黄酮类化合物共有 41 种,而香青兰的药用功效主要来源于黄酮类化合物<sup>[15]</sup>。前期研究证明,TFDM 作为香青兰的主要有效成分之一,对于镇咳平喘具有非常有效的作用,可明显减缓小鼠的气道内部的高反应性,从而修复肺功能的损伤<sup>[16]</sup>。使小鼠体内的白细胞介素-6 (Interleukin-6, IL-6)、白细胞介素-17 (interleukin-17, IL-17) 和肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) 等大量释放,从而明显降低白细胞介素-4 (Interleukin-4, IL-4)/干扰素- $\gamma$  (Interferon- $\gamma$ , IFN- $\gamma$ ) 的比值,从而调整了 Th1/Th2 的免疫失衡状态<sup>[17,18]</sup>。其中,TFDM 能够通过减少肺部组织中 Col-1 含量,进而控制 NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3 (NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3, NLRP3) 表达,最后实现了缓解 PF 的目的<sup>[13]</sup>。并且前期研究已经证明,香青兰总黄酮 (total flavonoid from *Dracocephalum moldavica* L., TFDM) 可以通过下调或上调 Hh 信号通路的 SHH、Ptc1、SMO、SUFU、Gli1 等重要调控蛋白从而有效缓解由博来霉素引起的 PF<sup>[19]</sup>。因此本文基于 Hh 信号通路研究 Cyc 和 TFDM 对 PF 的作用机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物

雄性 6~8 周龄 C57BL/6 小鼠 50 只 (SPF 级), 体重为  $28 \pm 2$  g, 购自河南斯克贝斯生物科技股份有限公司, 许可证号 SCXK (豫) 2020-0005。适应性饲养一周于 12 h 光照/12 h 黑暗环境中, 操作均符合新疆维吾尔自治区药物研究所实验室伦理标准, 伦理审批号为 XJIMM-20211025。

### 1.2 药物与试剂

TFDM 提取物 (批号 20210320, 新疆维吾尔自治区药物研究所); Cyc (货号: C860641-100 mg)、硫酸博来霉素 (批号: B802467-100 mg)、水合氯醛 (批号: C804539-100 g) (上海麦克林生化科技有限公司); HYP 检测试剂盒 (批号: YFX0111)、Masson 染色试剂盒 (批号: YFX1293) (南京翼飞雪生物科技有限公司); 苏木精-伊红染液 (上海 Beyotime 生物有限公司, 批号, C0105); BCA 蛋白浓度定量试剂盒 (批号: E112-01)、RIPA 裂解液 (批号: E311-02) (南京 Vazyme 生物科技股份有限公司); 二抗兔抗和鼠抗 (Bioworld, 货号, AB45151); 一抗 Col-1 (批号:

14695-1-AP)、 $\alpha$ -SMA (批号: 20697-1-AP)、FN1 (批号: 15613-1-AP)、SHH (批号: 20697-1-AP)、SUFU (批号: 26759-1-AP)、Gli1 (批号: 66905-1-AP) (Proteintech 公司); SMO 抗体 (批号: E1A743G, 南京恩晶生物科技有限公司); GAPDH 抗体 (批号: AP0063, Bioworld)。

### 1.3 仪器

Tecan Infinite200 酶标测定仪 (瑞士); Leica CM1850UV 冷冻切片机 (德国 Leica); Leica 正置荧光显微镜 (德国); 电泳仪和电泳槽 (美国 Bio-Rad); Sartorius 高速冰冻离心机 (德国); Touch Imager 成像系统 (上海易亨特光电技术有限公司); AniRes2005 动物肺功能分析系统 (北京贝兰博有限公司)。

### 1.4 动物分组、造模及给药

选用 50 只 SPF 级 C57BL/6 小鼠, 随机分为 5 组: 即正常对照组 (control, Con)、模型组 (model, Mod)、香青兰总黄酮组 (360 mg/kg, TFDM)<sup>[19]</sup>、环杷明 (cyclopamine, Cyc) 组 (5 mg/kg) 和香青兰总黄酮组 + 环杷明抑制剂组 (TFDM + Cyc), 除正常组外, 其余各组气管内滴入博来霉素 (4 mg/kg) 构建小鼠 PF 模型。小鼠腹腔注射 5% 的水合氯醛, 分离暴露气管。使用 1 mL 注射器吸取博来霉素药液, 朝两环骨间刺入小鼠气管, 然后推入博来霉素药液。给药结束后, 直立起解剖板, 并晃动使博来霉素药液均匀分布在肺中。随后在相同条件下, 空白小鼠气管内滴注等体积的生理盐水。造模第 2 d, 正常组和模型组分别灌胃给予等体积的蒸馏水, 给药组给予对应药物, 即 Cyc 组灌胃给予 5 mg/kg 的 Cyc 混悬液, TFDM 组灌胃给予 360 mg/kg 的 TFDM 混悬液、TFDM + Cyc 组灌胃给予 TFDM (360 mg/kg) 和 Cyc (5 mg/kg) 的混合悬液, 每日灌胃 1 次, 连续四周。

### 1.5 水解法测定 PF 小鼠肺组织中 HYP 的含量

使用试剂盒的操作说明, 每组提取适量肺组织, 在组织匀浆器中研磨成匀浆, 在磨好的匀浆中滴加 6 mol/L 的盐酸, 随后转移至 1.5 mL 的 EP 管中, 在水浴锅中煮沸, 随后使用高速离心机在 12 000 r/min, 25 °C 的条件下, 离心 25 min。最后用 NaOH 调节 PH 至 6~8, 并用纯水标定体积, 使用上清液, 在 560 nm 处进行 OD 值测定, 计算 HYP 的含量。

### 1.6 肺组织病理学检查

首先制作肺组织冰冻切片, 取适量肺组织, 使用 PBS 冲洗干净, 随后使用 OCT 包埋胶将肺组织包埋于载物托上, 立即放置于冰冻切片机中进行低温冷冻, 将肺组织切成 8  $\mu$ m 的薄片并贴于载玻片上。

切片完毕后,使用制作好的切片,进行 HE 染色和 Masson 染色观察肺组织病理的情况。

1.7 PF 小鼠肺功能检测

末次给药后,用 5% 水合氯醛 6 mL/kg 麻醉小鼠,逐层分离气管,行气管插管,将气管另一端连于小鼠体锚箱,密闭体锚箱,采用肺功能仪中的 Ani-Res2005 动物肺功能分析系统,进行吸气相气道阻力 (inhalation phase airway resistance of lung,RL)、呼气相气道阻力 (expiratory phase airway resistance of expiration,RE)、肺顺应性 (respiratory dynamic compliance,Cdyn)、用力肺活量 (force vital capacity,FVC)、呼气峰流速 (peak expiratory flow rate,PEF) 和 FEV0.1/FVC 相应数据的采集。

1.8 Western blot 法测定 PF 小鼠肺组织中的蛋白表达水平

取每组适量肺组织,放入组织匀浆器中加入 RIPA 裂解液进行研磨,研磨至匀浆后在高速离心机上在 4 ℃ 12 000 r/min 的条件下,离心 5 min。转移上清液至 1.5 mL 的 EP 管中,测定蛋白浓度,使用 BCA 蛋白定量法。随后对定量后的蛋白进行凝胶电泳,电泳结束后,将蛋白条带转移到 PVDF 膜上,5% BSA 室温封闭,随后加入一抗稀释液 Col-1、FN1、α-SMA、SHH、Ptc1、SMO、Gli1 和 SUFU 放置 4 ℃ 冰箱过夜。第二天孵育二抗,并使用 ECL 显出蛋白条带,Touch Imager 成像系统采集条带图像,将条

带用 Alpha View SA 图像分析软件进行半定量分析,结果用灰度值表示。

1.9 统计学处理

采用 GraphPad Prism 8 软件进行统计学分析,结果以平均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,采用单因素方差 (ANOVA) 分析, Dunnett 事后检验,用于确定 *P* 值,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Cyc 与 TFDM 对 PF 小鼠肺组织病理学的影响

探究 Cyc 与 TFDM 对 PF 小鼠肺组织病理学的影响。通过 HE 染色 (见图 1A),可以观察到,正常对照组小鼠肺组织结构完整,未见炎症细胞浸润;模型组小鼠肺组织结构被严重破坏,肺泡间隔明显增厚,伴有大量炎症细胞浸润;与模型组比较 Cyc 组和 TFDM 组小鼠肺组织结构基本完整,炎症细胞浸润明显减少,另外 TFDM + Cyc 组与单独给予 Cyc 组和 TFDM 组相比,可以更明显地看出肺组织结构恢复正常形态,肺泡结构正常,几乎无炎性细胞浸润。Masson 结果显示 (见图 1B),正常对照组小鼠肺组织结构完整,几乎无蓝色纤维组织,与正常对照组相比,模型组肺组织出现大量蓝色纤维组织,肺组织纤维化程度显著;Cyc 组和 TFDM 组肺组织纤维化程度得到明显缓解,与 Cyc 组和 TFDM 组相比,TFDM + Cyc 组可明显看出几乎无蓝色胶原纤维组织,肺组织得到明显修复。

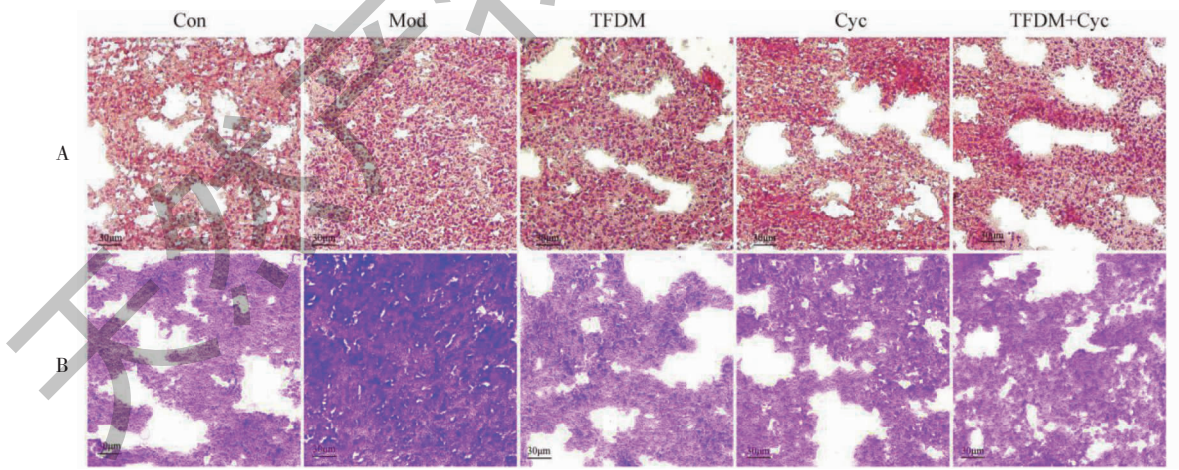


图 1 Cyc 与 TFDM 对 PF 小鼠肺组织病理学的影响 (×200)

Fig. 1 Effect of Cyc and TFDM on lung histopathology in PF mice (×200)

注:A. HE 染色;B. Masson 染色,比例尺为 30 μm。Note:A. HE staining;B. Masson staining,scale bar is 30 μm.

2.2 Cyc 与 TFDM 对 PF 小鼠肺功能的调控

通过 AniRes2005 肺功能分析系统检测了 PF 小

鼠的 RL、RE、Cdyn、FVC、PEF 和 FEV0.1/FVC 肺功能指标。结果如图所示 (见图 2),与正常对照组比

较,PF 损伤模型 RL、RE 和 FEV0.1/FVC 显著升高 ( $P < 0.01$ ), Cdyn、FVC 和 PEF 显著降低 ( $P < 0.01$ ),符合 PF 肺功能状态。给予 Cyc 和 TFDM 干预后,RL、RE 和 FEV0.1/FVC 显著下降 ( $P < 0.01$ ),Cdyn、FVC 和 PEF 显著上调 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ),另外进行组间比较与 TFDM 组相比,TFDM

组 + Cyc 组 RL、RE 和 FEV0.1/FVC 下降 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ),Cdyn、FVC 和 PEF 显著上调 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ),有明显差异,与单独给药 Cyc 组相比,TFDM 组 + Cyc 组 RE 和 FEV0.1/FVC 下降 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ),其中 RL 呈现下降趋势,但数据无明显差异,Cdyn、FVC 和 PEF 上调 ( $P < 0.05$ )。

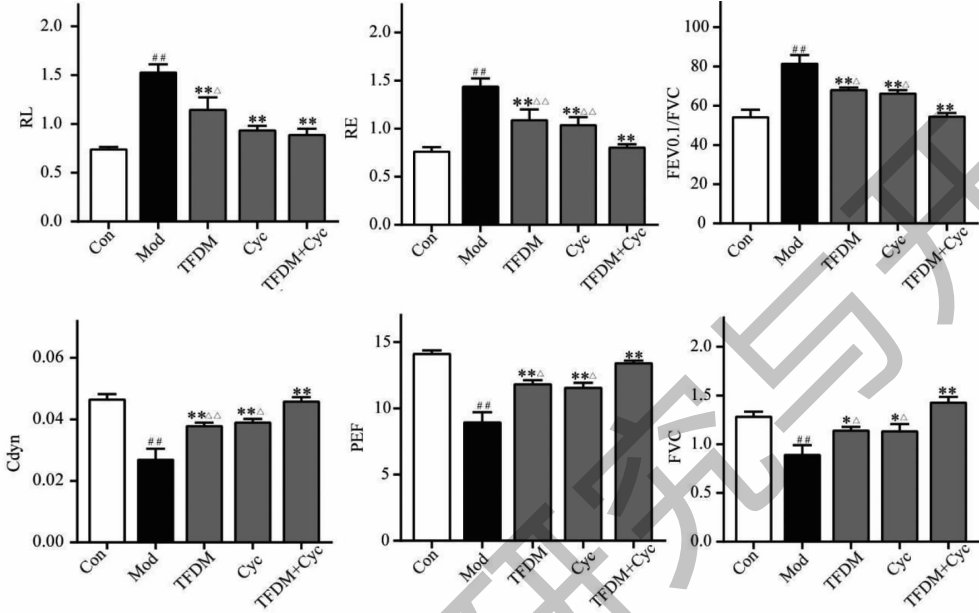


图2 Cyc 与 TFDM 对 PF 小鼠肺功能的调控( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Fig. 2 Regulation of lung function in PF mice by Cyc and TFDM( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

注:与正常组比较,## $P < 0.01$ ;与模型组比较,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ ;与 TFDM 组 + Cyc 组比较,Δ $P < 0.05$ ,ΔΔ $P < 0.01$ (图 3 ~ 5 同)。  
Note:Compared with the normal group,## $P < 0.01$ ;Compared with the model group,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ ;Compared with the TFDM + Cyc group,Δ $P < 0.05$ ,ΔΔ $P < 0.01$ (Fig. 3-5 are the same).

2.3 Cyc 与 TFDM 对肺组织中 HYP 含量的影响

如图 3 所示,与正常对照组比较,模型组小鼠肺组织中 HYP 含量显著升高,差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ );与模型组比较,Cyc 组和 TFDM 组肺组织

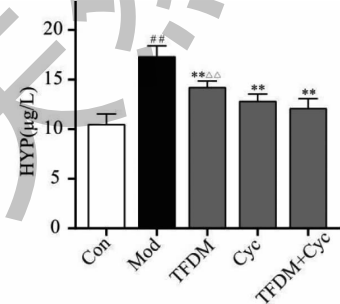


图3 Cyc 与 TFDM 对肺组织中 HYP 含量的影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Fig. 3 Effect of Cyc and TFDM on HYP levels in lung tissues( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

中 HYP 含量明显下降,差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ );与 TFDM 组相比,TFDM + Cyc 组肺组织中 HYP 含量显著下降 ( $P < 0.01$ ),有明显差异;另外 TFDM + Cyc 组与单独给药 Cyc 组相比, $P > 0.05$ ,无明显差异。

2.4 Cyc 与 TFDM 对肺组织中 PF 蛋白表达的影响

结果如图 4 所示,与正常对照组比,模型组小鼠肺组织中 Col-1、FN1、α-SMA 蛋白表达升高 ( $P < 0.01$ );与模型组相比,Cyc 组和 TFDM 组小鼠肺组织中 Col-1、FN1、α-SMA 蛋白表达显著降低 ( $P < 0.01$ );另与 TFDM 组相比,TFDM 组 + Cyc 组 Col-1、FN1、α-SMA 蛋白显著降低 ( $P < 0.01$ ),具有显著性差异;同时 TFDM 组 + Cyc 组与单独给药 Cyc 组相比,α-SMA 蛋白显著降低 ( $P < 0.01$ ),其中 Col-1、FN1 蛋白呈现下降趋势,但数据无明显差异。

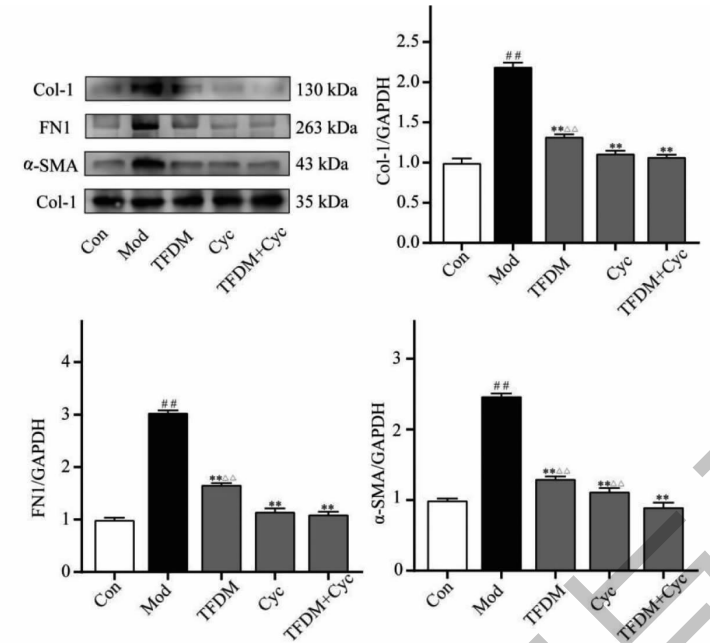


图4 Cyc 与 TFDM 对肺组织中 PF 蛋白表达的影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Fig. 4 Effect of Cyc and TFDM on PF protein expression in lung tissue( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

2.5 Cyc 与 TFDM 对肺组织中 Hh 信号通路蛋白表达的影响

如图 5 所示,使用 Western blot 的方法验证分析,检测了小鼠肺组织中 Hh 信号通路中 SHH、SMO、Gli1 和 SUFU 蛋白的表达水平。结果如图 5 所示,SHH、SMO、Gli1 蛋白表达水平在博来霉素致 PF 损伤后显著升高( $P < 0.01$ ),SUFU 蛋白的表达水平显著下降( $P < 0.01$ );Cyc 组和 TFDM 组中 SHH、

SMO、Gli1 蛋白表达水平显著下降( $P < 0.01$ ),SUFU 蛋白的表达水平显著升高( $P < 0.01$ );另与 TFDM 组相比,TFDM 组 + Cyc 组 SHH、SMO、Gli1 蛋白显著降低( $P < 0.01$ ),SUFU 蛋白表达明显升高( $P < 0.01$ )具有显著性差异;同时 TFDM 组 + Cyc 组与单独给药 Cyc 组相比,SHH、SMO 蛋白表达明显下降( $P < 0.01$ ),其中 Gli1 蛋白有下降趋势,但差异无显著性,SUFU 蛋白显著升高( $P < 0.01$ ),有明显差异。

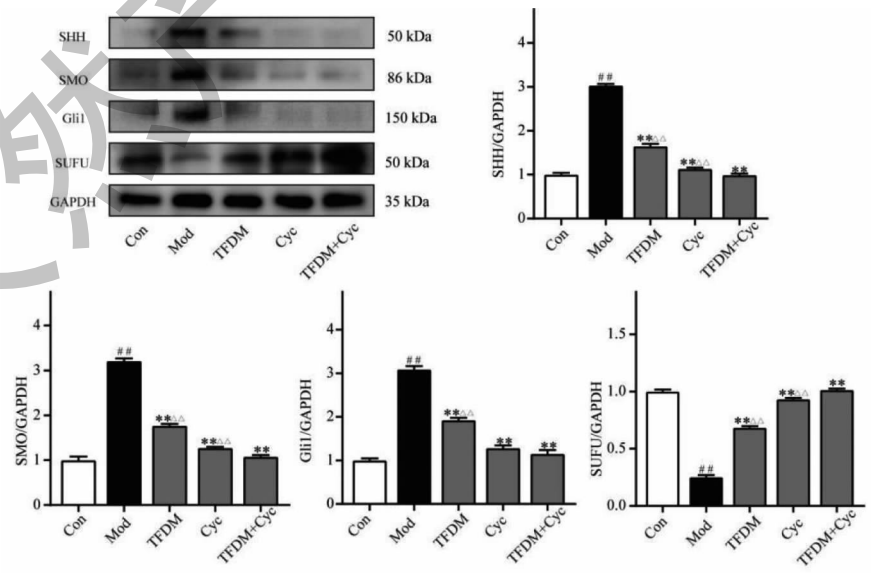


图5 Cyc 与 TFDM 对肺组织中 Hh 信号通路蛋白表达的影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Fig. 5 Effect of Cyc and TFDM on Hh signaling pathway protein expression in lung tissues( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )



### 3 讨论与结论

前期对香青兰进行了大量的研究工作,确定了香青兰最佳提取工艺,采用大孔吸附树脂纯化香青兰提取液,得到香青兰有效部位,并将香青兰有效部位进行分离,进行结构分析鉴定。在此之前,对香青兰有效部位的含量进行了测定,并根据临床给药剂量,依据相关文献折换为动物体内给药剂量<sup>[19]</sup>。并且在前期研究中基于 Hh 信号通路探讨了 TFDM (90、180、360 mg/kg) 相关剂量在 PF 小鼠模型中的作用机制,发现 Hh 信号通路在 PF 小鼠模型中被激活,而 TFDM 可通过干预 Hh 信号通路的重要调控蛋白,起到改善 PF 的作用,且 TFDM 高剂量 (360mg/kg) 效果较为明显<sup>[19]</sup>。

因此本文在前期的研究基础之上重点探讨了 Cyc 抑制 Hh 信号通路,TFDM (360 mg/kg) 在博来霉素所致 PF 小鼠体内的相关作用研究。采用气管内滴注博来霉素构建 PF 小鼠模型,构建模型第二天,灌胃给予小鼠 Cyc 和 TFDM 等相关药物。由于 Cyc 和 TFDM 都为难溶性药物,故采用 0.5% 羧甲基纤维素钠配置成相应混悬液灌胃给药。

PF 模型构建初期,患病小鼠均呈现体重下降,食欲不振,毛色杂乱,并且精神状况不佳等症状,并出现大量死亡,同时根据 HE 和 Masson 染色的肺组织病理切片的结果得出结论 PF 模型的构建是成功的。经过连续给予药物干预,PF 模型构建后期,小鼠各症状得到明显改善,肺组织病理切片的结果发现 Cyc 组和 TFDM 组肺组织结构正常,炎性细胞和纤维化组织明显减少。随后,又进行了 HYP 含量的测定,研究结果显示,模型组 HYP 含量升高,Cyc 组和 TFDM 组能显著降低 HYP 的含量。PF 的临床表现是持续性干咳和急性呼吸困难,伴随肺损伤的加剧,患者的肺功能持续下降,导致死亡。PF 会引起肺功能丧失,它的临床特征是进行性呼吸困难,导致气体交换障碍和限制性通气问题<sup>[20]</sup>。因此本研究进行了肺功能测定,结果发现 Cyc 组和 TFDM 组可通过降低 RL、RE 和 FEV0.1/FVC,同时可升高 Cdyn、FVC 和 PEF,改善 PF 气流受限,缓解限制性通气功能障碍,进而可以有效缓解博来霉素诱导的 PF 的相关症状。

Hh 通路在 PF 过程中发挥重要作用,如 ECM 分泌和代谢,以控制 PF。Hh 信号通路由配体的分泌启动,Ptch 消除对 SMO 的抑制作用,从而促进转录因子 Gli1 的激活和核易位,导致 Hh 靶基因的表达,

如 Gli1、SMO<sup>[21]</sup>。因此,在目前的研究中,本研究使用 SMO 抑制剂 Cyc 抑制 Hh 通路,来确定 TFDM 在 PF 小鼠中的作用。本研究检测了 Col-1、 $\alpha$ -SMA、FN1、SHH、SMO、SUFU、Gli1 等相关蛋白,Cyc 和 TFDM 抑制 Hh 通路可以抑制 ECM 的产生和血管生成作用,这可能是通过下调 Col-1、 $\alpha$ -SMA、FN1、SHH、SMO、Gli1 等相关蛋白和上调 SUFU 蛋白来实现的。由此更证实 PF 与抑制 Hh 信号通路有关。Cyc 组和 TFDM 组均能修复肺组织损伤,改善胶原纤维的含量,下调或上调 Hh 信号通路相关蛋白含量,进而缓解肺组织纤维化进程,并且 Cyc 和 TFDM 联合用药效果更佳。

总之,本文进一步阐述了 PF 的发生发展,并且经过验证 TFDM 有一定的治疗作用,并深入挖掘了 Hh 信号通路与 PF 相关的作用机制,为 PF 的相关作用机制研究提供了良好的研究基础。

### 参考文献

- 1 Wang Z, Feng F, He H, et al. Citrus alkaline extracts prevent endoplasmic reticulum stress in type II alveolar epithelial cells to ameliorate pulmonary fibrosis via the ATF3/PINK1 pathway[J]. *Phytomedicine*, 2021, 89: 153599.
- 2 Zeng H, Jian Y, Xie Y, et al. Edible bird's nest inhibits the inflammation and regulates the immunological balance of lung injury mice by SO2[J]. *Food Frontiers*, 2022, 3: 2005-2015.
- 3 Chen X, Li ZP, He XW, et al. Isorhynchophylline alleviates bleomycin-induced pulmonary fibrosis by regulating ERK / p27Kip1 signaling pathway in mice[J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2022, 34: 750-760.
- 4 White CS, Galvin JR. Pulmonary fibrosis: a guide for the perplexed[J]. *Radiol Cardiothorac Imaging*, 2021, 3: e210011.
- 5 Gampala S, Yang JY. Hedgehog pathway inhibitors against tumor microenvironment[J]. *Cells*, 2021, 10: 3135.
- 6 Effendi WI, Nagano T. The hedgehog signaling pathway in idiopathic pulmonary fibrosis: resurrection time[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 23: 171.
- 7 Mansour SM, El-Abhar HS, Soubh AA. MiR-200a inversely correlates with Hedgehog and TGF-beta canonical/non-canonical trajectories to orchestrate the anti-fibrotic effect of tadalafil in a bleomycin-induced pulmonary fibrosis model[J]. *Inflammopharmacology*, 2021, 29: 167-182.
- 8 Sun W, Liu X, Yang X, et al. SENP1 regulates the transformation of lung resident mesenchymal stem cells and is associated with idiopathic pulmonary fibrosis progression[J]. *Cell Commun Signal*, 2022, 20: 104.

- 9 Song X, Zhang B, Taorong W, et al. Effects of cyclopamine on the viability of articular chondrocytes in rats with adjuvant arthritis *in vitro* [J]. *Ann Clin Lab Sci*, 2020, 50: 85-91.
- 10 Yuan YF, Zhu WX, Liu T, et al. Cyclopamine functions as a suppressor of benign prostatic hyperplasia by inhibiting epithelial and stromal cell proliferation via suppression of the Hedgehog signaling pathway [J]. *Int J Mol Med*, 2020, 46: 311-319.
- 11 Warzecha J, Dinges D, Kaszap B, et al. Effect of the Hedgehog-inhibitor cyclopamine on mice with osteosarcoma pulmonary metastases [J]. *Int J Mol Med*, 2012, 29: 423-427.
- 12 Moschner J, Chentsova A, Eilert N, et al. Cyclopamine analogs bearing exocyclic methylenes are highly potent and acid-stable inhibitors of hedgehog signaling [J]. *Beilstein J Org Chem*, 2013, 9: 2328-2335.
- 13 LV JM, Zhai KF, Duan H, et al. Mechanism of total flavonoid extract from *Dracocephalum moldavica* on bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice based on pyroptosis pathway [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2022, 47: 6663-6671.
- 14 Yang ZH, Kadder K, Xu L, et al. Study on the protective effect of effective parts of *Dracocephalum moldavica* on human microvascular endothelial cells after OGD/R injury [J]. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 2022, 57: 918-924.
- 15 Liu Y, Jin M, Wang ZL. Advances in the study of flavonoids content and pharmacological action of *Dracocephalum moldavica* [J]. *Chin J Ethnomed Ethnopharm* (中国民族民间医药), 2020, 28: 68-71.
- 16 Kang XL, He CH, Xing JG, et al. Inhibitory effects of moldavica total flavone on airway inflammation and hyperresponsiveness in ovalbumin-induced asthmatic rats [J]. *Chin J Mod Appl Pharm* (中国现代应用药理学), 2013, 30: 234-238.
- 17 He CH, Kang XL, Xing JG, et al. Effects of moldavica total flavone on leukotriene B<sub>4</sub>, leukotriene C<sub>4</sub>, C reactive protein and interleukin-10 levels in asthma rats [J]. *Chin J Tradit Chin Med* (中华中医药杂志), 2014, 29: 615-617.
- 18 Kang XL, He CH, Xing JG, et al. Effects of moldavica total flavone on interleukin-6, 13, 17 and tumor necrosis factor- $\alpha$  levels in asthma rats [J]. *Chin J Mod Appl Pharm* (中国现代应用药理学), 2013, 30: 839-842.
- 19 He CH, Lv JM, Khan GJ, et al. Total flavonoid extract from *Dracocephalum moldavica* L. improves pulmonary fibrosis by reducing inflammation and inhibiting the hedgehog signaling pathway [J]. *Phytother Res*, 2023, 37: 2745-2758.
- 20 Shen Q, Peng H. Clinical evaluation on idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *J Cent South Univ: Med Sci* (中南大学学报: 医学版), 2021, 46: 309-315.
- 21 Li ZM, Zhou T, Gao Y, et al. Effects of gentiopicrosin on Sonic Hedgehog signaling pathway in rat liver fibrosis [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2020, 32: 946-952.