



中国实验方剂学杂志

Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae

ISSN 1005-9903, CN 11-3495/R

《中国实验方剂学杂志》网络首发论文

题目： 基于空间代谢组学探究川贝母抗肺纤维化的作用机制
作者： 秦善博，谭鹏，郝露，谢俊杰，林俊芝，张磊，赵军宁
DOI： 10.13422/j.cnki.syfjx.20240565
收稿日期： 2023-09-06
网络首发日期： 2023-12-21
引用格式： 秦善博，谭鹏，郝露，谢俊杰，林俊芝，张磊，赵军宁. 基于空间代谢组学探究川贝母抗肺纤维化的作用机制[J/OL]. 中国实验方剂学杂志.
<https://doi.org/10.13422/j.cnki.syfjx.20240565>



网络首发：在编辑部工作流程中，稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定，且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式（包括网络呈现版式）排版后的稿件，可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定；学术研究成果具有创新性、科学性和先进性，符合编辑部对刊文的录用要求，不存在学术不端行为及其他侵权行为；稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准，正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性，录用定稿一经发布，不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容，只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

出版确认：纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊（光盘版）》电子杂志社有限公司签约，在《中国学术期刊（网络版）》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版，以单篇或整期出版形式，在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊（网络版）》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物（ISSN 2096-4188，CN 11-6037/Z），所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

收稿日期：2023-09-06

基金项目：四川省科技厅重点研发项目（2022YFS0429）；中央引导地方科技发展项目（2022ZYD0102）；四川省中医药管理局项目（2023MS496）；四川省科研院所基本科研项目（2022JDKY0036）

第一作者：秦善博，在读硕士，从事药食两用中药材大健康产品研究，E-mail：1193023297@qq.com

通信作者：谭鹏，博士，副研究员，从事中药质量标准 and 品质评价研究，E-mail：410578772@qq.com

基于空间代谢组学探究川贝母抗肺纤维化的作用机制

秦善博^{1,2}，谭鹏^{1*}，郝露¹，谢俊杰¹，林俊芝³，张磊¹，赵军宁¹

(1.四川省中医药科学院 国家中医药管理局中药质量生物评价重点实验室，成都 610041；2.成都大学 食品与生物工程学院，成都 610106；3.成都中医药大学 附属医院，代谢性疾病中医药调控四川省重点实验室，成都 610075)

[摘要] 目的：本研究基于空间代谢组学技术结合药理指标，解析川贝母粉改善博莱霉素诱导的大鼠肺纤维化的作用机制。**方法：**将 60 只 SD 大鼠随机分为空白组、模型组及川贝母高、中、低剂量组，每组 12 只。除空白组外，均采用气管注射博莱霉素建立大鼠肺纤维化模型。术后川贝母高、中、低剂量组分别给予 0.36、0.18、0.09 g kg⁻¹ 川贝母粉的水溶液，连续给药 28 d，空白组和模型组灌胃给予等量蒸馏水。末次给药后收集肺组织及血液，通过苏木精-伊红 (HE)、马松染色综合评估大鼠肺组织病理状况，利用空气动力辅助解吸电喷雾离子化质谱成像技术对不同实验组大鼠肺组织进行质谱成像分析，依据 HE 染色图选择模型组和川贝母高剂量组肺组织纤维化区域进行空间代谢组学分析，采用有监督的正交偏最小二乘法-判别分析 (OPLS-DA) 获得的变量重要性投影 (VIP) 值 > 1、*T* 检验 *P* < 0.05 以及变异倍数分析来筛选组间差异代谢产物；采用京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 数据库对筛选出的差异代谢物进行代谢通路分析。采用蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测大鼠肺组织中核转录因子- κ B p65 (NF- κ B p65) 和血红素加氧酶-1 (HO-1) 蛋白表达；生化检测大鼠肺组织中超氧化物歧化酶 (SOD)、丙二醛 (MDA) 和谷胱甘肽 (GSH) 水平；采用 ELISA 试剂盒检测大鼠血清中白细胞介素 (IL)-1 β 、IL-6、核因子 E₂ 相关因子 2 (Nrf2)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 水平，对筛选出的部分相关性强的信号通路进行验证。**结果：**质谱成像实验结果显示，肺纤维化大鼠在灌胃川贝母粉 28 d 后，其肺组织纤维化区域的 *L*-精氨酸含量与模型组大鼠比较具有明显差异，磷脂酰胆碱含量低于模型组大鼠肺纤维化区域中磷脂酰胆碱含量。Western blot 实验结果证实，与模型组比较，在灌胃给药川贝母粉 28 d 后，可以抑制肺纤维化大鼠肺组织中 NF- κ B p65 蛋白表达量上升，高剂量川贝母粉灌胃给药后能够明显抑制 HO-1 表达量降低。细胞因子检测结果显示，与模型组比较，川贝母粉、中、低剂量给药组大鼠血清中 IL-1 β 、IL-6 及 TNF- α 的含量明显降低。高剂量川贝母粉灌胃给药后能够明显抑制由博莱霉素引起的 SOD、GSH 和 Nrf2 的含量降低以及 MDA 含量升高的趋势。**结论：**川贝母粉灌胃给药可一定程度改善博莱霉素诱导的大鼠肺纤维化，其作用机制可能与调控炎症 (NF- κ B p65)、氧化应激 (Nrf2/HO-1) 等相关途径有关。

[关键词] 川贝母；肺纤维化；空间代谢组学；炎症；氧化应激；质谱成像

[中图分类号] R22；R28；R563；O657

[文献标识码] A

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20240565

Investigating Mechanism of Fritillariae Cirrhosae Bulbus Against Pulmonary Fibrosis Based on Spatial Metabolomics

QIN Shanbo^{1,2}, TAN Peng^{1*}, HAO Lu¹, XIE Junjie¹, LIN Junzhi³, ZHANG Lei¹, ZHAO Junning¹

(1. Key Laboratory of Biological Evaluation of Traditional Chinese Medicine (TCM) Quality of National Administration of TCM, Sichuan Academy of Chinese Medicine Sciences, Chengdu 610041, China; 2. College of Food and Bioengineering, Chengdu University, Chengdu 610106, China; 3. TCM Regulating Metabolic Diseases Key Laboratory of Sichuan Province, Hospital of Chengdu University of TCM, Chengdu 610075, China)

[Abstract] Objective: The study is based on spatial metabolomics technology combined with pharmacological indicators to analyze the mechanism of action of Fritillariae Cirrhosae Bulbus (FCB) powder in improving bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats. **Method:** Sixty SD rats were randomly divided into five groups: control, model, and high, medium, and low dosage groups of FCB. Except for the blank group, a rat model of pulmonary fibrosis was established in all groups through tracheal injection of bleomycin. Post-surgery, the high, medium, and low dosage groups of FCB were administered aqueous solutions of FCB powder at doses of 0.36, 0.18, and 0.09 g · kg⁻¹ respectively, continuously for 28 d. The blank and model groups were given an equal volume of distilled water by gavage. Post-surgery, the high, medium, and low dosage groups of FCB were administered aqueous solutions of FCB powder at doses of 0.36, 0.18, and 0.09 g · kg⁻¹, respectively, continuously for 28 d. The blank and model groups were given an equal volume of distilled water by gavage. After the last administration, lung tissue and blood samples were collected. The pathological condition of rat lung tissue was comprehensively evaluated using hematoxylin and eosin (HE) and Masson's trichrome staining. Mass spectrometric imaging of the rat lung tissues from different experimental groups was performed using desorption electrospray ionization mass spectrometry with air flow assistance. Spatial metabolomics analysis was conducted on the fibrotic areas of lung tissues in the model and high dosage FCB groups based on the HE staining images. Differential metabolites between groups were identified

using a supervised orthogonal partial least squares-discriminant analysis(OPLS-DA), with variables important in the projection(VIP) values(VIP>1), *T*-test *P*-values(*P*<0.05), and fold change analysis. Metabolic pathway analysis of the identified differential metabolites was performed using the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes(KEGG) database. Protein expression levels of nuclear factor kappa B p65(NF- κ B p65) and heme oxygenase-1(HO-1) in rat lung tissues were detected using Western blot analysis. Biochemical assessments of superoxide dismutase(SOD), malondialdehyde(MDA), and glutathione(GSH) levels in rat lung tissues were conducted. Rat serum levels of interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6(IL-6), nuclear factor erythroid 2-related factor(Nrf2), and tumor necrosis factor- α (TNF- α) were measured using ELISA kits to validate the selected representative signaling pathways.

Result: The mass spectrometry imaging experiment results revealed that, following the administration of FCB powder for 28 days, the content of *L*-arginine in the fibrotic regions of lung tissues in rats with pulmonary fibrosis exhibited significant differences compared to the model group rats. Additionally, the phosphatidylcholine content in the fibrotic regions of the lung tissues was lower than that in the model group rats. Western blot experiments confirmed that, in comparison to the model group, oral administration of FCB powder for 28 d could inhibit the elevated expression of NF- κ B p65 protein in the lung tissues of rats with pulmonary fibrosis. Furthermore, high-dose FCB powder oral administration significantly suppressed the expression of HO-1. The cytokine detection results indicate that, compared to the model group, the concentrations of IL-1 β , IL-6, and TNF- α in the serum of rats from the FCB powder, medium, and low-dose administration groups were significantly reduced. Following the oral administration of a high dose of FCB powder, there was a pronounced inhibition of the decrease in SOD, GSH, and Nrf2 induced by bleomycin, along with the suppression of the trend of increased MDA content. **Conclusion:** Oral administration of FCB powder has the potential to partially ameliorate bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats. The underlying mechanism of this effect may involve the regulation of pathways associated with inflammation(NF- κ B p65) and oxidative stress(Nrf2/HO-1).

[Keywords] Fritillariae Cirrhosae Bulbus; pulmonary fibrosis; spatial metabolomics; inflammation; oxidative stress; mass spectrometry imaging

特发性肺纤维化 (IPF) 是一种慢性、进行性的间质性肺部疾病, 如果不及时有效地控制肺纤维化进程, 将会导致肺功能下降, 严重影响患者的生活质量和预期寿命^[1-2]。流行病学调查显示, 近年来, 肺纤维化的患病率逐年上升^[3-4]。值得注意的是, 自 2019 年新冠疫情爆发以来, 已有较多文献报道部分新冠病毒感染者在早期和康复期会出现肺部纤维化症状^[5-6]。尽管 IPF 的确切病因尚不清楚, 但所有纤维化阶段都伴随着先天和适应性免疫反应^[7]。此外, 研究表明氧化应激也可能在肺纤维化的发展过程中发挥关键作用^[8]。目前临床用于治疗肺纤维化的药物非常少, 仅有吡非尼酮、尼达尼布等, 但其临床疗效并不理想^[9-10], 价格昂贵且副作用较多。近年来, 传统中医药在临床用于改善或延缓肺纤维化方面取得了较好疗效, 彭艳芳等^[11]研究表明, 芪归方联合泼尼松治疗特发性肺纤维化可有效降低 IPF 患者体内炎性因子水平, 改善患者的中医证候, 提高运动耐力和生命质量。方朝义等^[12]研究表明, 络通纤溶饮可以改善特发性肺纤维化患者咳嗽、喘息症状, 提高患者生存质量。

川贝母 (Fritillariae Cirrhosae Bulbus) 是著名的川产名贵地道药材, 具有化痰止咳和消痈散结的功效, 临床常用于治疗肺热燥咳、肺痈等^[13]。目前, 针对川贝母的药理作用机制研究主要集中在“止咳化痰”方面^[14-16], 有关其抗肺纤维化的研究有所欠缺^[17], 阻碍了川贝母临床药用价值的提升, 因此, 亟需开展川贝母抗肺纤维化的相关研究。空间代谢组学是一种基于质谱成像技术的新型代谢组学分析的方法, 通过对样本原位检测, 在完成对代谢物定性定量分析的同时, 还可保留空间位置信息, 实现从定性、定量、定位 3 个维度分析样本中代谢物的空间分布情况和代谢过程的差异变化^[18-19]。该方法不需要复杂的样本前处理, 具有高灵敏度, 高时效性和空间信息保留等优势^[20-21]。SUN 等^[22]使用空间代谢组学技术对吡非尼酮治疗肺纤维化的药物代谢过程进行了研究, 实现了肺纤维化小鼠的内源性和外源性代谢物的原位可视化定量分析, 展现了空间代谢组学技术在抗肺纤维化药物开发领域的应用前景。

本研究拟采用博来霉素 (BLM) 诱导大鼠肺纤维化模型, 利用空间代谢组学技术分析川贝母给药后大鼠的肺组织物质代谢差异, 结合生物信息统计分析富集得到可能的代谢途径, 采用蛋白免疫印迹法 (Western blot) 及相关细胞因子检测对其中的部分信号通路进行验证, 以期探寻川贝母抗肺纤维化的药理作用机制提供参考。

1 材料

1.1 动物 健康 SPF 级 SD 大鼠 60 只, 雄性, 体质量 (180 \pm 10) g。所有大鼠均由四川省中医药科学院动物实验中心提供, 合格证号 SCXK (川) 2018-19。所有大鼠均经动物检验检疫合格。饲养温度 22~26 °C, 湿度为 35%~50%。动物实验经伦理委员会批准, 批号 SYLL (2022) -017。

1.2 药物与试剂 川贝母 (采自四川省广元市) 经四川省中医药科学院谭鹏副研究员鉴定为百合科植物太白贝母 *Fritillaria taipaiensis* 的鳞茎, BLM (合肥博美生物科技有限责任公司, 批号 TB002314), 4% 甲醛固定液 (武汉博士德生物公司, 批号 22192875), 改良 Masson 三色染色液 (合肥博美生物科技有限责任公司, 批号 0420A22), 化学发光试剂盒 (天地人和生物科技有限公司, 批号 H31500-1), 牛血清蛋白 V (德国 BIOFROXX 公司, 批号 4240GR250), 四甲基乙二胺 (KESHI 公司, 批号 CAS110-18-9), Minute™ 组织总

蛋白提取试剂盒、白细胞介素 (IL)-1 β 酶联免疫吸附测定法 (ELISA) 试剂盒、IL-6 ELISA 试剂盒、核因子 E₂ 相关因子 2 (Nrf2) ELISA 试剂盒、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) ELISA 试剂盒 (上海茁彩生物科技有限公司, 批号分别为 SN-002、ZC-36391、ZC-36404、ZC-36695、ZC-37624), 总蛋白测定试剂盒、超氧化物歧化酶 (SOD) 测定试剂盒、丙二醛 (MDA) 测定试剂盒、谷胱甘肽 (GSH) 测定试剂盒 (南京建成生物工程研究所、批号分别为 A045-2-2、A001-3-2、A003-1-2、A006-2-1), 0.5% 伊红染液水溶液 (合肥博美生物科技有限责任公司, 批号 YE2080), 苏木紫染色液 (武汉赛维尔生物科技有限公司, 批号 CR22002071), 核转录因子- κ B p65 (NF- κ B p65) 一抗 (美国 CST 公司, 批号 6956T), 血红素加氧酶 (HO-1) 一抗 (英国 Abcam 公司, 批号 ab68477), β -肌动蛋白 (β -actin) 内参、辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的山羊抗鼠二抗、HRP 标记的山羊抗兔二抗 (成都正能生物技术有限责任公司, 批号分别为 700068、511103、511203)。

1.3 仪器 空气动力辅助解吸电喷雾离子化质谱成像平台 (北京维科托科技有限公司), Q-Exactive Orbitrap 型质谱仪 (美国赛默飞世尔科技公司), JT-12S 型自动脱水机 (武汉俊杰电子有限公司), BMJ-A 型组织包埋机 (常州市中威电子仪器有限公司), RS36 型全自动染色机 (常州派斯杰医疗设备有限公司), PHY-III 型病理组织漂烘仪 (常州市中威电子仪器有限公司), Panoramic 250 型数字切片扫描仪 (匈牙利 3DHISTECH 公司), KZ-II 型高通量组织匀浆仪 (武汉赛维尔生物科技有限公司), D3024R 型台式高速冷冻型微型离心机 (美国 SCILOGEX 公司), 61006-9Q 型凝胶成像系统 (上海勤翔科学仪器有限公司), SW-CJ-1D 型超净工作台 (苏州安泰空气技术有限公司), K5800C 型超微量核酸蛋白分析仪 (北京凯奥科技发展有限公司), MK3 型酶标仪 (美国 Thermo Fisher 公司), SpectraMAX Plus384 型酶标仪 (美谷分子仪器有限公司), DZKW-4 型电子恒温水浴锅 (北京中兴伟业仪器有限公司), KZ-III-F 型高速低温组织研磨仪 (武汉赛维尔生物科技有限公司), UV752N 型紫外可见分光光度计 (上海佑科仪器仪表有限公司), Leica CM 1950 型冷冻切片仪 (德国莱卡公司), Superfrost Plus 型正电荷防脱载玻片 (美国 Thermo Fisher 公司)。

2 方法

2.1 药物制备 取干燥太白贝母, 粉碎成细粉, 过五号筛, 灌胃时按大鼠体质量称取川贝母粉用 4 mL 无菌水溶解后充分摇匀, 形成川贝母粉混悬液, 快速灌胃。

2.2 分组与造模及给药 60 只 SPF 级雄性 SD 大鼠适应性饲养 7 d, 分为空白组, 模型组, 川贝母高、中、低剂量组。模型组及给药组气管注射 BLM (5 mg kg⁻¹) 造模^[23]。大鼠于造模前禁食 12 h, 正常饮水。麻醉大鼠后, 从颈正中部位切开, 暴露气管, 经气管软骨环间隙一次性向气管内缓慢注射含有硫酸博莱霉素 (5 mg kg⁻¹) 的无菌水, 注射完毕后缝合伤口, 将大鼠直立并轻轻旋转, 使药液在肺部分布均匀。川贝母高、中、低剂量组从造模后第 15 天开始灌胃给予川贝母粉, 川贝母高、中、低剂量组大鼠分别按 0.36、0.18、0.09 g kg⁻¹ d⁻¹ 剂量用无菌水溶解后混匀灌胃 (参考 2020 年版《中华人民共和国药典》计算, 按照人-鼠等效剂量的 0.5、1、2 倍给药)。空白组和模型组大鼠同上法灌胃等量无菌水。

2.3 样本采集 末次给药 30 min 后, 称量体质量, 麻醉动物后切开腹腔, 用不含抗凝剂的采血管, 于腹主动脉取血, 室温放置 2 h, 然后置于 4 °C 下 2 570 r min⁻¹ 离心 20 min (离心半径 12 cm, 下同) 后分离血清, 用于血清细胞因子含量检测。切取部分左肺置于 4% 多聚甲醛溶液中固定, 用于 HE 和 Masson 染色; 切取部分左肺, 包埋胶包埋, 锡箔纸包裹置于 -80 °C 保存, 用于空间代谢组学分析; 其余部分肺组织迅速放入液氮中速冻, 并于 -80 °C 保存, 用于生化和 Western blot 检测。

2.4 空间代谢组学分析 使用切片仪对已固定的大鼠肺组织进行纵向切割, 并随后进行 HE 染色。在确定肺纤维化区域的基础上, 对该区域相邻的肺组织进一步切片, 用于后续质谱成像扫描分析。在分析过程中, 取出切片, 迅速置于真空干燥器中干燥 30 min。质谱成像平台控制程序软件设置扫描参数: X 轴扫描速度为 0.2 mm s⁻¹, Y 轴步进间距为 0.1 mm, 每行延迟时间为 7 s, 扫描区域的 X 轴扫描长度 10 mm, Y 轴扫描长度 10 mm。数据采集使用 Xcalibur 4.4.16 软件, 依据样本尺寸、步进间距、扫描速度等设定数据采集序列。采用正离子 Full MS 扫描模式, 喷雾电压为 +5 kV, 传输管电压为 \pm 0 V, 毛细管温度 350 °C, 扫描范围为 m/z 70~1 000 Da, 分辨率 60 000, 喷雾气压力 0.6 MPa, 喷雾角度 60°, 喷雾距切片距离 0.7 mm, 喷雾距传输管距离 3 mm, 传输管距锥孔距离 10 mm, 抽气流速 45 L min⁻¹。

2.5 肺组织差异代谢物的筛选 将质谱原始数据经过 imzMLConverter version 1.3.0 软件转换为 imzML 格式, 导入 Cardinal 软件包 (<https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/Cardinal.html>) 进行背景扣除、峰对齐、峰筛选处理。使用 SmetDB 数据库及 pySM 注释框架对高分辨质谱成像采集到的质谱信息进行代谢物定性注释, 定性标准为物质峰空间分布得分 >0.9、同位素空间强度得分 >0.1、同位素空间分布得分 >0.1。依据 HE 染色图将大鼠肺组织切片划分为纤维化区域和非纤维化区域, 选择模型组和川贝母高剂量组肺组织纤维化区域进行对比分析。对选取区域质谱数据进行峰数据提取、缺失值填充等处理获得相对定量数据。采用有监督的正交偏最小二乘法-判别分析 (OPLS-DA) 获得的变量重要性投影 (VIP) 值 >1、 T 检验 $P < 0.05$ 以及变异倍数分析来筛选组间差异代谢产物。采用京都基因与基因组百科全书数据库 (KEGG, <https://www.kegg.jp/>) 对筛选出的差异代谢物进行代谢通路富集分析。

2.6 ELISA 检测大鼠血清中 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、Nrf2 的水平 取大鼠血清, 按 ELISA 试剂盒说明书方法测定大鼠血清中 IL-1 β 、IL-6、Nrf2 和 TNF- α 的含量。

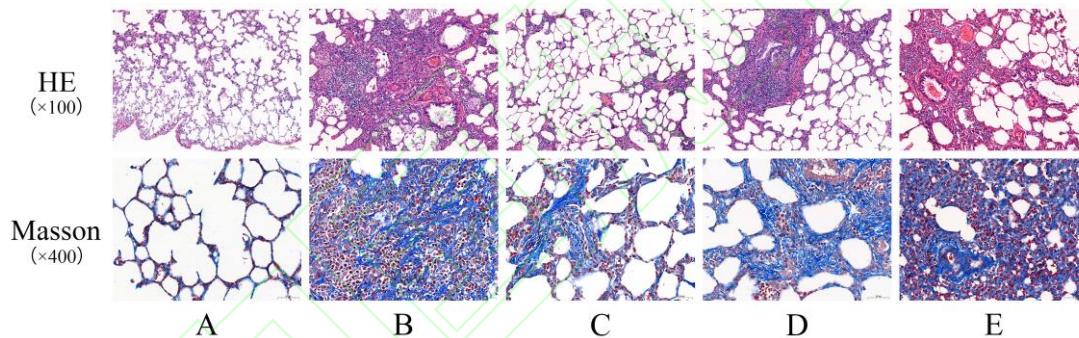
2.7 生化检测大鼠肺组织中 SOD、MDA、GSH 的水平 取大鼠肺组织，与 9 倍体积的生理盐水混合，进行冰水浴匀浆， $2\ 500\ \text{r}\ \text{min}^{-1}$ ，离心 10 min，取得上清液后，通过将其与生理盐水按 1:9 比例稀释，制备出 1% 的组织匀浆。按试剂盒说明书方法测定大鼠肺组织中总蛋白、MDA、SOD、GSH 的含量。

2.8 Western blot 检测肺组织中 NF- κ B p65、HO-1 蛋白表达水平 使用 Minute 动物组织总蛋白提取试剂盒处理肺组织，按照试剂盒制造商的说明进行制样。收集含有总蛋白的样品液并应用 BCA 蛋白测定法测定蛋白浓度。每个泳道中加入等量的蛋白质，通过 SDS-PAGE 分离，然后转移到 PVDF 膜上。随后，将膜在室温下用 5% 脱脂牛奶处理封闭 90 min。将 NF- κ B p65 (1:1 000)、HO-1 (1:10 000) 及 β -actin (1:5 000) 一抗，4 °C 孵育 4 h，TBST 洗膜，并分别加入 HRP 标记的山羊抗鼠、山羊抗兔二抗 (1:10 000)，37 °C 恒温滴膜孵育 1 h，增强化学发光试剂显影，采用 Chemi Analysis 软件测定蛋白的灰度值，计算目的蛋白相对表达量。

2.9 数据处理 本实验数据分析均由 IBM SPSS Statistics 2.0 进行统计分析，两组间比较采用 Student's t 检验，多组间统计学差异采用单因素方差分析， $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 川贝母对大鼠肺组织炎症及纤维化的影响 HE 染色结果显示，空白组大鼠的肺组织和肺泡结构完整清晰，间质未见炎症细胞浸润和纤维组织增生，几乎无病理改变；模型组大鼠的肺泡结构紊乱且肺组织破坏严重，间质有大量炎症细胞浸润和纤维组织增生；部分胶原沉积为致密红色胶原，纤维化程度明显。与模型组比较，川贝母高剂量组、川贝母中剂量组和川贝母低剂量组大鼠的肺部均有不同程度的炎症细胞减少，肺泡上皮细胞和胶原纤维减少，见图 1。Masson 染色结果显示，空白组大鼠的肺泡结构完整清晰，几乎没有蓝色胶原纤维沉积和炎症细胞浸润（靠近支气管部位有少量纤维化为正常现象）。模型组大鼠的肺泡结构紊乱蓝色胶原纤维沉积较多，存在较多炎症细胞的浸润，肺纤维化病变明显。与模型组比较，川贝母高剂量组、川贝母中剂量组和川贝母低剂量组大鼠肺组织中蓝色胶原纤维沉积和炎性细胞浸润较少，肺纤维化病变有所减轻，见图 1。采用 Image-Pro Plus 6.0 图像分析系统测定各组样本 Masson 染色图中纤维化区域面积，计算纤维化区域面积百分比=纤维组织面积/视野面积（像素面积）。结果显示，与模型组比较，川贝母高剂量组、川贝母中剂量组和川贝母低剂量组大鼠肺组织纤维化面积均明显减少，见表 1。



注：A.空白组；B.模型组；C.川贝母高剂量组；D.川贝母中剂量组；E.川贝母低剂量组

图 1 川贝母粉对大鼠肺组织炎症和纤维化的影响

Fig. 1 Effects of Fritillariae Cirrhosae Bulbus powder on lung tissue inflammation and fibrosis in rats

表 1 川贝母对大鼠肺组织纤维化面积的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

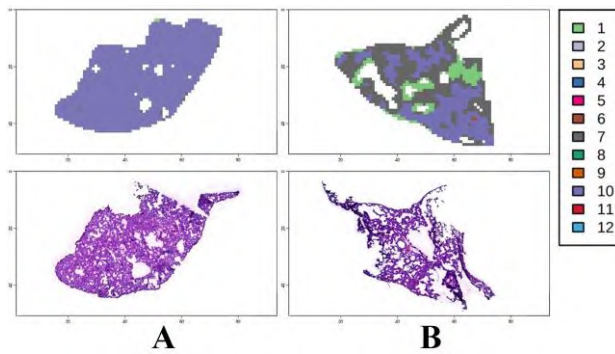
Table 1 Effect of Fritillariae Cirrhosae Bulbus on fibrosis area of lung tissue in rats ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	剂量/ $\text{g}\ \text{kg}^{-1}$	纤维化面积占比/%
空白组		3.13 \pm 1.0
模型组		24.42 \pm 3.4 ²⁾
川贝母高剂量组	0.36	11.74 \pm 2.8 ³⁾
川贝母中剂量组	0.18	11.41 \pm 5.2 ³⁾
川贝母低剂量组	0.09	17.63 \pm 2.1 ³⁾

注：与空白组比较 ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ ；与模型组比较 ³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$

3.2 空间代谢组学分析

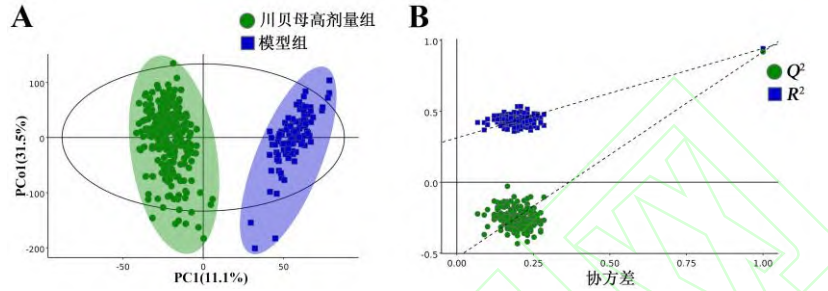
3.2.1 川贝母对大鼠肺纤维化区域代谢的影响 根据药效学结果显示给药组中川贝母高剂量组改善肺纤维化效果最佳，因此选用川贝母高剂量组进行空间代谢组学研究。空间收缩质心聚类分析如图 2 所示，共识别出 12 个不同的代谢物簇。值得注意的是，其中一些特定簇的分布与纤维化区域表现出了明显的相关性。通过 HE 染色图分析，确定模型组和川贝母高剂量组大鼠肺组织上用于对比分析的纤维化病灶区域。OPLS-DA 结果如图 3A 所示，模型组和川贝母高剂量组样本在 OPLS-DA 得分图上可明显区分。为防止模型过拟合，采用 7 次循环交叉验证和 200 次响应排序检验的方法来考察模型的质量，图 3B 显示 R^2 和 Q^2 从左到右低于最右的原值， Q^2 与 Y 轴在负半轴相交，表明该模型没有过拟合并且预测能力良好。



注: A.模型组; B.川贝母高剂量组, 代谢物共分为 12 簇

图 2 不同组间差异代谢物的空间收缩质心聚类分析

Fig. 2 Differences in metabolic substances between groups spatial shrunken centroids clustering analysis



注: A.模型组和川贝母高剂量组 OPLS-DA; B.模型组和川贝母高剂量组置换检验

图 3 目标区域在不同组间的代谢组学多元统计分析

Fig. 3 Multivariate Metabolomic Analysis of Target Regions Across Different Groups

3.2.2 川贝母影响大鼠肺纤维化区域差异代谢物筛选 通过多维分析结合单维分析筛选出组间差异显著的代谢物, 最终成功鉴定出 50 个差异代谢物。为了更清晰地展示样本间的关系以及不同样本中代谢物表达的差异, 对所有差异显著的代谢物表达量进行了层次聚类分析, 结果见图 4。与模型组比较, 川贝母高剂量组肺组织纤维化区域中, 甘油磷酸胆碱、*N*-甲基乙醇胺磷酸铵、3-苯丙酸、亚精胺等 29 个代谢物显著上调, *L*-精氨酸、磷脂酰胆碱、肌苷、次黄嘌呤等 21 个差异代谢物显著下调。

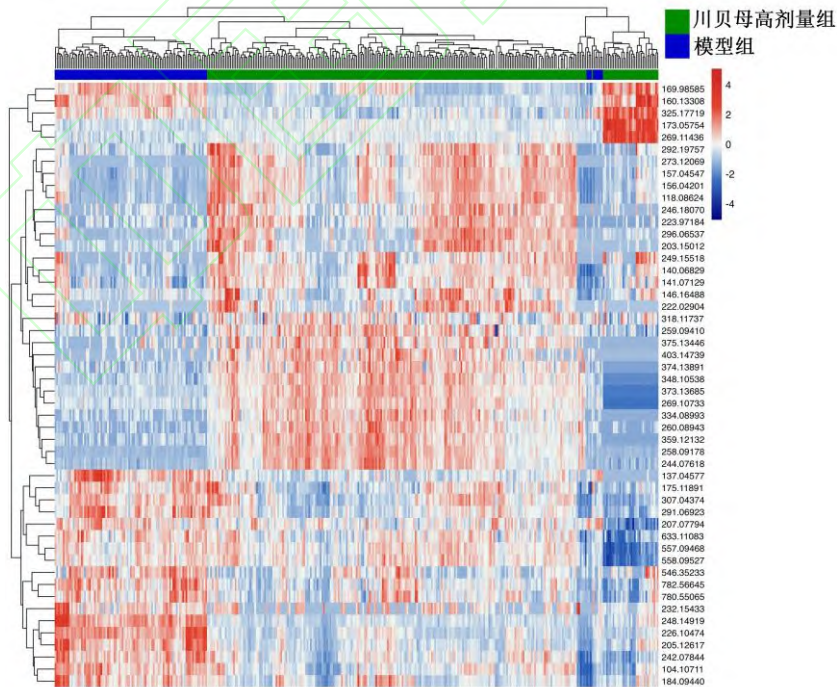
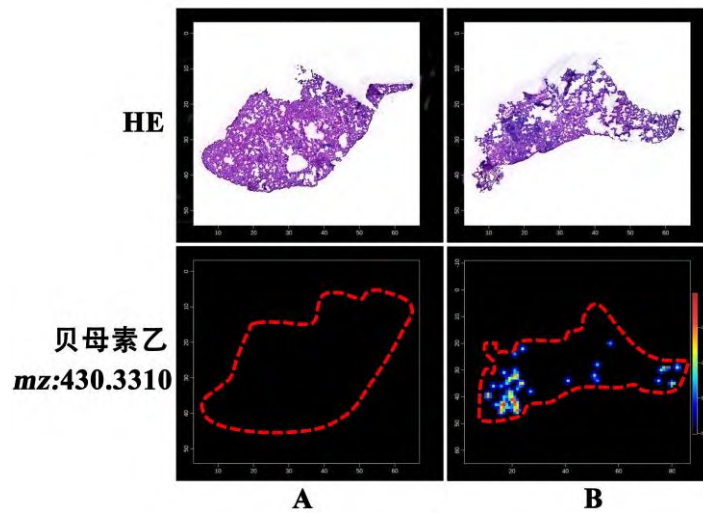


图 4 川贝母影响的代谢差异物层次聚类

Fig. 4 Hierarchical clustering of metabolic differences influenced by *Fritillariae Cirrhosae Bulbus*

将所有扫描得到的化合物进行成像分析, 获得其在组织切片中的分子轮廓信息。使用 SmetDB 数据库及 pySM 注释框架对高分辨质谱成像进行代谢物注释, 获得外源性化合物 (来自川贝母) 和内源性化合物 (来自大鼠自身) 在大鼠肺组织上的空间分布情况。结果在给药组大鼠肺部找到的外源性代谢物仅有贝母素乙, 其质谱成像分布情况见图 5。



注：A.模型组；B.川贝母高剂量组

图5 大鼠肺组织贝母素乙原位质谱成像

Fig. 5 Mouse lung tissue peiminine in situ mass spectrometry imaging

3.2.3 差异代谢通路分析 利用模型组和川贝母高剂量给药组对比筛选得到的 50 个差异代谢物的 KEGG ID 进行通路富集分析。应用超几何检验，找出与整个背景比较，在显著性差异表达代谢物中显著富集的 pathway 条目，共富集到 9 条代谢通路，代谢通路气泡图见图 6，结合课题组前期的实验结果及文献报道，从中筛选出 4 条可能与肺纤维化高度相关的代谢通路，分别为类固醇激素生物合成、甘油磷脂代谢、mTOR 信号通路、 α -亚麻酸代谢。这些途径中共涉及 11 个关键的差异代谢物参与，其中甘油磷酸胆碱、L-精氨酸、磷脂酰胆碱和 N-甲基乙醇胺磷酸铵等 4 个差异内源性代谢物在大鼠肺区域的质谱成像图见图 7。

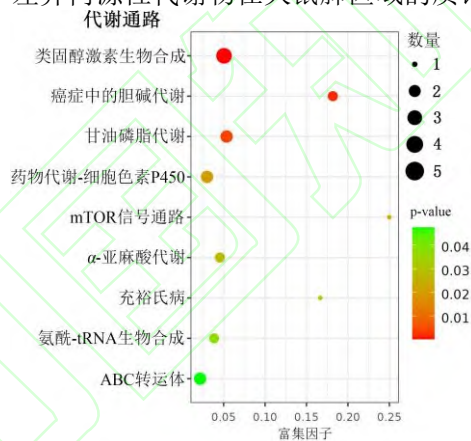
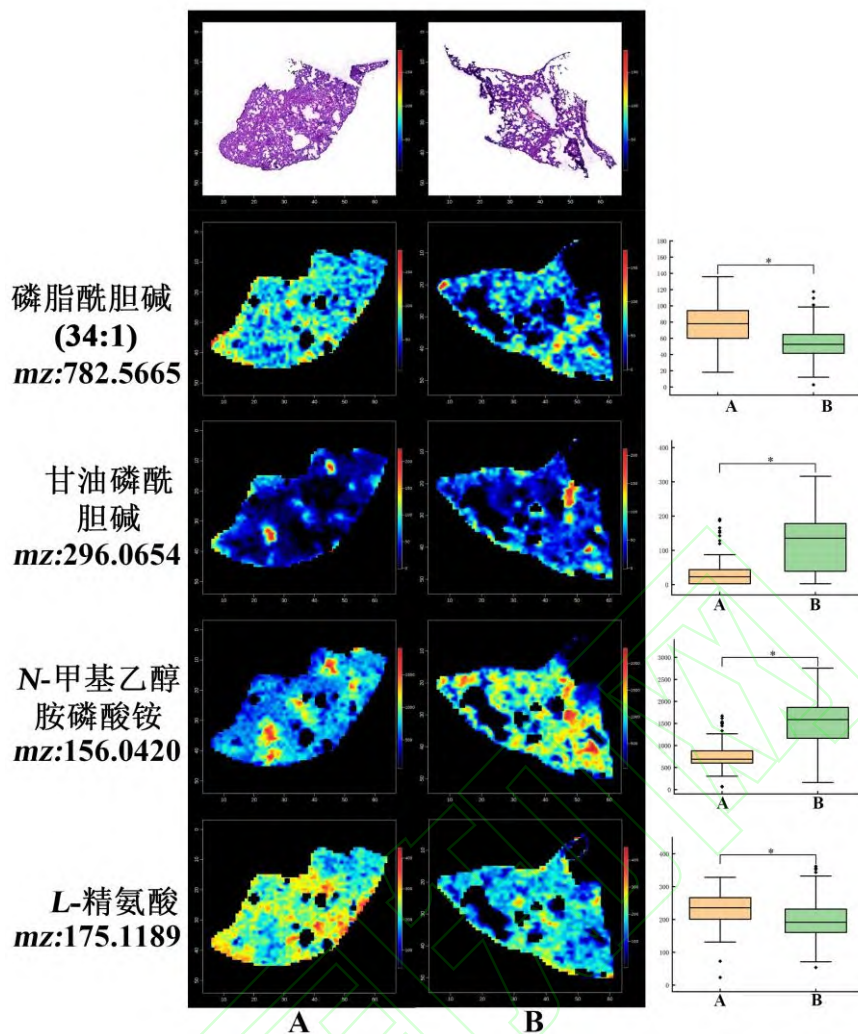


图6 肺纤维化区域差异代谢物的代谢通路富集

Fig. 6 Enrichment of metabolic pathways of differential metabolites in pulmonary fibrosis region



注：A.模型组；B.川贝母高剂量组

图7 关键差异代谢物原位质谱成像

Fig. 7 Key differential metabolite in situ mass spectrometry imaging

3.3 川贝母对大鼠血清及肺组织中相关细胞因子水平的影响 对与炎症相关的细胞因子分析结果显示，与空白组比较，模型组大鼠的血清中 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 含量明显增高 ($P < 0.01$)；与模型组比较，川贝母高、中、低剂量组的大鼠血清中 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 的含量均有所下降，但川贝母高、中、低剂量组之间的剂量依赖性不明显，提示川贝母粉灌胃给药能够减轻 BLM 导致的肺纤维化大鼠血清中炎症因子含量。见表 2。对与氧化应激相关的细胞因子分析结果显示，与空白组比较，模型组大鼠的肺组织中 SOD、GSH 含量降低，MDA 含量升高，血清中 Nrf2 含量降低 ($P < 0.01$)；与模型组比较，川贝母高、中、低剂量组大鼠的肺组织中 SOD、GSH 含量升高，MDA 含量降低，血清中 Nrf2 含量升高，但川贝母高、中、低剂量组的剂量依赖性并不明显，提示川贝母粉灌胃给药能够调控 BLM 导致的肺纤维化大鼠肺组织氧化应激状态。见表 3。

表 2 川贝母对大鼠血清中 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 2 Effect of Fritillariae Cirrhosae Bulbus on levels of TNF- α , IL-6, and IL-1 β in rat serum ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	剂量/g kg ⁻¹	TNF- α	IL-6	IL-1 β
空白组		109.19 \pm 13.81	42.09 \pm 4.92	11.13 \pm 2.61
模型组		147.81 \pm 11.75 ²⁾	66.40 \pm 6.76 ²⁾	19.02 \pm 2.15 ²⁾
川贝母高剂量组	0.36	128.28 \pm 5.65 ³⁾	52.18 \pm 5.35 ⁴⁾	14.72 \pm 1.59 ³⁾
川贝母中剂量组	0.18	133.60 \pm 10.96	54.29 \pm 4.25 ³⁾	14.23 \pm 0.93 ³⁾
川贝母低剂量组	0.09	141.70 \pm 8.73	63.34 \pm 4.71	16.20 \pm 1.79

注：空白组比较 ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ ；与模型组比较 ³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ (表 3、表 4 同)

表 3 川贝母对大鼠肺组织中 SOD、MDA、Nrf2、GSH 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 3 Effect of Fritillariae Cirrhosae Bulbus on levels of SOD, MDA, Nrf2, and GSH in rat lung tissue ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	剂量/g kg ⁻¹	SOD	MDA	Nrf2	GSH
----	-----------------------	-----	-----	------	-----

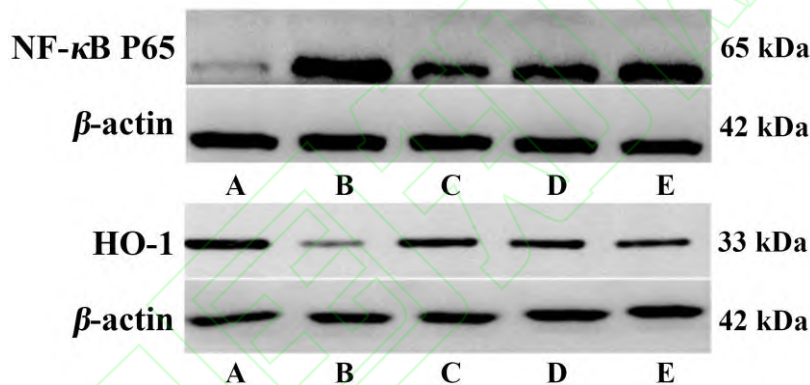
空白组		968.48±91.53	11.21±1.16	354.19±7.55	15.41±1.05
模型组		690.85±55.76 ²⁾	16.32±1.18 ²⁾	335.04±7.93 ¹⁾	8.39±2.25 ²⁾
川贝母高剂量组	0.36	857.28±78.41 ³⁾	13.19±1.22 ³⁾	375.95±11.16 ³⁾	14.16±0.1 ³⁾
川贝母中剂量组	0.18	822.16±53.93 ³⁾	14.50±1.05	371.28±13.48 ³⁾	14.71±0.79 ³⁾
川贝母低剂量组	0.09	742.37±68.47	15.29±2.38	365.39±11.27 ³⁾	13.22±1.86 ³⁾

3.4 川贝母对大鼠肺组织中 NF- κ B p65、HO-1 蛋白表达水平的影响 Western blot 结果显示,与空白组比较,模型组大鼠的肺组织中 NF- κ B P65 表达升高 ($P<0.05$), HO-1 蛋白表达降低 ($P<0.05$); 在灌胃给药 28 d 不同剂量川贝母粉后,与模型组比较,川贝母高、中、低剂量组大鼠肺组织中 NF- κ B p65 表达降低, HO-1 蛋白表达升高,川贝母高、中、低剂量组之间存在一定的剂量依赖性,提示川贝母粉能够调控 BLM 导致的肺纤维化大鼠体内 NF- κ B p65、Nrf2/HO-1 等信号通路相关蛋白的表达量。见表 4、图 8。

表 4 川贝母对各组大鼠肺组织中 NF- κ B p65、HO-1 表达的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Table 4 Fritillariae Cirrhosae Bulbus impact on NF- κ B p65 and HO-1 expression in various groups of rat lung tissues ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	剂量/g kg ⁻¹	NF- κ B p65/ β -actin	HO-1/ β -actin
空白组		0.69±0.54	1.19±0.14
模型组		1.38±0.18 ¹⁾	0.64±0.23 ¹⁾
川贝母高剂量组	0.36	0.79±0.24 ³⁾	1.03±0.17 ³⁾
川贝母中剂量组	0.18	0.96±0.22	0.89±0.19
川贝母低剂量组	0.09	1.21±0.29	0.88±0.31



注: A.空白组; B.模型组; C.川贝母高剂量组; D.川贝母中剂量组; E.川贝母低剂量组

图 8 各组大鼠肺组织中 NF- κ B p65、HO-1 的蛋白表达电泳

Fig. 8 Electrophoresis of NF- κ B p65 and HO-1 protein expression in rat lung tissue from each groups

4 讨论

本研究采用气管内注射 BLM 的方法诱导大鼠肺纤维化,在灌胃给药不同剂量川贝母粉 28 d 后取样分析。结果显示,与模型组比较,川贝母高、中、低剂量组大鼠的肺组织纤维化及炎症程度均明显降低,表明川贝母对 BLM 诱导的大鼠肺纤维化有一定改善作用。为了探寻川贝母抗肺纤维化可能的药理作用机制,本研究先利用空间代谢组学结合多变量统计分析,从不同给药组对比筛选出与川贝母抗肺纤维化可能的相关代谢通路,再利用常规药理实验对其中一些相关性强的代谢通路进行验证。空间代谢组学分析结果初步显示川贝母可能是通过调控类固醇激素生物合成、mTOR、甘油磷脂和 α -亚麻酸代谢等途径发挥其抗肺纤维化作用。值得注意的是,质谱成像结果显示,贝母素乙在大鼠肺组织纤维化区域出现明显富集,可能是川贝母抗肺纤维化的药效物质之一,值得后续进一步实验研究证明。

空间代谢组学分析结果显示,川贝母抗肺纤维化可能与改善炎症相关。文献研究表明,炎症在肺纤维化的发展过程中起着重要作用,促炎细胞因子可以通过刺激细胞活化,促进肺组织纤维化反应^[24-25]。本研究富集到 mTOR 信号通路等和肺纤维化及炎症相关的代谢途径,并对其中的关键差异代谢物在肺组织纤维化区域进行了原位质谱成像分析。mTOR 是一种蛋白激酶,属于磷酸肌醇依赖性蛋白激酶家族。mTOR 信号通路在细胞生长、增殖、代谢以及自噬等生理过程中起着关键作用^[26-27]。mTOR 信号通路通过调控细胞因子和趋化因子的产生,影响炎症细胞的激活和迁移^[28]。抑制 mTOR 信号通路可以减轻炎症反应,从而减缓纤维化进程^[29]。L-精氨酸是 mTOR 信号通路中一个重要的调节因子,可以通过影响 mTOR 信号通路的激活来调节细胞生长和代谢^[30-31]。L-精氨酸的原位质谱成像结果显示,肺纤维化大鼠在给药川贝母粉 28 d 后,其肺组织纤维化区域的 L-精氨酸含量与模型组大鼠比较具有明显差异。这表明川贝母可能是通过影响 mTOR 信号通路调节大鼠炎症从而影响大鼠肺纤维化情况。为了进一步验证这一观点,本研究使用了常规药理实验对大鼠体内炎症相关的细胞因子及蛋白表达进行了检测。NF- κ B 是细胞内重要的核转录因子,参与炎症介质的转录调控,在

炎症反应的调节中起重要作用^[32]。Western blot 实验结果证实, 在灌胃给药川贝母粉 28 d 后, 可以抑制肺纤维化大鼠肺组织中 p-AKT、NF- κ B P65 蛋白表达量上升。细胞因子 IL-1 β 和 IL-6 在许多炎症性疾病中具有重要作用^[33-34]。细胞因子 TNF- α 能够诱导肺泡上皮细胞的凋亡, 促使炎症细胞浸润, 从而导致肺实质损伤^[35]。本实验细胞因子检测结果显示, 与模型组比较, 川贝母粉高、中、低剂量组大鼠血清中 IL-1 β 、IL-6 及 TNF- α 的含量明显降低。综上, 表明川贝母可能是通过调控与炎症相关的代谢途径来发挥抗肺纤维化作用。

此外, 空间代谢组学分析结果还富集到甘油磷脂和 α -亚麻酸等与脂质代谢密切相关的代谢途径^[36], 表明川贝母抗肺纤维化还可能与调控脂质代谢和氧化应激有关。脂质代谢失调可以导致氧化应激的发生, 而氧化应激也可以进一步加剧脂质代谢失调。氧化应激在肺纤维化的发展过程中起着重要作用, 过量活性氧会增加肺部损伤程度, 且氧化应激水平和肺纤维化严重程度有一定的相关性^[37-38]。甘油磷脂代谢涉及的一种重要代谢产物磷脂酰胆碱(PC)是膜和脂蛋白上的主要脂质成分, PC 可以通过中和和自由基调控氧化应激对细胞的损伤^[39]。 α -亚麻酸代谢途径在抗炎和抗氧化等方面同样具有重要的作用^[40]。本实验质谱成像结果显示, 肺纤维化大鼠给药川贝母粉 28 d 后, 其肺组织纤维化区域的 PC 含量低于模型组大鼠肺纤维化区域中 PC 含量, 这与文献报道的结果一致^[41-42], 表明川贝母可能是通过调控脂质代谢和氧化应激发挥抗肺纤维化的作用。为了验证空间代谢组学富集得到的代谢通路的准确性, 进一步采用相关常规药理指标进行验证。Western blot 实验结果证实, 与模型组比较, 高剂量川贝母粉灌胃给药后能够明显抑制由 BLM 引起的 HO-1 蛋白表达量降低。MDA、SOD 和 GSH 是评估氧化应激的常用的生化指标, 检测结果显示, 与模型组比较, 高剂量川贝母粉灌胃给药后能够明显抑制由 BLM 引起的 SOD、GSH 和 Nrf2 的含量降低以及 MDA 含量升高的趋势。因此, 川贝母可能是通过 Nrf2 诱导 HO-1 蛋白的表达, 从而提高细胞对氧化应激的抵抗能力。综上, 表明川贝母抗肺纤维化可能与调控脂质代谢和氧化应激相关。

综上所述, 川贝母粉灌胃给药能够在一定程度上改善 BLM 诱导的大鼠肺纤维化, 其作用机制可能是通过调控与炎症(NF- κ B/p65)、氧化应激(Nrf2/HO-1)相关途径来实现的。本研究使用 BLM 诱导的大鼠肺纤维化模型作为研究对象, 具备良好的可重复性, 但由于 IPF 的发生是多种个体特征、表观遗传变异以及环境风险因素相互作用的复杂产物, 单纯采用大鼠肺纤维化模型具有一定的局限性。总之, 本研究尝试使用质谱成像和空间代谢组学技术研究川贝母抗大鼠肺纤维化的机制, 以期对解析川贝母“消痈散结”的科学内涵提供一些参考。

利益冲突: 本文不存在任何利益冲突。

参考文献

- [1]WIJSENBECK M, COTTIN V.Spectrum of fibrotic lung diseases [J].N Engl J Med, 2020, 383 (10) : 958-968.
- [2]RAGHU G, REMY-JARDIN M, MYERS J L, et al.Diagnosis of idiopathic pulmonary fibrosis an official ats/ers/jrs/alat clinical practice guideline [J].Am J Respir Crit Care Med, 2018, 198 (5) : e44-e68.
- [3]WIJSENBECK M, SUZUKI A, MAHER TM.Interstitial lung diseases [J].Lancet, 2022, 400 (10354) : 769-786.
- [4]MAHER T M, BENDSTRUP E, DRON L et al.Global incidence and prevalence of idiopathic pulmonary fibrosis [J].Respiratory Research, 2021, 22 (1) : 197.
- [5]GEORGE P M, WELLS A U, JENKINS R G.Pulmonary fibrosis and COVID-19: The potential role for antifibrotic therapy [J].Lancet Resp Med, 2020, 8 (8) : 807-815.
- [6]SPAGNOLO P, BALESTRO E, ALIBERTI S, et al.Pulmonary fibrosis secondary to COVID-19: A call to arms? [J].Lancet Resp Med, 2020, 8 (8) : 750-752.
- [7]HEUKELS P, MOOR C C, VON DER THÜSEN J H, et al.Inflammation and immunity in IPF pathogenesis and treatment [J].Respir Med, 2019, 147: 79-91.
- [8]CHERESH P, KIM S J, TULASIRAM S, et al.Oxidative stress and pulmonary fibrosis [J].Biochim Biophys Acta, 2013, 1832 (7) : 1028-1040.
- [9]ANTONIOU K M, WUYTS W, WIJSENBECK M, et al.Medical therapy in idiopathic pulmonary fibrosis [J].Semin Respir Crit Care Med, 2016, 37 (3) : 368-377.
- [10]KATO M, SASAKI S, NAKAMURA T, et al.Gastrointestinal adverse effects of nintedanib and the associated risk factors in patients with idiopathic pulmonary fibrosis [J].Sci Rep, 2019, 9 (1) : 12062.
- [11]彭艳芳, 岳莹莹, 张莹雯, 等.芪归方联合泼尼松治疗特发性肺纤维化的临床研究[J].世界中医药, 2018, 13 (8) : 1908-1912.
- [12]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) : 8-11.
- [13]国家药典委员会.中华人民共和国药典: 一部[M].北京: 中国医药科技出版社, 2020: 38-39.
- [14]WANG D, ZHU J, WANG S, et al.Antitussive, expectorant and anti-inflammatory alkaloids from Bulbus Fritillariae Cirrhosae[J].Fitoterapia, 2011, 82 (8) : 1290-1294.
- [15]张羽飞, 徐红纳, 黄伟, 等.川贝母对哮喘模型小鼠气道炎症及 ERK/MAPK 信号通路的影响[J].中国药房, 2018, 29 (3) : 343-348.

- [16]WANG D, WANG S, CHEN X, et al.Antitussive, expectorant and anti-inflammatory activities of four alkaloids isolated from Bulbus of *Fritillaria wabuensis*[J].*J Ethnopharmacol*, 2012, 139 (1) : 189-193.
- [17]赵木叶.川贝母对博莱霉素致肺纤维化大鼠的影响及作用机制的研究[D].济南: 山东中医药大学, 2016.
- [18]MA S, LENG Y, LI X, et al.High spatial resolution mass spectrometry imaging for spatial metabolomics: Advances, challenges, and future perspectives [J].*TrAC Trends Anal Chem*, 2023, 159: 116902.
- [19]殷志斌, 黄文洁, 伍欣宙, 等.空间分辨代谢组学进展和挑战[J].*生物技术通报*, 2021, 37 (1) : 32-51.
- [20]GAO S, ZHAO J, GUAN Y, et al.Mass spectrometry imaging technology in metabolomics: A systematic review [J].*Biomed Chromatogr*, 2023, 37 (7) : e5494.
- [21]孙晓珊, 路鑫, 许国旺.基于高分辨质谱的代谢组学分析技术研究进展[J].*质谱学报*, 2021, 42 (5) : 787-803.
- [22]SUN N, FERNANDEZ I E, WEI M, et al.Pharmacometabolic response to pirfenidone in pulmonary fibrosis detected by MALDI-FTICR-MSI[J].*Eur Respir J*, 2018, 52 (3) : 1702314.
- [23]李姗姗, 黄俊, 李龙雪, 等.温肺化纤颗粒抗小鼠特发性肺纤维化的代谢组学分析[J].*中国实验方剂学杂志*, 2023, 29 (9) : 166-178.
- [24]GOROWIEC M R, BORTHWICK L A, PARKER S M, et al.Free radical generation induces epithelial-to-mesenchymal transition in lung epithelium via a TGF- β_1 -dependent mechanism [J].*Free Radic Biol Med*, 2012, 52 (6) : 1024-1032.
- [25]HEUKELS P, MOOR C C, VON DER THUSEN J H, et al.Inflammation and immunity in IPF pathogenesis and treatment [J].*Respiratory Medicine*, 2019, 147: 79-91.
- [26]ZOU Z, TAO T, LI H, et al.mTOR signaling pathway and mTOR inhibitors in cancer: Progress and challenges [J].*Cell Biosci*, 2020, 10 (1) : 31.
- [27]DOWLING R J O, TOPISIROVIC I, FONSECA B D, et al.Dissecting the role of mTOR: Lessons from mTOR inhibitors[J].*Biochim Biophys Acta*, 2010, 1804 (3) : 433-439.
- [28]SUTO T, KARONITSCH T.The immunobiology of mTOR in autoimmunity[J].*J Autoimmun*, 2020, 110: 102373.
- [29]LASHGARI N A, ROUDSARI N M, ZADEH S S T, et al.Statins block mammalian target of rapamycin pathway : A possible novel therapeutic strategy for inflammatory , malignant and neurodegenerative diseases[J].*Inflammopharmacology*, 2023, 31 (1) : 57-75.
- [30]MAMMEDOVA J T, SOKOLOV A V, FREIDLIN I S, et al.The mechanisms of *L*-Arginine metabolism disorder in endothelial cells[J].*Biochemistry (Mosc)*, 2021, 86 (2) : 146-155.
- [31]MA X, HAN M, LI D F, et al.*L*-Arginine promotes protein synthesis and cell growth in brown adipocyte precursor cells via the mTOR signal pathway[J].*Amino Acids*, 2017, 49 (5) : 957-964.
- [32]SUN S, CHANG J, JIN J.Regulation of nuclear factor- κ B in autoimmunity[J].*Trends Immunol*, 2013, 34 (6) : 282-289.
- [33]GALOZZI P, BINDOLI S, DORIA A, et al.The revisited role of interleukin-1 alpha and beta in autoimmune and inflammatory disorders and in comorbidities[J].*Autoimmun Rev*, 2021, 20 (4) : 102785.
- [34]LEEMANS J C, VERVOORDELDONK M J B M, FLORQUIN S, et al.Differential role of interleukin-6 in lung inflammation induced by lipoteichoic acid and peptidoglycan from *Staphylococcus aureus*[J].*Am J Respir Crit Care Med*, 2002, 165 (10) : 1445-1450.
- [35]CAKAROVA L, MARSH L M, WILHELM J, et al.Macrophage tumor necrosis factor-alpha induces epithelial expression of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: Impact on alveolar epithelial repair[J].*Am J Respir Crit Care Med*, 2009, 180 (6) : 521-532.
- [36]KOWAL K, ŻEBROWSKA E, CHABOWSKI A.Altered Sphingolipid metabolism is associated with asthma phenotype in house dust mite-allergic patients [J].*Allergy Asthma Immunol Res*, 2019, 11 (3) : 330-342.
- [37]BIRBEN E, SAHINER U M, SACKESSEN C, et al.Oxidative stress and antioxidant defense [J].*World Allergy Organ*, 2012, 5 (1) : 9-19.
- [38]DANIIL Z D, PAPAGEORGIOU E, KOUTSOKERA A, et al.Serum levels of oxidative stress as a marker of disease severity in idiopathic pulmonary fibrosis[J].*Pulm Pharmacol Ther*, 2008, 21 (1) : 26-31.
- [39]CHAN W K M, FAUSTMAN C, DECKER E A.Oxymyoglobin oxidation as affected by oxidation products of phosphatidylcholine liposomes[J].*J Food Sci*, 2010, 62 (4) : 709-712.
- [40]KIM K B, NAM Y A, KIM H S, et al. α -Linolenic acid: Nutraceutical, pharmacological and toxicological evaluation[J].*Food Chem Toxicol*, 2014, 70: 163-178
- [41]刘佳琦, 周红兵, 权博文, 等.基于代谢组学的蒙古扁桃药材对肺纤维化大鼠的保护作用[J].*药学学报*, 2022, 57 (8) : 2484-2493.
- [42]XIA Y, CHENG M, HU Y, et al.Combined transcriptomic and lipidomic analysis of D-4F ameliorating

bleomycin-induced pulmonary fibrosis[J].Ann Transl Med, 2021, 9 (18) : 1424.

