·专题研究：肺纤维化“铁死亡 – EMT – TGF – β/Smad 轴”的机制网络验证
——基于国家科技重大专项的中医诊疗创新研究·

金水缓纤方抑制人肺上皮细胞 BEAS – 2B 铁死亡的活性成分及作用机制*

高艺桐[1,2]，尹刘月[2]，赵奕[3]，钱程[4]，张沐[5]，赵鹏[1,2]，田燕歌[1,2]，刘新光[1,2]

1. 河南中医药大学中医药科学院，河南 郑州 450046；2. 呼吸疾病中医药防治省部共建协同创新中心/河南省中医药防治呼吸病重点实验室，河南 郑州 450046；3. 河南中医药大学本草书院，河南 郑州 450046；4. 南京医科大学基础医学院，江苏 南京 211166；5. 南京医科大学附属逸夫医院，江苏 南京 211100

摘要：目的：观察金水缓纤方（Jinshui Huanxian Formula，JHF）对人肺上皮细胞 BEAS – 2B 铁死亡的影响，筛选其活性成分，并探讨相关作用机制。方法：采用 DPPH 自由基清除实验与 ABTS 自由基清除实验观察 JHF 的自由基清除活性，并计算半数抑制浓度（half maximal inhibitory concentration，IC_{50}）。利用 Erastin 诱导 BEAS – 2B 细胞铁死亡模型，并分为空白组、模型组（5 μmol·L^{-1} Erastin）、单体组（5 μmol·L^{-1} Erastin + 10 μmol·L^{-1}单体）及 JHF 组（5 μmol·L^{-1} Erastin + 20 mg·L^{-1} JHF）。采用 CCK – 8 法测定细胞存活率，H2DCFDA 检测活性氧（reactive oxygen species，ROS）含量，C11 – BODIPY 检测脂质过氧化物（lipid peroxidase，LPO）含量，FerroOrange 检测 Fe^{2+} 含量，Western blot 检测胱氨酸谷氨酸反向转运蛋白（system xc^- cystine/glutamate antiporter，xCT）、谷胱甘肽过氧化物酶 4（glutathione peroxidase 4，GPX4）、Ferritin 蛋白表达水平。通过离线 DPPH – UHPLC – Q – Orbitrap – MS/MS 技术筛选 JHF 抑制铁死亡的活性成分。结果：金水缓纤方对 DPPH 和 ABTS 的 IC_{50} 分别为（822.48 ± 95.02）mg·L^{-1}、（434.21 ± 23.02）mg·L^{-1}。与空白组比较，模型组细胞存活率降低（$P<0.000\ 1$）；与模型组比较，JHF 组细胞存活率升高（$P<0.000\ 1$）。与空白组比较，模型组细胞内 ROS、LPO、Fe^{2+} 含量增加（$P<0.000\ 1$）；与模型组比较，JHF 组细胞内 ROS、LPO、Fe^{2+} 含量减少（$P<0.000\ 1$）。与空白组比较，模型组细胞 Ferritin、GPX4、xCT 蛋白表达水平降低（$P<0.001$）；与模型组比较，JHF 组细胞 Ferritin、GPX4、xCT 蛋白表达水平升高（$P<0.01$）。JHF 抑制铁死亡的活性成分包括淫羊藿次苷Ⅰ、槲皮素、木犀草苷等。与模型组比较，毛蕊异黄酮、甘草查尔酮 A、新绿原酸、金丝桃苷、圣草次苷、槲皮素、木犀草苷、淫羊藿次苷Ⅰ组细胞存活率升高且 ROS、LPO、Fe^{2+} 含量减少（$P<0.001$）。与模型组比较，淫羊藿次苷Ⅰ组细胞 xCT、GPX4、Ferritin 蛋白表达水平升高（$P<0.001$）。结论：JHF 及其活性成分淫羊藿次苷Ⅰ可抑制 BEAS – 2B 细胞铁死亡，其作用机制可能与调控 xCT/GPX4 通路和 Ferritin 通路有关。

关键词：肺纤维化；金水缓纤方；淫羊藿次苷Ⅰ；铁死亡；自由基；Erastin；BEAS – 2B 细胞；xCT/GPX4 通路；Ferritin 通路
DOI：10.16368/j.issn.1674 – 8999.2025.08.256
中图分类号：R285.5　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1674 – 8999(2025)08 – 1587 – 10

Active Ingredient and Action Mechanism of Jinshui Huanxian Formula in Inhibiting Ferroptosis of Human Lung Epithelial Cell BEAS – 2B

GAO Yitong[1,2], YIN Liuyue[2], ZHAO Yi[3], QIAN Cheng[4], ZHANG Mu[5], ZHAO Peng[1,2], TIAN Yange[1,2], LIU Xinguang[1,2]

1. Academy of Traditional Chinese Medical Scienses, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou Henan China 450046;
2. Collaborative Innovation Center for the Prevention and Treatment of Respiratory Diseases/Henan Provincial Key Laboratory of

* **基金项目**：2024 年度国家科技创新 2030 重大专项项目（2024ZD0522905）；国家自然科学基金区域创新发展联合基金项目（U23A20503）；河南省科技研发（优势学科）重点联合项目（232301420020）

Traditional Chinese Medicine for the Prevention and Treatment of Respiratory Diseases, Zhengzhou Henan China 450046;
3. College of Materia Medica, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou Henan China 450046;
4. School of Basic Medical Sciences, Nanjing Medical University, Nanjing Jiangsu China 211166;
5. Sir Run Run Hospital, Nanjing Medical University, Nanjing Jiangsu China 211100

Abstract: Objective: To observe the effect of Jinshui Huanxian Formula (JHF) on ferroptosis of human lung epithelial cells BEAS-2B, to screen its active components, and to explore the related mechanism of action. Methods: DPPH and ABTS radical scavenging assays were used to observe the free radical scavenging activity of JHF, and calculated half maximal inhibitory concentration, IC_{50}. Erastin was used to induce ferroptosis in BEAS-2B cells, and it was divided into blank group and model group (5 μmol · L^{-1} Erastin), haplomeric group (5 μmol · L^{-1} Erastin 10 μmol · L^{-1} monomer) and JHF group (5 μmol · L^{-1} Erastin 20 mg · L^{-1} JHF). CCK-8 method was used to determine cell viability, H2DCFDA reactive oxygen species (ROS) content was detected, C11-BODIPY was used to detect lipid peroxidase (LPO) content, FerroOrange was used to detect Fe^{2+} content, and Western blot was used to detect cystine glutamate retrotransporter (system xc^- cystine/ glutamate antiporter (xCT), glutathione peroxidase 4 (GPX4), Ferritin protein expression levels. The active ingredient of JHF inhibiting ferroptosis was screened by offline DPPH-UHPLC-Q-Orbitrap-MS/MS technology. Results: The IC_{50} of Jinshui Slow Fiber Formula for DPPH and ABTS were (822.48 ± 95.02) mg · L^{-1}, (434.21 ± 23.02) mg · L^{-1}. Compared with the blank group, the cell viability of the model group was reduced ($P<0.000\ 1$). Compared with the model group, the cell survival rate of the JHF group was increased ($P<0.000\ 1$). Compared with the blank group, the intracellular contents of ROS, LPO and Fe^{2+} in the model group increased ($P<0.000\ 1$). Compared with the model group, the contents of ROS, LPO and Fe^{2+} in the JHF group decreased ($P<0.000\ 1$). Compared with the blank group, the protein expression levels of Ferritin, GPX4 and xCT in the model group were decreased ($P<0.001$). Compared with the model group, the protein expression levels of Ferritin, GPX4 and xCT in the JHF group increased ($P<0.01$). The active ingredients of JHF inhibition of ferroptosis include icariin Ⅰ., quercetin, luteolin and others. Compared with the model group, the cell survival rate of the mullein isoflavone, licochalcone A, neochlorogenic acid, hyperoside, holy herbin, quercetin, luteolin and icariin Ⅰ groups increased, and the contents of ROS, LPO and Fe^{2+} decreased ($P<0.001$). Compared with the model group, the protein expression levels of xCT, GPX4 and Ferritin in icariin Ⅰ group were increased ($P<0.001$). Conclusion: JHF and its active ingredient icariin Ⅰ can inhibit ferroptosis in BEAS-2B cells, and its mechanism may be related to the regulation of xCT/GPX4 pathway and Ferritin pathway.

Key words: pulmonary fibrosis; Jinshui Huanxian Formula; Icariin Ⅰ; ferroptosis; free radical; Erastin; BEAS-2B cell; xCT/GPX4 pathway; Ferritin pathway

特发性肺纤维化(idiopathic pulmonary fibrosis, IPF)是一种慢性、进行性、纤维化性、间质性肺疾病,其确切病因尚未阐明[1-2]。目前,针对 IPF 的治疗虽能延缓肺功能衰退,但存在耐药性和不良反应等问题[3]。中医药治疗 IPF 的临床疗效显著,其中金水缓纤方已被证实可降低 IPF 急性加重的频率,改善肺功能和运动能力,提高患者的生活质量[4-5]。研究表明,金水缓纤方可抑制氧化应激和上皮-间充质转化,从而改善博来霉素诱导的大鼠肺纤维化[6]。但金水缓纤方发挥疗效的具体成分和潜在作用机制仍有待进一步明确。

铁死亡是一种铁依赖性的细胞程序性死亡方式[7]。研究表明,肺上皮细胞铁死亡与 IPF 的发生发展密切相关[8-9]。脂质过氧化反应是驱动肺上皮细胞铁死亡的关键因素[12-13],而金水缓纤方能够调节脂质过氧化反应[6,10-11]。由此推测,金水缓纤方可能通过抑制肺上皮细胞铁死亡,进而改善肺纤维化。为深入阐释金水缓纤方保护肺上皮细胞的作用机制与药效物质,本研究首先考察其对 BEAS-2B 细胞铁死亡的调控作用;随后,通过离线 DPPH-UHPLC-Q-Orbitrap-MS/MS 技术筛选其抑制细胞铁死亡的活性成分,并进一步探索相关作用机制。

1　材料

1.1　细胞　人肺上皮细胞 BEAS-2B,购自中国科学院上海生命科学细胞资源中心。

1.2　主要试剂　2,2-联苯基-1-苦基肼基(2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, DPPH,上海麦克林生化科技股份有限公司,货号:D807297-1g);2,2′-叠氮基-双-(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐(ABTS)、维生素 C(美国 Sigma 公司,货号:A1888-1G、A5960-25G);Erastin(中国 MedChemExpress 公司,货号:HY-15763-1MG);异甘草素、橙皮苷、刺甘草查尔酮、毛蕊异黄酮、甘草查尔酮 A、新绿原酸、金丝桃苷、圣草次苷、槲皮素、木犀草苷、淫羊藿次苷Ⅰ(成都曼斯特科技有限公司,CAS

号:961 - 29 - 5、520 - 26 - 3、34221 - 41 - 5、20575 - 57 - 9、58749 - 22 - 7、906 - 33 - 2、482 - 36 - 0、13463 - 28 - 0、117 - 39 - 5、5373 - 11 - 5、56725 - 99 - 6);CCK - 8 检测试剂盒(美国 APExBIO 公司,货号:K1018 - 1 000T);FerroOrange(日本同仁化学公司,货号:F374);氟硼二吡咯(C11 - BODIPY,美国 GlpBio 公司,货号:GC40165);谷胱甘肽过氧化酶 4(glutathione peroxidase 4,GPX4)抗体、Ferritin 抗体(美国 Abcam 公司,货号:AB125066 - 40、AB75973 - 40);胱氨酸谷氨酸反向转运蛋白(system xc$^-$ cystine/glutamate antiporter,xCT)抗体(美国 Affinity 公司,货号:DF12509 - 50);2′,7′ - 二氯荧光素二乙酸酯(H2DCFDA)、GAPDH 抗体、山羊抗兔二抗(武汉三鹰生物技术有限公司,货号:CM01378 - 50、10494 - 1 - AP、SA00001 - 2);蛋白酶抑制剂混合物、RIPA 裂解液(强)(上海碧云天生物技术有限公司,货号:P1005、P0013B);BCA 蛋白定量试剂盒、Omni - Easy™速溶型蛋白上样缓冲液、Omni - Easy™一步法 PAGE 凝胶快速制备试剂盒(上海雅酶生物医药科技有限公司,货号:ZJ101、LT101S、LT101S);胎牛血清(苏州双洇生物科技有限公司,货号:S711 - 001S);DMEM 高糖培养基、青霉素 - 链霉素双抗溶液、磷酸盐缓冲液、0.25% 胰蛋白酶溶液(武汉普诺赛生命科技有限公司,货号:PM150210、PB180120、PB180327、PB180225)。

1.3　主要仪器　Dionex Ultimate 3000 超高效液相色谱仪、Orbitrap - fusion 高分辨质谱联用系统(美国 ThermoFisher Scientific 公司);全波长酶标仪(美国 BIO - TEK 公司);Axio Observer 3 倒置荧光显微镜(德国卡尔蔡司公司);化学发光仪(美国 BIO - RAD 公司);FACS Calibur 流式细胞仪(美国 BD Biosciences 公司)。

2　方法

2.1　金水缓纤方提取物及对照品溶液制备　金水缓纤方由人参、熟地黄、炙淫羊藿、浙贝母等药物组成,经河南中医药大学药学院付钰副教授鉴定为正品,且符合《中华人民共和国药典》[14]相关规定。取金水缓纤方所含药物,由河南中医药大学药学院药物分析实验室制备流浸膏,常压干燥,研磨成粉。将 1 g 金水缓纤方提取物粉末用 20 mL 70% 甲醇水溶液在超声波浴中提取 60 min,提取物 13 000 r · min^{-1} 离心 10 min,取上清液 - 20 ℃储存,用于色谱分析。另外,使用甲醇制备不同浓度的阳性对照药维生素 C 及各对照品溶液。

2.2　离线 DPPH - UHPLC - Q - Orbitrap - MS/MS 技术筛选活性成分

2.2.1　离线 DPPH - UHPLC - Q - Orbitrap - MS/MS 系统建立　采用 Synergi Polar - RP LC 柱(150 mm × 2 mm,4 μm,80 Å,Phenomenex)进行分析,柱温箱温度 40 ℃,流速 0.3 mL · min^{-1},进样量 5 μL。流动相 A 由水和 0.1% 甲酸组成,流动相 B 由乙腈和 0.1% 甲酸组成。洗脱程序:0% B(0—5 min),0→15% B(5—10 min),15% B→17% B(10—20 min),17% B→25% B(20—23 min),25% B(23—40 min),25% B→100% B(40—55 min),100% B(55—58 min),0% B(58—60 min)。

Q Exactive Orbitrap 质谱仪配备加热电喷雾电离源,喷雾电压 3 500 V(正离子模式)和 2 800 V(负离子模式)。鞘气压力 40 Arb,辅助气体压力 10 Arb。毛细管温度 325 ℃,辅助气体加热器温度 300 ℃。全扫描分辨率 7×10^4,m/z 100 ~ 1 500,自动增益控制为 3×10^6,最大注入时间 200 ms。靶向 MS2(tMS2)扫描用于碎片鉴定,分辨率为 1.75×10^4。通过四极杆进行前体离子分离,在 Orbitrap 中进行快速扫描高能碰撞解离 MS2 分析,分离窗为 4.0 Da,归一化碰撞能量为 10、30、50,自动增益控制为 2×10^5,最大注入时间为 100 ms。

2.2.2　离线 DPPH - UHPLC - Q - Orbitrap - MS/MS 实验　将金水缓纤方提取物(100 μL,3.36 g · L^{-1})与不同浓度 DPPH 溶液(100 μL,0.5、1.0、2.0、5.0、10.0 mmol · L^{-1})混合,混合物室温避光反应 30 min。采用 UHPLC - Q - Orbitrap - MS/MS 对混合物进行检测,并用甲醇代替 DPPH 溶液进行对照实验。与空白组相比,峰面积减少表明金水缓纤方中的化合物具有清除 DPPH 自由基的活性[15]。

2.3　自由基清除活性测定

2.3.1　DPPH 自由基清除实验　将 DPPH 溶液用甲醇稀释为 0.1 mmol · L^{-1}的工作溶液。将 50 μL 供试品溶液与 150 μL DPPH 工作溶液混合,室温避光反应 30 min。采用全波长酶标仪在 517 nm 波长处检测光密度(optical density,OD)值[16],计算样品的自由基清除率(ESC);绘制样品浓度和清除率的曲线图,计算半数抑制浓度(half maximal inhibitory concentration,IC_{50})。

$$ESC = [100 - (OD_{sample} - OD_{blank}) \times 100/OD_{control}] \times 100\%$$

注:OD_{sample}是样品(DPPH 溶液 + 自由基清除

剂)的 OD 值,OD_{blank}是空白(甲醇 + 自由基清除剂)的 OD 值,$OD_{control}$是对照品(甲醇 + DPPH 溶液)的 OD 值。

2.3.2　ABTS 自由基清除实验　使用 Zhou 等[16]描述的方法测定粗提取物的 ABTS 自由基清除能力,并进行细微修改。将 7 mmol · L^{-1} ABTS 水溶液与 2.45 mmol · L^{-1}过硫酸钾水溶液(v/v,1 ∶ 1)混合,室温避光反应 16 h。采用无水乙醇将 ABTS 溶液稀释至 734 nm 处的 OD 值为(0.70 ± 0.02),以获得 ABTS 自由基工作溶液。将 160 μL ABTS 自由基工作溶液与 40 μL 样品溶液混合反应 6 min,采用全波长酶标仪在 734 nm 处测量混合物的 OD 值,计算样品的自由基清除率和 IC_{50}。

2.4　细胞培养及分组　BEAS - 2B 细胞用含 10% 胎牛血清和 1% 青霉素 - 链霉素双抗溶液的 DMEM 完全培养基在 37 ℃、5% CO_2 的细胞培养箱内培养,在倒置显微镜下观察细胞生长状态,当细胞覆盖度达 90% 时进行传代。传代前,使用磷酸盐缓冲液进行润洗,随后用 0.25% 胰蛋白酶溶液消化 1 min,再加入 2 倍体积的完全培养基终止消化,离心后加入完全培养基重悬,并传代继续培养。筛选出最佳 Erastin 浓度后,将细胞分为空白组(完全培养基)、模型组(5 μmol · L^{-1} Erastin 处理 24 h 建立铁死亡模型)、单体组(5 μmol · L^{-1} Erastin + 10 μmol · L^{-1} 单体)及金水缓纤方组(5 μmol · L^{-1} Erastin 干预 2 h 后,加入 20 mg · L^{-1}金水缓纤方)。

2.5　CCK - 8 法检测细胞活力　取对数生长期的 BEAS - 2B 细胞,密度为 4×10^4 mL^{-1}。取 250 μL 细胞悬液至 48 孔板,静置 24 h,待细胞贴壁后,加入不同浓度 Erastin(0、2、5、8、10 μmol · L^{-1})作用 1.5 h,检测细胞存活率,从而筛选最佳 Erastin 浓度。

对筛选出的自由基清除活性成分进行药效评价,BEAS - 2B 细胞加入 5 μmol · L^{-1} Erastin 作用 2 h,随后加入 10 μmol · L^{-1}单体作用 24 h。最后,添加 25 μL CCK - 8 试剂孵育 1.5 h,用酶标仪在 450 nm 波长处测定 OD 值,计算细胞存活率。每组设置 3 个复孔,重复实验 3 次。

细胞存活率 =(样品孔 OD 值 - 空白孔 OD 值)/(对照孔 OD 值 - 空白孔 OD 值)× 100%

2.6　H2DCFDA 检测细胞内活性氧(reactive oxygen species,ROS)含量　BEAS - 2B 细胞接种于 6 孔板(1×10^5 mL^{-1}),按照 2.4 分组处理 12 h 后,清洗并消化收集细胞。使用无血清培养基稀释 DCFDA(1 ∶ 1 000),每孔加入 1 mL DCFDA 稀释液,37 ℃ 恒温培养箱中避光孵育 30 min,用无血清培养基冲洗细胞,最后采用流式细胞仪检测细胞内 ROS 含量[17]。

2.7　C11 - BODIPY 检测细胞内脂质过氧化物(lipid peroxidase,LPO)含量　BEAS - 2B 细胞接种于 6 孔板(1×10^5 mL^{-1}),按照 2.4 分组处理 12 h 后,清洗并消化收集细胞。使用无血清培养基稀释 C11 - BODIPY(1 ∶ 5 000),每孔加入 1 mL C11 - BODIPY 稀释液,37 ℃ 恒温培养箱中避光孵育 30 min,用无血清培养基冲洗细胞,最后采用流式细胞仪检测细胞内 LPO 含量[18]。

2.8　FerroOrange 检测细胞内 Fe^{2+} 含量　BEAS - 2B 细胞接种于 6 孔板(1×10^5 mL^{-1}),按照 2.4 分组处理 12 h 后,弃细胞上清并用 HBSS 清洗 3 次。采用 FerroOrange 荧光探针检测细胞内 Fe^{2+} 含量,每孔加入 1 μmol · L^{-1} FerroOrange 工作液,37 ℃、5% CO_2 培养箱中孵育 30 min,随后使用 Axio Observer 3 倒置荧光显微镜进行拍摄和分析(EX:530 nm/EM:580 nm)[19]。

2.9　Western blot 法检测细胞 xCT、GPX4、Ferritin 蛋白表达水平　BEAS - 2B 细胞接种于 6 孔板(1×10^5 mL^{-1}),按照 2.4 分组处理 24 h,加入含蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液,冰上裂解 15 min 后,反复吹打破碎细胞,4 ℃、12 000 r · min^{-1} 离心 10 min,取上清液,BCA 法测定蛋白浓度。将细胞上清与上样缓冲液混匀,95 ℃加热 5 min 使蛋白变性。蛋白样品经十二烷基硫酸钠 - 聚丙烯酰胺凝胶电泳,转至 PVDF 膜,加入含 5% 脱脂奶粉的 TBST,室温封闭 1 h。按照 1 ∶ 1 000 的稀释比例分别加入 xCT、GPX4、Ferttin 及 GAPDH 抗体,4 ℃ 孵育过夜后,加入二抗(1 ∶ 5 000)室温孵育 1 h。采用 ECL 化学发光试剂进行显影,在化学发光成像系统中曝光,以 GAPDH 为内参蛋白,Image J 软件分析蛋白条带的灰度值。

2.10　统计学方法　采用 SPSS 26.0 软件进行统计分析,计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)描述。若数据符合正态分布和方差齐性,两组间比较采用 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析;若数据不符合正态分布或方差不齐时,采用非参数检验。$P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3　结果

3.1　金水缓纤方可清除自由基　DPPH 和 ABTS 自

由基清除实验显示，金水缓纤方对 DPPH 和 ABTS 的 IC_{50} 分别为（822.48 ± 95.02）mg · L^{-1}、（434.21 ± 23.02）mg · L^{-1}，见图 1A、1B。结果表明，金水缓纤方具有清除自由基的能力。

3.2　金水缓纤方调控 xCT/GPX4 和 Ferritin 通路缓解 BEAS－2B 细胞铁死亡

3.2.1　BEAS－2B 细胞活性　与 0 μmol · L^{-1} Erastin 组比较，5、8、10 μmol · L^{-1} Erastin 组细胞存活率降低（P <0.000 1），见表 1。因此，选择 5 μmol · L^{-1} Erastin 构建细胞铁死亡模型，见表 1。与空白组比较，模型组细胞存活率降低（P <0.000 1）；与模型组比较，金水缓纤方组细胞存活率升高（P <0.000 1），见表 2。

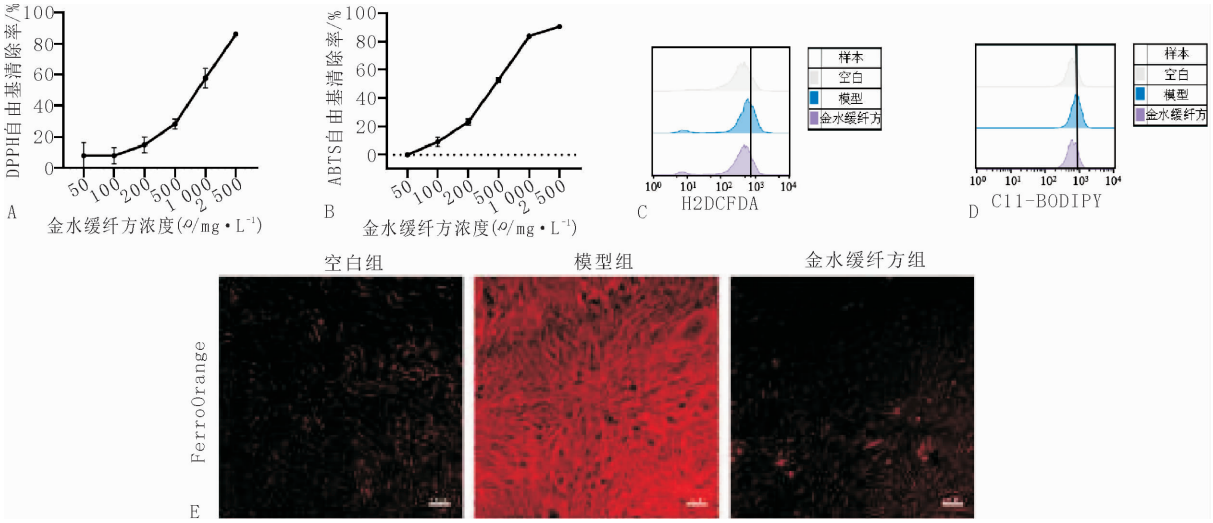
3.2.2　BEAS－2B 细胞内 ROS、LPO 含量　流式细胞术检测显示，与空白组比较，模型组细胞内 ROS、LPO 含量增加（P <0.000 1）；与模型组比较，金水缓纤方组细胞内 ROS、LPO 含量减少（P <0.000 1），见表 2、图 1C、图 1D。由此提示，金水缓纤方可通过降低 ROS、LPO 含量从而抑制 BEAS－2B 细胞铁死亡。

表 1　不同浓度 Erastin 下 BEAS－2B 细胞存活率比较　（$\bar{x} \pm s$）

Erastin 浓度（c/μmol · L^{-1}）	n	细胞存活率/%
0	3	97.12 ± 1.41
2	3	95.30 ± 0.22
5	3	74.07 ± 3.51****
8	3	44.60 ± 1.69****
10	3	19.79 ± 0.81****

注：与 0 μmol · L^{-1} Erastin 组比较，**** P <0.000 1。

3.2.3　BEAS－2B 细胞内 Fe^{2+} 含量、xCT/GPX4 和 Ferritin 通路相关蛋白　FerroOrange 检测显示，与空白组比较，模型组细胞内 Fe^{2+} 含量增加（P <0.001）；与模型组比较，金水缓纤方组细胞内 Fe^{2+} 含量减少（P <0.000 1），见表 2、图 1E。



注：A：金水缓纤方对 DPPH 的自由基清除率；B：金水缓纤方对 ABTS 的自由基清除率；C：流式细胞术检测细胞内 ROS 含量；D：流式细胞术检测细胞内 LPO 含量；E：FerroOrange 检测细胞内 Fe^{2+} 含量（×200）。

图 1　金水缓纤方自由基清除能力及 BEAS－2B 细胞内 ROS、LPO、Fe^{2+} 含量

Western blot 检测显示，与空白组比较，模型组细胞 Ferritin、GPX4、xCT 蛋白表达水平降低（P <0.001）；与模型组比较，金水缓纤方组细胞 Ferritin、GPX4、xCT 蛋白表达水平升高（P <0.01），见图 2A—2D。由此提示，金水缓纤方可清除自由基，并通过调控 xCT/GPX4 和 Ferritin 信号通路缓解 BEAS－2B 细胞铁死亡。

表 2　各组 BEAS－2B 细胞存活率、ROS 含量、LPO 含量及 Fe^{2+} 含量比较　（$\bar{x} \pm s$）

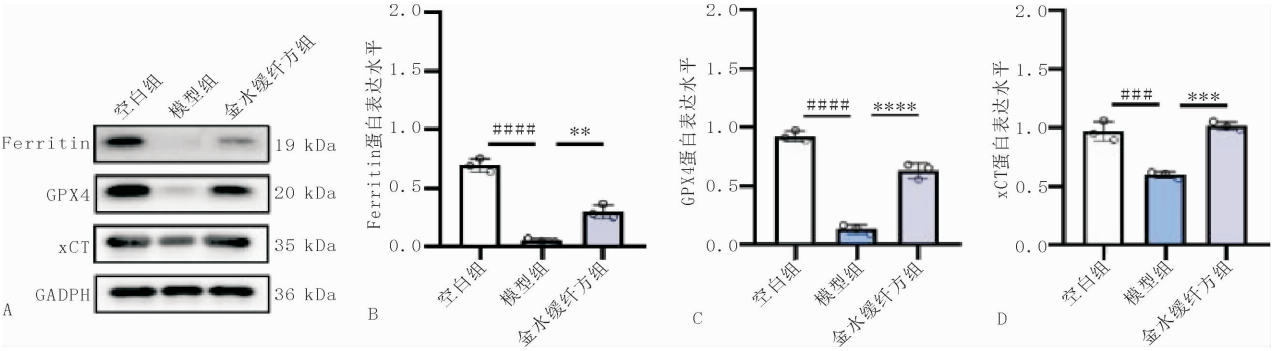
组别	n	细胞存活率/%	ROS 含量	LPO 含量	Fe^{2+} 含量
空白组	3	100.00 ± 0.15####	1.00 ± 0.00####	1.00 ± 0.00####	1.00 ± 0.00###
模型组	3	47.73 ± 2.28	1.43 ± 0.01	1.29 ± 0.01	1.50 ± 0.01
金水缓纤方组	3	78.48 ± 1.33****	1.11 ± 0.01****	1.02 ± 0.00****	0.96 ± 0.02****

注：与空白组比较，### P <0.001，#### P <0.000 1；与模型组比较，**** P <0.000 1。

3.3　金水缓纤方中具有清除自由基能力的 11 种活性成分　在前期研究中，利用 UHPC－Q－Orbitrap－MS 技术鉴定了金水缓纤方所含的 249 种化学成分[11]。本研究基于具有自由基清除能力的化合物

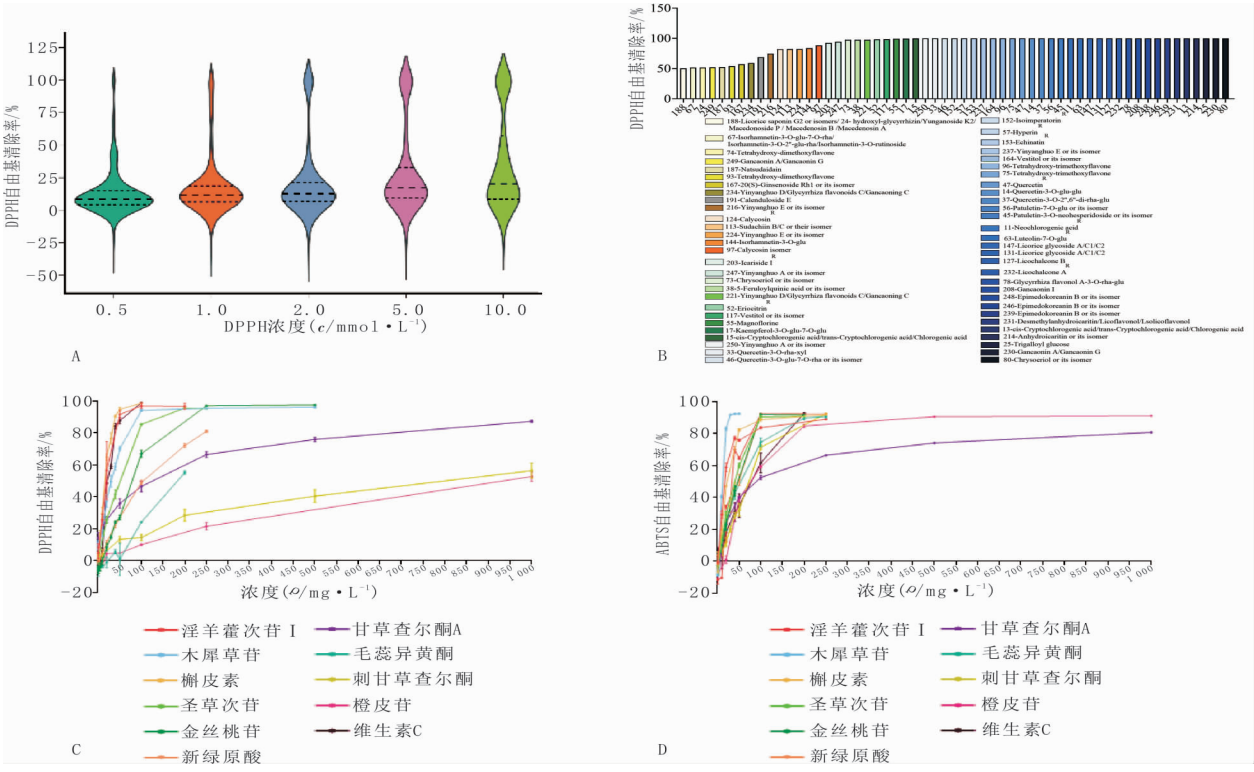
与自由基反应后可降低质谱响应的原理，筛选金水缓纤方中可清除自由基的成分[20]。DPPH 与提取物的浓度比可影响筛选自由基清除成分的灵敏度[21]：若使用相对过量的 DPPH，很多成分的质谱响应完全消除而未能观察到其自由基清除能力的差异；当 DPPH 浓度较低时，一些成分的自由基清除能力未被检出。当 DPPH 浓度为 10 mmol · L^{-1}时，不同化合物的自由基清除能力差异更显著，见图 3A。当 DPPH 浓度 < 10 mmol · L^{-1}时，金水缓纤方中自由基清除作用 > 50% 的成分见图 3B，这些成分可能是潜在的自由基清除活性成分。

本研究测定了质谱响应减少超过 50% 且含有标准品的 11 种活性物质的 DPPH 和 ABTS 自由基清除率。其中，槲皮素和淫羊藿次苷Ⅰ对 DPPH 的清除能力比阳性药维生素 C 强，IC_{50}分别为（16.05 ± 0.83）mg · L^{-1}和（18.92 ± 4.42）mg · L^{-1}；木犀草苷和淫羊藿次苷Ⅰ对 ABTS 的清除能力比阳性药维生素 C 强，IC_{50}分别为（10.36 ± 0.17）mg · L^{-1}和（13.82 ± 0.76）mg · L^{-1}，见图 3C、图 3D、表 3。由此可知，淫羊藿次苷Ⅰ具有显著的自由基清除能力。



注：A：Ferritin、GPX4、xCT 蛋白条带图；B—D：Ferritin、GPX4、xCT 蛋白表达水平比较；与空白组比较，###P < 0.001，###P < 0.000 1；与模型组比较，**P < 0.01，***P < 0.001，****P < 0.000 1。

图 2　各组 BEAS－2B 细胞 xCT、GPX4、Ferritin 蛋白表达水平比较



注：A：0.5、1.0、2.0、5.0、10.0 mmol · L^{-1} DPPH 下金水缓纤方成分质谱峰响应值分布（自由基清除作用）；B：金水缓纤方中自由基清除作用 > 50% 的成分，^{R}：通过标准品比对的成分；C：11 种活性成分对 DPPH 的自由基清除率；D：11 种活性成分对 ABTS 的自由基清除率。

图 3　金水缓纤方中具有清除自由基能力的 11 种活性成分

3.4　淫羊藿次苷 I 调节 xCT/GPX4 和 Ferritin 通路抑制 BEAS－2B 细胞铁死亡

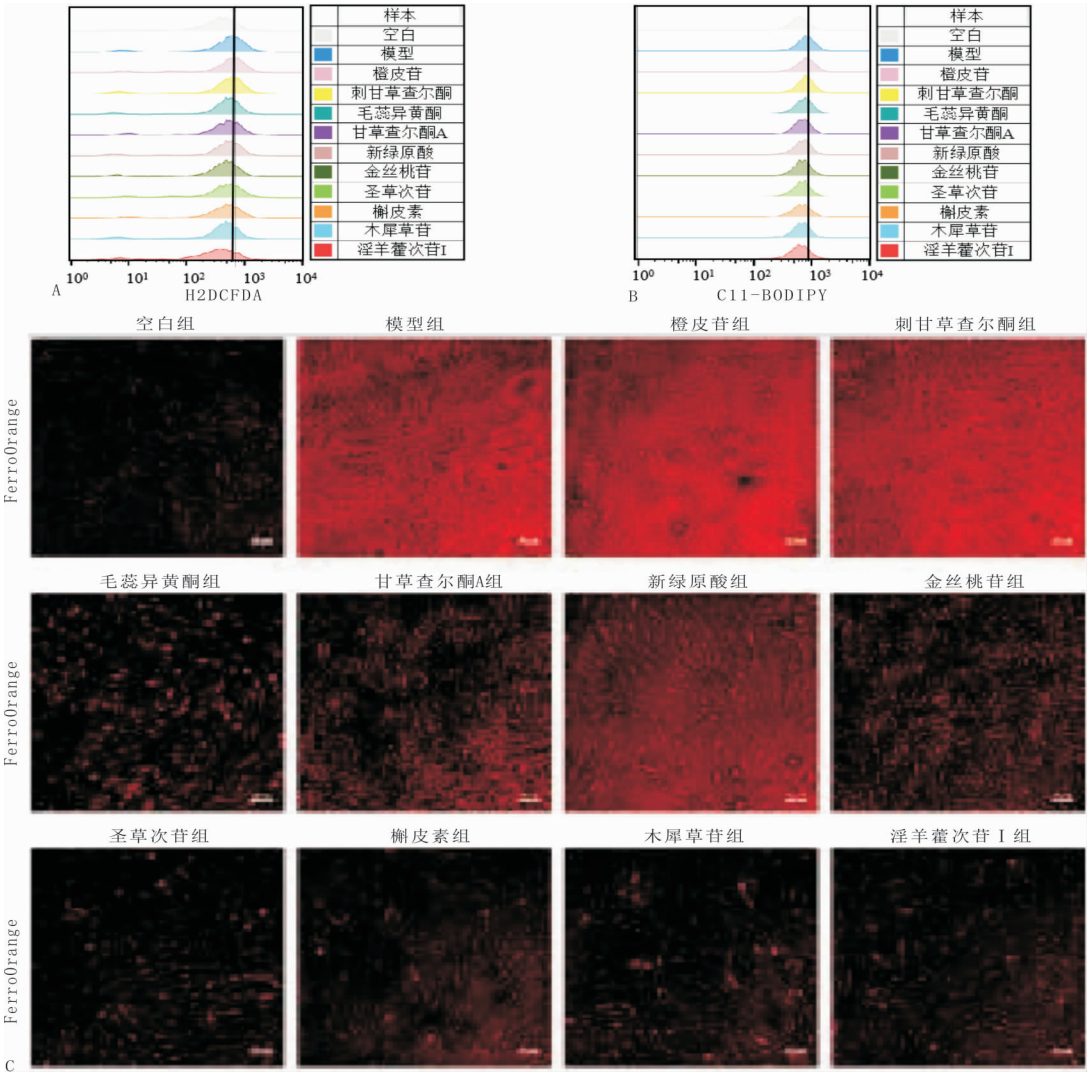
3.4.1　BEAS－2B 细胞活性　与模型组比较，异甘草素组细胞存活率降低，毛蕊异黄酮、甘草查尔酮 A、新绿原酸、金丝桃苷、圣草次苷、槲皮素、木犀草苷、淫羊藿次苷I组细胞存活率升高（$P<0.000\ 1$），见表 4。

3.4.2　BEAS－2B 细胞内 ROS、LPO 含量　与模型组比较，毛蕊异黄酮、甘草查尔酮 A、新绿原酸、金丝桃苷、圣草次苷、槲皮素、木犀草苷、淫羊藿次苷 I 组细胞内 ROS、LPO 含量减少（$P<0.000\ 1$），见图 4A、图 4B、表 4。

3.4.3　BEAS－2B 细胞内 Fe^{2+} 含量、xCT/GPX4 和 Ferritin 通路相关蛋白　与模型组比较，毛蕊异黄酮、甘草查尔酮 A、新绿原酸、金丝桃苷、圣草次苷、槲皮素、木犀草苷、淫羊藿次苷 I 组细胞内 Fe^{2+} 含量减少（$P<0.001$），见表 4、图 4C。

表 3　金水缓纤方中活性成分的自由基清除能力　（$\bar{x}\pm s$）

活性成分	DPPH IC_{50}（ρ/mg·L^{-1}）	ABTS IC_{50}（ρ/mg·L^{-1}）
淫羊藿次苷 I	18.92±4.42	13.82±0.76
槲皮素	16.05±0.83	19.02±0.67
木犀草苷	32.66±1.54	10.36±0.17
圣草次苷	47.16±3.09	35.10±1.71
金丝桃苷	71.54±1.05	39.30±1.40
新绿原酸	161.86±38.60	43.31±1.20
甘草查尔酮 A	187.01±38.63	46.46±2.34
毛蕊异黄酮	231.95±23.35	49.35±3.27
刺甘草查尔酮	1057.89±84.85	67.74±4.79
橙皮苷	1076.72±51.30	75.16±2.58
异甘草素	–	128.76±12.48
维生素 C	22.30±0.53	26.38±0.72



注：A：流式细胞术检测细胞内 ROS 含量；B：流式细胞术检测细胞内 LPO 含量；C：FerroOrange 检测细胞内 Fe^{2+} 含量（×200）。

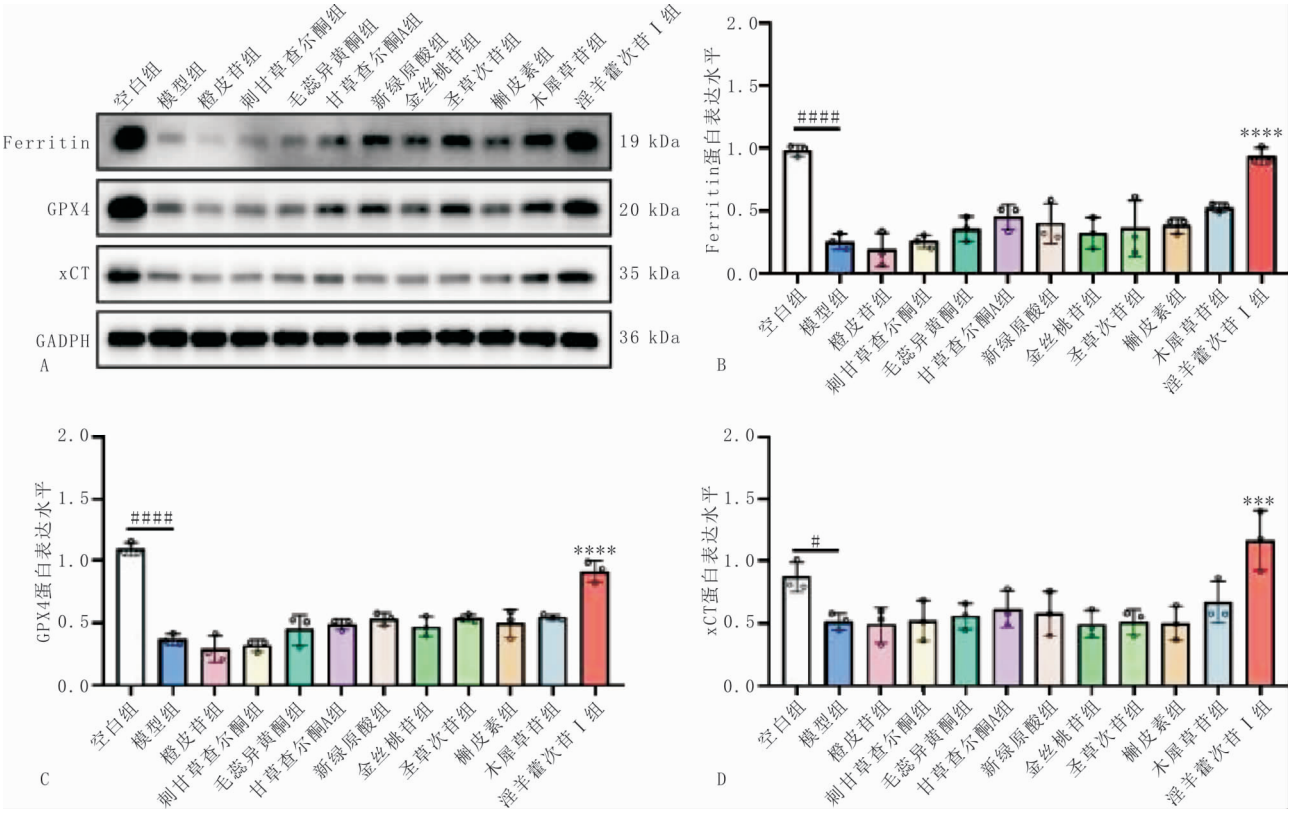
图 4　候选活性成分对 BEAS－2B 细胞内 ROS、LPO、Fe^{2+} 含量的影响

表 4　各组 BEAS－2B 细胞存活率、ROS 含量、LPO 含量、Fe^{2+} 含量比较　（$\bar{x} \pm s$）

组别	n	细胞存活率/%	ROS 含量	LPO 含量	Fe^{2+} 含量
空白组	3	100.00 ± 0.15$^{\#\#\#\#}$	1.00 ± 0.00$^{\#\#\#\#}$	1.00 ± 0.00$^{\#\#\#\#}$	1.00 ± 0.00$^{\#\#\#\#}$
模型组	3	47.73 ± 2.28	1.43 ± 0.01	1.29 ± 0.01	1.50 ± 0.01
异甘草素组	3	9.95 ± 0.62****	–	–	–
橙皮苷组	3	44.88 ± 1.24	1.41 ± 0.01	1.27 ± 0.02	1.39 ± 0.09
刺甘草查尔酮组	3	48.78 ± 1.88	1.41 ± 0.04	1.28 ± 0.01	1.34 ± 0.15
毛蕊异黄酮组	3	53.84 ± 0.86****	1.29 ± 0.05***	1.19 ± 0.01****	1.17 ± 0.15***
甘草查尔酮 A 组	3	66.43 ± 1.16****	1.27 ± 0.04****	1.12 ± 0.00****	1.14 ± 0.08***
新绿原酸组	3	70.24 ± 1.03****	1.25 ± 0.03****	1.11 ± 0.01****	1.13 ± 0.08***
金丝桃苷组	3	83.44 ± 2.41****	1.22 ± 0.03****	1.11 ± 0.00****	1.11 ± 0.07****
圣草次苷组	3	96.39 ± 0.62****	1.20 ± 0.05****	1.08 ± 0.01****	1.02 ± 0.06****
槲皮素组	3	97.21 ± 0.37****	1.17 ± 0.02****	1.07 ± 0.01****	1.01 ± 0.06****
木犀草苷组	3	103.58 ± 1.26****	1.12 ± 0.03****	1.07 ± 0.00****	1.00 ± 0.06****
淫羊藿次苷Ⅰ组	3	118.17 ± 1.19****	0.91 ± 0.03****	1.04 ± 0.01****	0.95 ± 0.06****

注：与空白组比较，####P < 0.000 1；与模型组比较，***P < 0.001，****P < 0.000 1。

与空白组比较，模型组细胞 Ferritin、GPX4、xCT 蛋白表达水平降低（P < 0.05）；与模型组比较，淫羊藿次苷Ⅰ组细胞 xCT、GPX4、Ferritin 蛋白表达水平升高（P < 0.001），见图 5A—D。由此提示，淫羊藿次苷Ⅰ可能是金水缓纤方的重要活性成分，通过调控 xCT/GPX4 和 Ferritin 信号通路从而缓解 BEAS－2B 细胞铁死亡。



注：A：Ferritin、GPX4、xCT 蛋白条带图；B—D：Ferritin、GPX4、xCT 蛋白表达水平比较；与空白组比较，#P < 0.05，####P < 0.000 1；与模型组比较，***P < 0.001，****P < 0.000 1。

图 5　各组 BEAS－2B 细胞 xCT、GPX4、Ferritin 蛋白表达水平比较

4　讨论

研究表明，自由基诱导的脂质过氧化是肺上皮细胞发生铁死亡的关键因素。在 IPF 的早期阶段，急性肺损伤导致肺上皮细胞 ROS 水平升高及显著的脂质过氧化表现，且肺组织出现铁死亡特征性线

粒体超微结构改变[8]。前期研究发现，金水缓纤方能够上调肺纤维化大鼠体内超氧化物歧化酶、过氧化氢酶、核转录相关因子 2 水平，下调髓过氧化物酶、丙二醛、还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶4 水平，有效抑制氧化应激[6]。本研究显示，金水缓纤方可清除自由基，由此推测该方可能通过改善肺细胞氧化应激，从而抑制 BEAS－2B 细胞铁死亡。

铁死亡是一种特殊的细胞死亡方式，通常伴有细胞内铁的异常累积和氧化还原失衡，其中 Fe^{2+}、ROS、LPO 均为公认的铁死亡特征性标志物。Ferritin 是细胞内的主要铁储存蛋白，能够将多余的 Fe^{2+} 以安全的形式储存在蛋白质外壳内，从而防止 Fe^{2+} 的过度积累。Ferritin 异常表达会引起铁代谢紊乱，细胞内游离 Fe^{2+} 过载，破坏氧化还原平衡，从而导致 ROS 过量产生。过量 ROS 可引发脂质过氧化反应，导致脂质分子的氧化损伤，进而产生 LPO 等脂质过氧化产物[22－23]。xCT/GPX4 信号通路是细胞内抑制铁死亡的主要通路，亦可维持自由基平衡。xCT 将谷氨酸运出细胞，胱氨酸运入细胞来调控谷胱甘肽（glutathione，GSH）的合成。GSH 是一种重要的自由基清除剂，能够中和细胞内的 ROS。GPX4 是 GSH 过氧化物酶家族中的重要成员，以 GSH 为辅因子，将 LPO 还原为脂质醇，从而抑制脂质过氧化反应。当 xCT 功能受损，GSH 合成减少，导致 GPX4 活性降低，LPO 得不到有效清除，会加剧铁死亡进程[24－26]。本研究发现，金水缓纤方显著提高 BEAS－2B 细胞存活率，降低细胞内 ROS、LPO、Fe^{2+} 水平，上调 GPX4、xCT、Ferritin 蛋白表达水平，从而确定金水缓纤方具有缓解 BEAS－2B 细胞铁死亡的作用。

在铁死亡过程中，细胞内 Fe^{2+} 与过氧化氢反应生成羟基自由基，易攻击细胞膜上的多不饱和脂肪酸，进而生成 LPO。期间，GPX4 功能受损、GSH 水平降低，自由基的清除能力减弱，LPO 积累加剧，从而破坏细胞膜的完整性，最终导致细胞死亡。铁催化的自由基生成和脂质过氧化积累是铁死亡的主要驱动因素[27－30]。本研究通过离线 DPPH－UHPLC－Q－Orbitrap－MS/MS 技术从金水缓纤方提取物中快速筛选潜在的自由基清除剂，主要包括异甘草素、橙皮苷、刺甘草查尔酮、毛蕊异黄酮、甘草查尔酮 A、新绿原酸、金丝桃苷、圣草次苷、槲皮素、木犀草苷、淫羊藿次苷Ⅰ等 11 种活性成分。研究发现，淫羊藿次苷Ⅰ在 DPPH 和 ABTS 自由基清除实验中表现出显著的自由基清除能力。毛蕊异黄酮、甘草查尔酮 A、新绿原酸、金丝桃苷、圣草次苷、槲皮素、木犀草苷、淫羊藿次苷Ⅰ可显著降低细胞内 ROS、LPO 及 Fe^{2+} 含量，提示这些成分具有清除自由基和保护细胞膜脂质的作用，从而抑制铁死亡的发生。淫羊藿次苷Ⅰ可显著上调 xCT、GPX4 及 Ferritin 蛋白表达水平，提示其具有清除自由基和调节铁稳态的能力，是一种潜在的铁死亡治疗剂。

综上所述，金水缓纤方及淫羊藿次苷Ⅰ通过缓解 BEAS－2B 细胞内铁过载、恢复细胞氧化还原平衡以及调节 xCT/GPX4 和 Ferritin 信号通路，有效抑制铁死亡，减轻细胞损伤。本研究提示，铁死亡在肺上皮细胞损伤中发挥重要作用，淫羊藿次苷Ⅰ可能是金水缓纤方发挥抑制铁死亡作用的关键活性物质。未来可进一步构建动物模型，并结合代谢组学及组分分析技术，全面阐释淫羊藿次苷Ⅰ抑制肺上皮细胞铁死亡的作用机制。

参考文献：

[1] LEDERER D J，MARTINEZ F J. Idiopathic pulmonary fibrosis[J]. N Engl J Med，2018，378(19)：1811－1823.

[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] GALLI J A，PANDYA A，VEGA－OLIVO M，et al. Pirfenidone and nintedanib for pulmonary fibrosis in clinical practice：Tolerability and adverse drug reactions[J]. Respirology，2017，22(6)：1171－1178.

[4] YANG S G，YU X Q，LI J S，et al. Efficacy and safety of Jin－Shui Huan－Xian granule for idiopathic pulmonary fibrosis：study protocol for a multicenter，randomized，double－blind，placebo－controlled trial[J]. Trials，2022，23(1)：725.

[5] YU X Q，YANG S G，XIE Y，et al. Traditional Chinese medicine in the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis based on syndrome differentiation：Study protocol of an exploratory trial[J]. J Integr Med，2020，18(2)：163－168.

[6] BAI Y P，LI J S，ZHAO P，et al. A Chinese herbal formula ameliorates pulmonary fibrosis by inhibiting oxidative stress via upregulating Nrf2[J]. Front Pharmacol，2018，9：628.

[7] ROCHETTE L，DOGON G，RIGAL E，et al. Lipid peroxidation and iron metabolism：two corner stones in the homeostasis control of ferroptosis[J]. Int J Mol Sci，2022，24(1)：449.

[8] ZHAN P，LU X，LI Z，et al. Mitoquinone alleviates bleomycin－induced acute lung injury via inhibiting mitochondrial ROS－dependent pulmonary epithelial ferroptosis[J]. Int

Immunopharmacol,2022,113(Pt A):109359.
[9]YAO J X,ZHANG Y C,LI M L,et al. Single - cell RNA - seq reveals the promoting role of ferroptosis tendency during lung adenocarcinoma EMT progression[J]. Front Cell Dev Biol,2022,9:822315.
[10]李亚,王晶,李建生,等. 治疗肺纤维化方药对 $PM_{2.5}$ 致大鼠肺损伤的保护作用[J]. 中华中医药杂志,2019,34(6):2426 - 2431.
[11]SHAO D,LIU X G,WU J Y,et al. Identification of the active compounds and functional mechanisms of Jinshui Huanxian formula in pulmonary fibrosis by integrating serum pharmacochemistry with network pharmacology[J]. Phytomedicine,2022,102:154177.
[12]DIXON S J,LEMBERG K M,LAMPRECHT M R,et al. Ferroptosis:an iron - dependent form of nonapoptotic cell death[J]. Cell,2012,149(5):1060 - 1072.
[13]STOCKWELL B R,ANGELI J P F,BAYIR H,et al. Ferroptosis:a regulated cell death nexus linking metabolism,redox biology,and disease[J]. Cell,2017,171(2):273 - 285.
[14]国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京:中国医药科技出版社,2020.
[15]ZHU J F,YI X J,ZHANG J H,et al. Chemical profiling and antioxidant evaluation of Yangxinshi Tablet by HPLC - ESI - Q - TOF - MS/MS combined with DPPH assay[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci,2017,1060:262 - 271.
[16]ZHOU S D,XU X,LIN Y F,et al. On - line screening and identification of free radical scavenging compounds in Angelica dahurica fermented with Eurotium cristatum using an HPLC - PDA - Triple - TOF - MS/MS - ABTS system[J]. Food Chem,2019,272:670 - 678.
[17]MA H X,LIU Y,MIAO Z,et al. Neratinib inhibits proliferation and promotes apoptosis of acute myeloid leukemia cells by activating autophagy - dependent ferroptosis[J]. Drug Dev Res,2022,83(7):1641 - 1653.
[18]MARTINEZ A M,KIM A,YANG W S. Detection of ferroptosis by BODIPY™ 581/591 C11[J]. Methods Mol Biol,2020,2108:125 - 130.
[19]XU C Y,XU C,XU Y N,et al. Poliumoside protects against type 2 diabetes - related osteoporosis by suppressing ferroptosis via activation of the Nrf2/GPX4 pathway[J]. Phytomedicine,2024,125:155342.
[20]WANG X,ZUO G L,WANG C Y,et al. An off - line DPPH - GC - MS coupling countercurrent chromatography method for screening,identification,and separation of antioxidant compounds in essential oil[J]. Antioxidants (Basel),2020,9(8):702.
[21]YANG Z Z,LI Z H,LI Z. DPPH - HPLC - MS assisted rapid identification of endothelial protective substances from Xiao - Ke - An[J]. J Ethnopharmacol,2018,211:188 - 196.
[22]DIXON S J,OLZMANN J A. The cell biology of ferroptosis[J]. Nat Rev Mol Cell Biol,2024,25(6):424 - 442.
[23]JIANG X J,STOCKWELL B R,CONRAD M. Ferroptosis:mechanisms,biology and role in disease[J]. Nat Rev Mol Cell Biol,2021,22(4):266 - 282.
[24]ZHANG J,WANG X Y,GUAN B Y,et al. Qing - Xin - Jie - Yu Granule inhibits ferroptosis and stabilizes atherosclerotic plaques by regulating the GPX4/xCT signaling pathway[J]. J Ethnopharmacol,2023,301:115852.
[25]WEN R J,DONG X,ZHUANG H W,et al. Baicalin induces ferroptosis in osteosarcomas through a novel Nrf2/xCT/GPX4 regulatory axis[J]. Phytomedicine,2023,116:154881.
[26]LIU J,KANG R,TANG D L. Signaling pathways and defense mechanisms of ferroptosis[J]. FEBS J,2022,289(22):7038 - 7050.
[27]TANG D L,CHEN X,KANG R,et al. Ferroptosis:molecular mechanisms and health implications[J]. Cell Res,2021,31(2):107 - 125.
[28]STOCKWELL B R. Ferroptosis turns 10:Emerging mechanisms,physiological functions,and therapeutic applications[J]. Cell,2022,185(14):2401 - 2421.
[29]CHEN X,LI J B,KANG R,et al. Ferroptosis:machinery and regulation[J]. Autophagy,2021,17(9):2054 - 2081.
[30]URSINI F,MAIORINO M. Lipid peroxidation and ferroptosis:the role of GSH and GPx4[J]. Free Radic Biol Med,2020,152:175 - 185.

收稿日期:2025 - 01 - 28
作者简介:高艺桐(1999 -),女,河北沧州人,理学硕士,研究方向:中医药防治呼吸系统疾病。
通信作者:刘新光(1987 -),男,辽宁沈阳人,医学博士,教授,研究方向:中医药防治呼吸系统疾病。E - mail:xgliu2016@126.com

编辑:刘凯歌