

基于网络药理学和实验验证探讨热淋清颗粒治疗特发性肺纤维化的作用

范志梁¹, 李 倩¹, 张志同², 吴大梅¹, 李来来¹, 张丽艳¹, 柴艺汇^{1*}, 蒲 翔^{1*}
(1. 贵州中医药大学, 贵州 贵阳 550025; 2. 南京中医药大学, 江苏 南京 210023)

摘要: **目的** 探讨热淋清颗粒治疗特发性肺纤维化 (IPF) 的作用。**方法** 采用液相色谱-质谱联用技术分析热淋清颗粒化学成分, 预测潜在靶点并构建蛋白质相互作用 (PPI) 网络, 进行富集分析和分子对接验证。以脂多糖 (LPS) 诱导 L929 成纤维细胞炎症模型及博来霉素 (BLM) 诱导 SD 大鼠肺纤维化模型, 设对照组、模型组、地塞米松组及热淋清低、中、高剂量组。HE 和 Masson 染色观察肺组织病理变化, ELISA 法检测血清及细胞培养上清液中炎症因子水平, RT-qPCR 和 Western blot 法检测肺组织及细胞 TLR4、MyD88、NF- κ B p65、TGF- β 1、Smad3、 α -SMA mRNA 和蛋白表达。**结果** 共筛得 278 个与纤维化相关的潜在靶点, IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、TLR4 为核心节点; 分子对接显示主要成分与靶点结合良好。与模型组比较, 热淋清各剂量组可降低 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、PGE₂ 水平 ($P<0.01$), 下调 TLR4、MyD88、NF- κ B p65、TGF- β 1、Smad3、 α -SMA mRNA 和蛋白表达 ($P<0.05$, $P<0.01$), 改善炎症及纤维化病变。**结论** 热淋清颗粒可通过调控 TLR4/TGF- β 1/Smad 信号通路并抑制上皮-质转化, 发挥抗炎及抗纤维化作用。**关键词:** 热淋清颗粒; 特发性肺纤维化; TLR4/TGF- β 1/Smad 信号通路; 网络药理学
中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2026)08-2775-11
doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2026.08.038

特发性肺纤维化 (idiopathic pulmonary fibrosis, IPF) 是一种严重的慢性间质性肺病, 其特征为肺组织过度瘢痕的形成及不可逆的纤维化过程^[1]。患者通常表现为呼吸困难、胸闷、胸痛等。研究表明, 特发性肺纤维化患者的中位生存期仅为 2.9 年, 且其发病率与死亡率在全球范围内呈上升趋势, 已成为日益严重的公共卫生威胁^[2]。尽管吡非尼酮、尼达尼布等抗纤维化药物已应用于临床, 但其疗效有限且存在明显的不良反应, 仍亟须探索新的干预策略。

近年来, 利用中药及天然化合物治疗肺纤维化的研究受到诸多关注^[3]。其中, 被收录于 2025 年版《中国药典》的热淋清颗粒是仅以头花蓼 *Polygonum capitatum* Buch. -Ham. ex D. Don 为原料制成的单方制剂, 具有清热解毒、利尿通淋之功效。传统中医认为, IPF 多属“肺痿”“肺痹”范畴, 其核心病机与“热毒壅肺、痰瘀互结”密切相关, 用药常以清热解毒为主。热淋清颗粒已被证

实具有抗炎与调控信号通路作用, 推测其在肺纤维化中的跨系统应用具有一定的病机契合性与药理学依据。因此, 本研究通过网络药理学方法分析预测热淋清颗粒的主要活性成分、作用靶点及作用机制, 并结合体内外模型进行实验验证, 以期明确热淋清颗粒治疗肺纤维化的作用机制, 为其临床应用提供理论依据。

1 材料

1.1 实验动物、细胞

SPF 级雄性 SD 大鼠 30 只, 6~8 周龄, 体质量 180~220 g, 由北京华阜康生物科技股份有限公司提供, 饲养于贵州中医药大学实验动物研究所 [实验动物使用许可证号 SYXK (黔) 2021-0005], 饲养环境 12 h/12 h 光暗交替, 温度 (25 $\pm$ 1) $^{\circ}$ C, 相对湿度 (55 $\pm$ 5)%, 自由摄食饮水。L929 细胞购自中国科学院昆明细胞库。

1.2 试剂与药物

热淋清颗粒 (批号 210602) 购自贵州威门药业股份有限公司; 地塞米松 (批号 210113) 购自浙江仙琚制药股份有限公司; 博来

收稿日期: 2025-11-07
基金项目: 国家自然科学基金 (82060913); 贵州省苗医药全省重点实验室 (黔科合平台 [2025] 018); 贵阳市科技计划项目 [(2020) -10-12, (2021) -43-11]
作者简介: 范志梁 (1997—), 男, 博士在读, 从事中药民族药药理物质基础研究。E-mail: ZL_FAN@163.com
* 通信作者: 蒲 翔 (1978—), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 从事中药民族药药理研究。E-mail: puxiang0318@163.com
柴艺汇 (1985—), 女, 博士, 正高级实验师, 硕士生导师, 从事中药民族药药理研究。E-mail: yihuichai@163.com

霉素 (BLM, 批号 B802467) 购自上海麦克林生化科技股份有限公司。1640 培养基 (批号 C1199550013T) 购自美国 Gibco 公司; 胎牛血清 (批号 04-001-1ACS) 购自上海逍鹏生物科技有限公司; MTT 购自北京索莱宝科技有限公司 (批号 M8180); TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 ELISA 试剂盒 (批号 M220415-102b、M220415-001b、M220415-004b) 均购自深圳欣博盛生物科技有限公司; PGE₂ ELISA 试剂盒 (批号 20220510) 购自武汉基因美生物科技有限公司; Ultrapure RNA、兔二抗、鼠二抗、BCA 蛋白定量试剂盒、ECL 高灵敏度化学发光检测试剂盒 (批号 18721、01404/20039、01325/30503、30324、50330) 均购自北京康为世纪生物科技有限公司; HiScript II One Step qRT-PCR SYBR Green (批号 7F531J1) 购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司; TLR4 抗体 (批号 20211210) 购自武汉贝茵莱生物科技有限公司; MyD88、NF- κ B p65、 α -SMA、GAPDH 抗体 (批号 GR3356289-15、GR3275776-13、GR244953-1、GR3316865-8) 均购自英国 Abcam 公司; Smad3、TGF- β 1、 β -actin 抗体 (批号 36s1274、81j9685、ab6276) 均购自江苏亲科生物研究中心有限公司。

1.3 仪器 Ultimate 3000 型毛细管高效液相色谱仪、Q-ExactiveHFX 型质谱仪 (美国赛默飞世尔科技公司); Microfuge 22R Centrifuge 型低温高速离心机 (美国贝克曼库尔特公司); MX-S 型涡旋仪 (美国赛洛捷克公司); TS-100F 型倒置相差显微镜 (日本尼康公司); CUSA31311 型二氧化碳培养箱 (美国 Sheldon 公司); EL10A 型自动酶标仪 (山东博科集团控股有限公司); QuantStudio 1 型实时荧光定量仪 (美国 Applied Biosystems 公司); MC170HD 型成像系统 (德国徕卡公司); EPS-300 型电泳仪 (上海天能科技有限公司); Mini Trans-Blot 型蛋白转印系统 (美国伯乐公司)。

2 方法

2.1 化学成分分析

2.1.1 供试品制备 将原料药材 (头花蓼) 加入适量水, 煎煮 2 次, 每次 1.5 h; 煎液滤过, 滤液合并, 喷雾干燥得到干浸膏粉; 加入可溶性淀粉作为辅料, 充分混合后制粒; 干燥后制成颗粒剂。加入超纯水将样品溶解, 高速离心取上清液, 即得。

2.1.2 色谱-质谱条件 使用 Waters HSS T3 色谱柱 (2.1 mm $\times$ 100 mm, 1.7 μ m); 流动相甲醇 (A)-含 0.1% 甲酸的甲醇 (B), 梯度洗脱 (0~1

min, 2% B; 1~14 min, 2%~100% B; 14.1~16 min, 100%~2% B); 柱温 40 $^{\circ}$ C; 体积流量 0.3 mL/min。一级质谱分辨率 70 000, 扫描范围 m/z 150~1 500; 二级分辨率 17 500。

2.2 网络药理学

2.2.1 药物类似性与药物毒性分析 依据 Lipinski 五规则 (Ro5), 采用 Swiss ADME (吸收、分布、代谢、排泄) 网络工具 (<http://www.swissadme.ch/>) 对热淋清颗粒中的成分进行药理学参数计算, 筛选标准为胃肠道高吸收 (GI absorption = high) 且符合设定的类药性标准的化合物, 将其作为潜在候选成分。通过 Protox II 网络服务器 (https://tox-new.charite.de/protox_II/) 评估成分的毒理学参数, 将肝毒性、致癌性、免疫毒性及致突变性等毒理学特征以“活性”或“非活性”的二元形式进行分类。

2.2.2 药物靶点获取 根据上述方法得到的热淋清颗粒核心成分, 借助 Swiss 靶点预测工具 (<http://www.swisstargetprediction.ch/>) 获得其潜在作用靶点。

2.2.3 疾病靶点筛选 为确保靶点数据的准确性与全面性, 使用“pulmonary fibrosis”“lung fibrosis”“idiopathic pulmonary fibrosis”“IPF”等关键词, 检索 GeneCards、DrugBank、OMIM、Therapeutic Target Database 等多个数据库, 以获取肺纤维化相关的核心靶点。

2.2.4 蛋白质-蛋白质相互作用 (PPI) 网络分析 将交集靶点上传至 STRING 11.5 数据库, 选择“人 (*Homo sapiens*)”作为研究物种, 设定置信度评分 0.40 进行 PPI 网络分析。将所得数据导入 Cytoscape 3.7.2 软件, 分析蛋白质间的相互作用关系, 阐明参与肺纤维化过程的相关蛋白质的潜在功能。

2.2.5 GO 功能及 KEGG 富集分析 借助 Metascape 数据库对核心靶点进行富集分析, 包括基因本体 (GO) 分析 [生物学过程 (BP)、分子功能 (MF) 及细胞组分 (CC)] 及京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路分析。设定统计学显著性水平为 $P\leq 0.01$, 筛选排名前 20 位的 GO 富集结果及 KEGG 通路进行后续分析。

2.2.6 “药物-靶点-通路”网络构建 将生物信息学富集分析结果与药物-疾病交集靶点数据导入 Cytoscape 3.7.2 软件, 构建“药物-靶点-通路”网络。

2.3 分子对接 从上述网络中筛选核心靶点与核心成分进行分子对接研究。在 RCSB PDB 数据库获取 PDB 格式的蛋白质结构, PubChem 数据库下载小分子化合物结构。采用 Schrödinger 与 PyMOL 软件进行分子对接及可视化分析, 以对接评分作为评估成分与靶点结合活性的参考指标。

2.4 实验验证

2.4.1 细胞培养 小鼠成纤维细胞 L929 于含 10% 胎牛血清及 1% 双抗的 1640 培养基中, 置于 37 ℃、5% CO₂ 恒温培养箱中培养。本实验将 L929 细胞随机分为对照组 (仅含正常培养基)、模型组 (0.1 mg/L LPS)、地塞米松组 (0.01 mg/L 地塞米松+0.1 mg/L LPS) 及热淋清低、中、高剂量组 (1、5、10 g/L 热淋清+0.1 mg/L LPS)。

2.4.2 动物模型建立与分组 将大鼠随机分为对照组、模型组、地塞米松组 (1.5 mg/kg) 及热淋清低、中、高剂量组 (1.2、2.4、4.8 g/kg), 剂量根据人与大鼠体表面积进行换算 (热淋清颗粒成人临床推荐剂量为 24 g/日)^[4]。除对照组外, 其余各组大鼠均通过气管内注射 5 mg/kg BLM 构建急性肺纤维化模型, 造模 7 d 后开始灌胃给药, 每天 1 次, 连续给药 21 d。末次给药后 24 h, 大鼠腹腔注射 1% 戊巴比妥钠 (30 mg/kg) 进行麻醉, 并在样本采集完成后通过颈椎脱臼法处死。所有实

验操作均严格遵循伦理准则, 并经贵州中医药大学动物实验伦理委员会批准 (伦理审批号 20210151)。

2.4.3 HE、Masson 染色观察肺组织病理形态 取大鼠左侧肺组织, 置于 4% 多聚甲醛中固定 24 h 以上, 随后对组织进行脱水、透明、包埋、切片处理, 采用苏木精-伊红 (HE) 染色与 Masson 三色染色, 最后用中性树胶封片, 在光学显微镜下观察大鼠肺组织病理变化。

2.4.4 ELISA 法检测血清及细胞炎症因子水平 采用 ELISA 试剂盒, 按照试剂盒说明书检测大鼠血清及 L929 细胞培养上清液中肿瘤坏死因子-α (TNF-α)、白细胞介素-1β (IL-1β)、白细胞介素-6 (IL-6) 及前列腺素 E₂ (PGE₂) 水平。使用 Cuxpt32 分析软件绘制标准曲线, 结果以各炎症细胞因子水平表示。

2.4.5 RT-qPCR 法检测肺组织和细胞相关 mRNA 表达 采用 RNA 提取试剂盒提取大鼠肺组织总 RNA, 采用 TRIzol 试剂提取 L929 细胞总 RNA, 严格遵循各试剂盒说明书操作。检测 RNA 纯度与片段完整性后, 按照 cDNA 逆转录试剂盒说明书进行逆转录反应, 随后进行 PCR 扩增反应。以 β-actin 为内参, 采用 2^{-ΔΔCT} 法计算 mRNA 相对表达量, 引物序列见表 1。

表 1 引物序列

基因	正向序列(5'→3')	反向序列(5'→3')	长度/bp
TLR4	GCCATTGCTGCCAACATC	TGCCAGAGCGGCTACTCA	148
MyD88	CCTACGGTTCATCACTATCTG	ACCTCAAGCAAGGCAAAA	291
NF-κB p65	GAGGCACGAGGCTCCTTTTCT	CTAGCTGCATGGAGACTCGAACA	118
TGF-β1	GGCGGTGCTCGCTTTTGA	TCCCGAATGTCTGACGTATTGA	201
α-SMA	CTGAAGTATCCGATAGAACACG	TCCAGACTCCAGCACAAAT	270
Smad3	GGGCTTTGAGGCTGTCTA	CCCTTTACTCCCAGTGTCT	224
β-actin	TTGCTGACAGGATGCAGAAG	TAGAGCCACCAATCCACACA	108

2.4.6 Western blot 法检测肺组织和细胞各目的蛋白表达 体内实验: 将于-80 ℃保存的肺组织在冰上解冻, 用预冷的 PBS 冲洗, 置于裂解液中, 用组织匀浆机匀浆, 离心后收集上清液。体外实验: 用 PBS 冲洗 L929 细胞, 加入裂解液裂解细胞, 用移液器吸头充分刮擦细胞以确保细胞完全破碎, 裂解液离心后, 收集上清液。采用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白质浓度, 并通过 SDS-PAGE 电泳分离后, 转移至 PVDF 膜上, 用 5% 脱脂牛奶封闭膜, 并用含 0.1% 吐温-20 的 TBST 冲洗。加一抗 TLR4 (1 : 10 000)、MyD88 (1 : 2 000)、NF-κB p65 (1 : 2 000)、α-SMA (1 : 3 000)、Smad3 (1 : 1 000)、TGF-β1 (1 : 1 000), 4 ℃ 孵育过夜后

TBST 冲洗膜, 随后加入相应的二抗 (1 : 200), 室温孵育 1.5 h。ECL 法显影, 凝胶成像系统捕获图像。使用 Gel-Pro Analyzer 4.0 软件对条带灰度值进行定量分析。

2.5 统计学分析 采用 SPSS 26.0 与 GraphPad Prism 10.1.2 软件进行统计与数据可视化, 所有实验数据以均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用单因素方差分析。P<0.05 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 热淋清颗粒整体化学谱分析 热淋清颗粒成分复杂, 其中以苯丙素类/黄酮类化合物和有机酸为主, 见图 1A。通过对比保留时间、现有对照品、

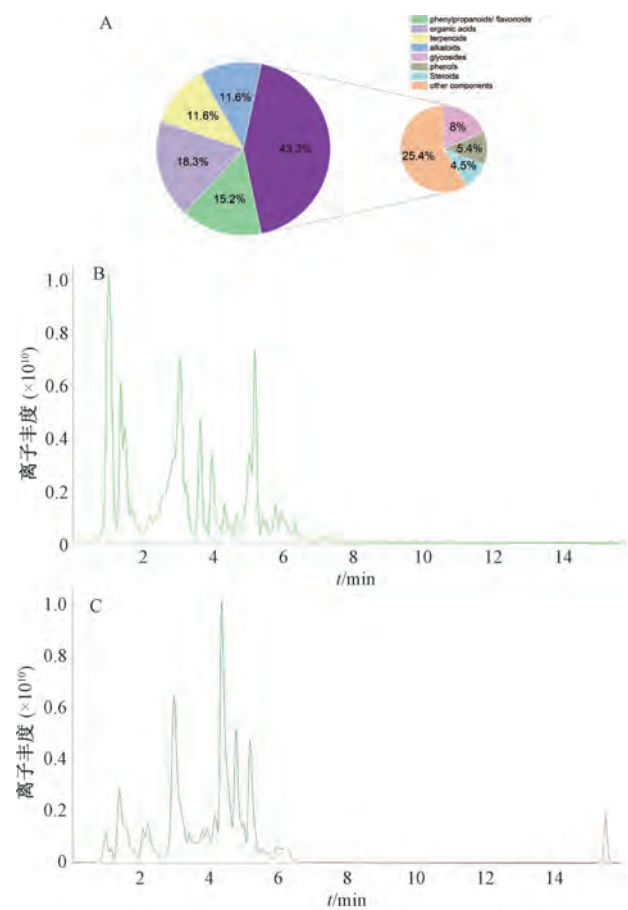


图 1 热淋清颗粒成分分析与药效学评价图



图 2 热淋清颗粒药效学评价图

高分辨 MS/MS 数据及特征裂解模式，并结合以往研究报道，对这些化合物进行了初步表征，其在正、负离子模式下的总离子流图见图 1B~1C。这些结果揭示了热淋清颗粒化学成分的复杂性与多样性，为其药理活性提供了坚实基础。

3.2 网络药理学

3.2.1 热淋清颗粒类似性与药物毒性分析 对热淋清颗粒核心成分的类药性、毒理学终点及器官毒性进行评估，结果见图 2。研究发现，热淋清颗粒大部分核心成分具有良好的类药性与较低的生物毒性，表明热淋清颗粒作为潜在新药具有良好的生物利用度，这些结果支持热淋清颗粒作为进一步药物开发的潜在候选药物。

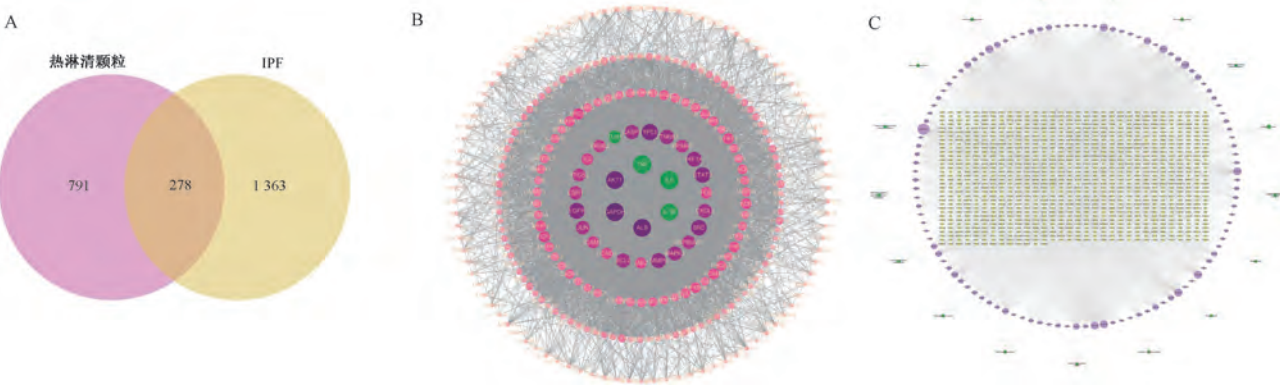
3.2.2 热淋清颗粒活性成分靶点预测 对热淋清颗粒核心成分进行分析，采用 Swiss ADME 筛选出 117 个活性化合物，对应 1 069 个与热淋清颗粒相关的潜在靶点。

3.2.3 IPF 疾病靶点筛选 在 GeneCards 数据库中检索到 5 807 个与 IPF 相关的靶点。筛选评分 ≥ 4.50 的靶点，并整合多项数据库的额外数据，去重合并后得到 1 641 个 IPF 相关疾病靶点。随后将热淋清颗粒的 1 069 个靶点与 1 641 个 IPF 相关靶点进行交集分析，得到 278 个共同靶点，见图 3A。

3.2.4 PPI 网络构建 将 278 个共同靶点在 STRING 11.5 数据库进行 PPI 分析，并使用 Cytoscape 3.7.2 软件构建 PPI 网络。根据度值筛选核心靶点，进一步网络分析确定 IL6、IL1B、TNF、TLR4 为关键靶点，见图 3B。

3.2.5 “药物-靶点-通路”分析 将热淋清颗粒

的活性成分、关键靶点及通路信息整合到 Cytoscape 软件中，构建“药物-靶点-通路”网络，见图 3C。该网络包含 1 196 个节点与 11 245 条相互作用边。采用基于度值（Degree）的筛选标准确定核心靶点，代表性成分见表 2。



注：A 为热淋清颗粒-IPF 靶点的韦恩图，B 为热淋清颗粒-IPF 靶点的 PPI 网络，C 为热淋清颗粒成分-靶点-通路网络。

图 3 热淋清颗粒-IPF 的成分-靶点分析网络图

表 2 热淋清颗粒核心化学成分信息

中介中心度	紧密中心度	相邻中心度	化学成分
0.02	0.37	12.68	3-hydroxyflavone
0.05	0.37	9.96	3, 7, 21-trihydroxy-17, 17-dimethyl-14-(3-methylbut-2-en-1-yl)-10, 12, 16-trioxapentacyclo [11. 8. 0. 03, 11. 04, 9. 015, 20] henicosa-1(13) , 4(9) , 5, 7, 14, 18, 20-heptaen-2-one
0.03	0.37	13.75	sinapic acid methyl ether
0.03	0.37	12.67	feruloyl quinic acid
0.04	0.37	12.33	2-(6-hydroxyhexyl) -3-methylidenebutanedioic acid

3.2.6 富集分析 如图 4A 所示，热淋清颗粒干预 IPF 相关的核心生物学过程主要涉及磷酸化代谢与蛋白质修饰。图 4B 与图 4C 展示了 KEGG 通路富集分析中排名前 20 位的信号通路，这些通路 with 热淋清颗粒干预 IPF 相关。

3.3 分子对接 热淋清颗粒潜在活性成分与关键靶点的分子对接结果见图 5，核心对接组合的可视化结果见图 6。在进行的 100 组化合物-蛋白质对接结果中，91 组对接评分小于-3，表明化合物与靶

点之间具有较强的结合活性。

3.4 热淋清颗粒对 LPS 诱导的 L929 细胞模型炎症因子水平的影响 与对照组比较，模型组小鼠成纤维 L929 细胞上清液 IL-1β、IL-6、PGE₂、TNF-α 水平升高（*P*<0.01）；与模型组比较，热淋清中、高剂量组及地塞米松组小鼠成纤维 L929 细胞上清液 IL-1β、IL-6、PGE₂、TNF-α 水平降低（*P*<0.05，*P*<0.01），热淋清低剂量组小鼠成纤维 L929 细胞上清液 IL-1β、PGE₂ 水平降低（*P*<0.05），见表 3。

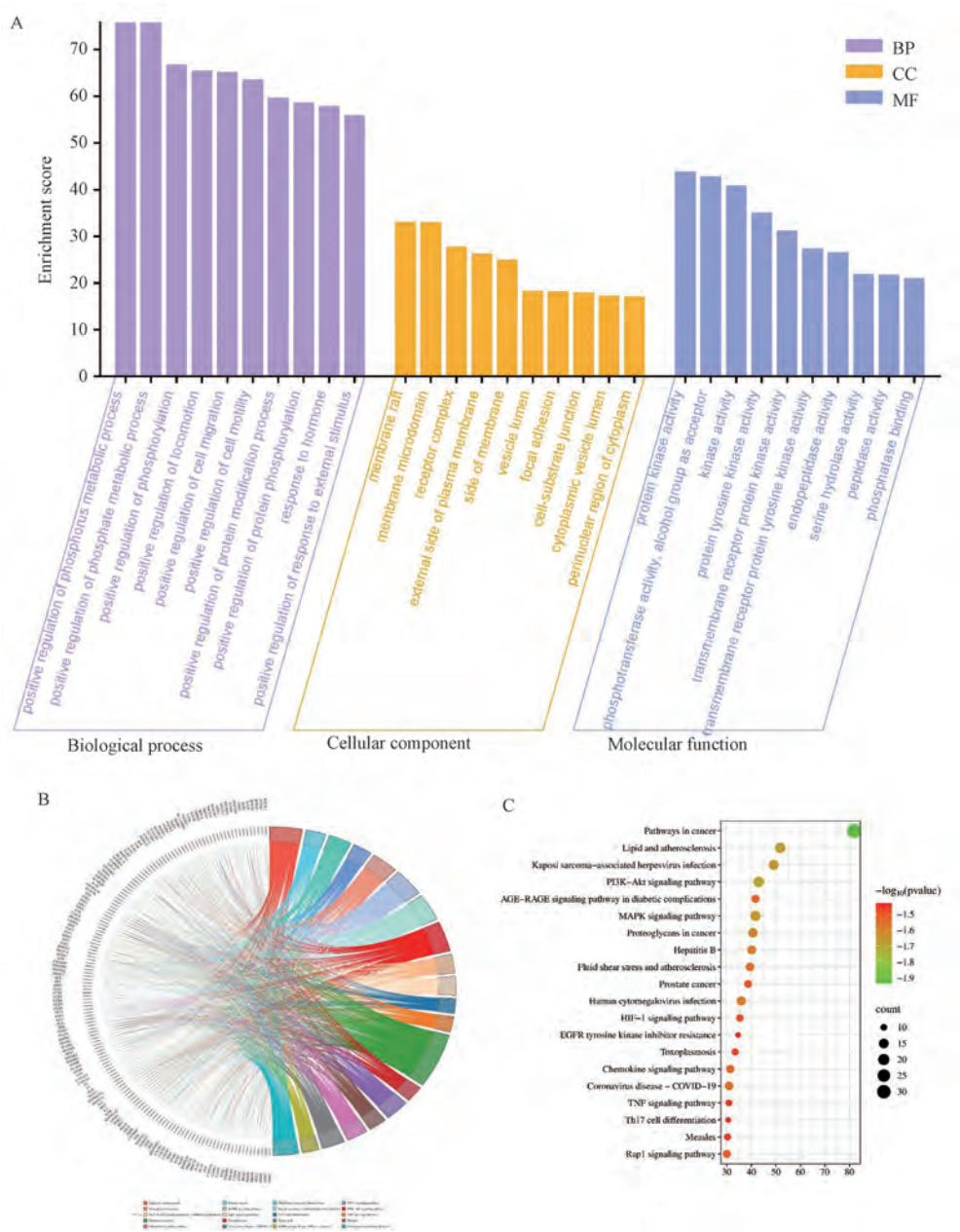
表 3 各组 L929 细胞 IL-1β、IL-6、PGE₂、TNF-α 水平比较（ng/L， $\bar{x}\pm s$ ，*n*=3）

组别	IL-1β	IL-6	PGE ₂	TNF-α
对照组	15.55±1.47	66.15±3.96	29.94±1.87	11.68±1.10
模型组	26.97±0.49**	96.18±1.81**	52.60±5.85**	34.47±1.28**
热淋清低剂量组	23.52±1.51##	93.70±3.53	46.28±3.08#	31.26±1.51
热淋清中剂量组	21.39±1.43##	76.01±4.98##	37.65±2.89##	22.21±0.87##
热淋清高剂量组	20.46±1.33##	73.02±6.33##	37.49±1.34##	18.60±2.09##
地塞米松组	24.36±1.05#	86.00±0.76##	43.51±2.19##	30.28±3.51#

注：与对照组比较，** *P*<0.01；与模型组比较，# *P*<0.05，## *P*<0.01。

3.5 热淋清颗粒对 LPS 诱导的 L929 细胞模型 TLR4、MyD88、NF-κB p65 mRNA 和蛋白表达的影

响 与对照组比较，模型组小鼠成纤维 L929 细胞中 TLR4、MyD88、NF-κB p65 mRNA 和蛋白表达升



注：A 为 GO 分析，B 为 KEGG 分析弦图，C 为 KEGG 分析气泡图。
图 4 热淋清颗粒-IPF 的富集分析图

高 ($P<0.05$, $P<0.01$)；与模型组比较，热淋清各剂量组及地塞米松组 *TLR4*、*MyD88*、*NF-κB p65* mRNA 表达和 *NF-κB p65* 蛋白表达降低 ($P<0.01$)，热淋清各剂量组 *TLR4* 蛋白表达降低 ($P<0.05$, $P<0.01$)，热淋清高剂量组和地塞米松组 *MyD88* 蛋白表达降低 ($P<0.05$, $P<0.01$)，见表 4、图 7。

3.6 热淋清颗粒对 LPS 诱导的 L929 细胞模型 TGF-β1、Smad3、α-SMA mRNA 和蛋白表达的影响 与对照组比较，模型组 L929 细胞中 α-SMA、Smad3、TGF-β1 mRNA 和蛋白表达升高 ($P<$

0.01)；与模型组比较，除热淋清低剂量组 α-SMA 蛋白表达无明显变化外 ($P>0.05$)，热淋清各剂量组及地塞米松组 α-SMA、Smad3、TGF-β1 mRNA 和蛋白表达降低 ($P<0.01$)，见表 5、图 8。

3.7 热淋清颗粒对 IPF 大鼠肺组织病理改变的影响 HE 染色显示，与对照组比较，模型组大鼠肺组织结构损伤明显，肺泡腔内充满增生的毛细血管和成纤维细胞，伴多量吞有色素的巨噬细胞、肺出血点及炎性细胞浸润，纤维化灶增多；与模型组比较，地塞米松组肺组织损伤程度略减，肺泡腔内仍存在毛细血管增生及成纤维细胞，但纤维化灶减

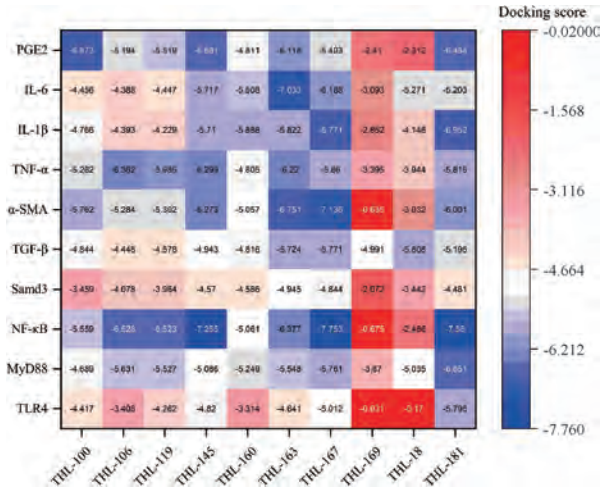


图 5 热淋清颗粒-IPF 分子对接评分热图

少；热淋清低剂量组肺组织结构损伤明显，但纤维化灶及炎性细胞浸润程度较模型组轻，肺泡内充盈物和成纤维细胞数量减少；热淋清中剂量组肺组织结构进一步改善，肺泡腔内仅见少量毛细血管和成纤维细胞，炎性细胞浸润和纤维化灶明显减少；热淋清高剂量组肺组织结构接近正常，仅有少量透明膜及炎性细胞浸润，肺泡内成纤维细胞稀少，整体纤维化程度明显低于地塞米松组，见图 9。如表 6 所示，与对照组比较，模型组肺指数升高（ $P<0.01$ ）；与模型组比较，热淋清中、高剂量组及地塞米松组肺指数降低（ $P<0.05$ ）。

Masson 染色显示，与对照组比较，模型组肺组织纤维化面积增加（ $P<0.01$ ）；与模型组比较，热淋清高剂量组及地塞米松组纤维化面积均减少（ $P<0.01$ ），提示热淋清颗粒可有效减轻肺纤维化，见表 6、图 10。

3.8 热淋清颗粒对 IPF 大鼠血清炎症因子水平的影响 与对照组比较，模型组大鼠血清 IL-1β、IL-6、PGE₂、TNF-α 水平升高（ $P<0.01$ ）；与模型组比较，热淋清各剂量组及地塞米松组大鼠血清 IL-1β、IL-6、PGE₂ 水平降低（ $P<0.05$ ， $P<0.01$ ），热淋清颗粒高剂量组及地塞米松组大鼠血清 TNF-α 水平降低（ $P<0.01$ ），见表 7，表明热淋清颗粒可减轻肺部炎症。

3.9 热淋清颗粒对 IPF 大鼠肺组织 TLR4、MyD88、NF-κB p65 mRNA 和蛋白表达的影响 与对照组比较，模型组肺组织 TLR4、MyD88、NF-κB p65 mRNA 和蛋白表达升高（ $P<0.01$ ）；与模型组比较，除热淋清低剂量组 TLR4 mRNA 表达无明显变化外（ $P>0.05$ ），热淋清各剂量组及地塞米松组

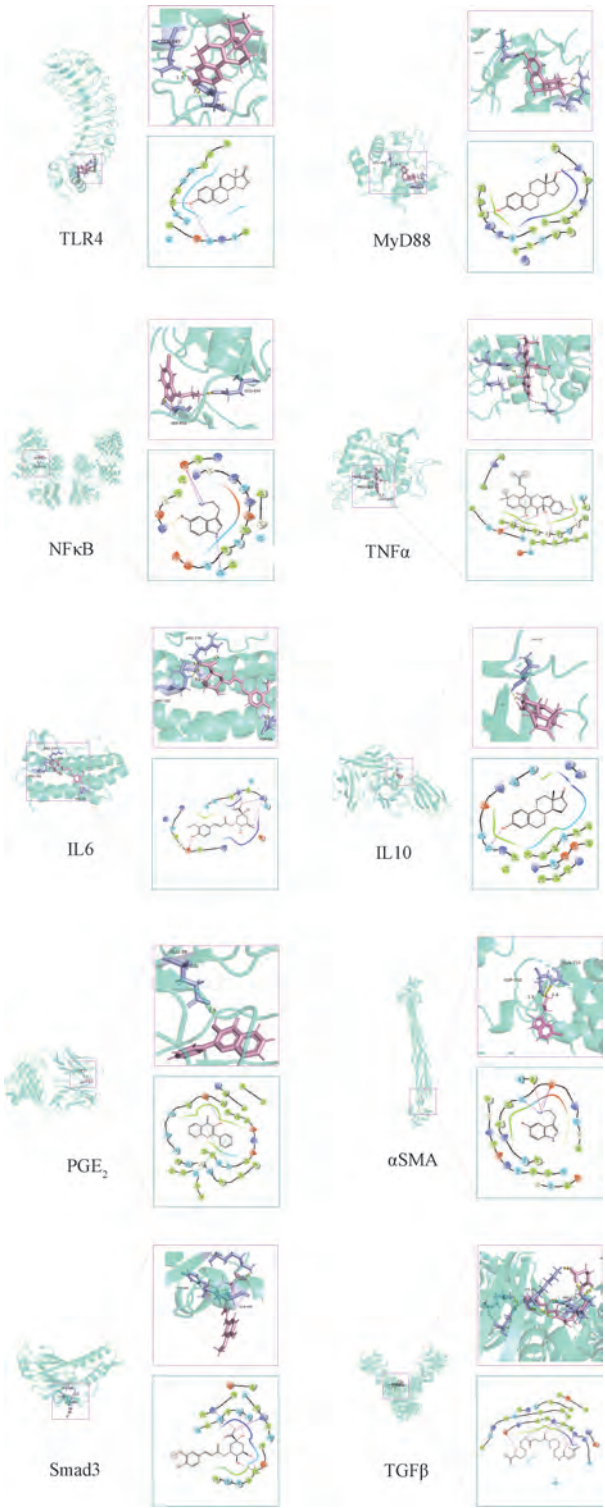


图 6 热淋清颗粒-IPF 分子对接核心对接组合图

TLR4、MyD88、NF-κB p65 mRNA 和蛋白表达降低（ $P<0.01$ ），见表 8、图 11，表明热淋清颗粒可能通过调控 TLR4/NF-κB 信号通路减轻肺组织炎症反应。

3.10 热淋清颗粒对 IPF 大鼠 TGF-β1、α-SMA、Smad mRNA 和蛋白表达的影响 与对照组比较，

表 4 各组 L929 细胞 TLR4、MyD88、NF-κB p65 mRNA 和蛋白表达比较 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

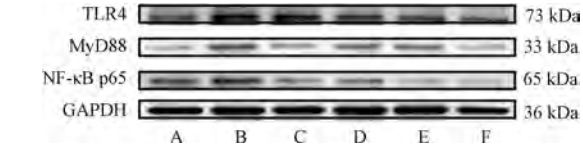
组别	mRNA			蛋白		
	TLR4	MyD88	NF-κB p65	TLR4	MyD88	NF-κB p65
对照组	1.00±0.06	1.00±0.04	1.00±0.08	0.15±0.00	0.05±0.01	0.09±0.02
模型组	2.35±0.23**	2.59±0.06*	2.31±0.09**	0.25±0.02*	0.18±0.04**	0.29±0.06*
热淋清低剂量组	1.28±0.32##	1.88±0.09##	1.72±0.19##	0.16±0.03#	0.14±0.03	0.23±0.05##
热淋清中剂量组	1.11±0.16##	1.31±0.13##	1.31±0.05##	0.15±0.03#	0.12±0.02	0.16±0.03##
热淋清高剂量组	0.91±0.13##	1.05±0.17##	1.16±0.06##	0.11±0.02##	0.06±0.02##	0.13±0.02##
地塞米松组	1.64±0.08##	1.64±0.22##	1.64±0.14##	0.17±0.03	0.10±0.05#	0.22±0.03##

注：与对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$ ；与模型组比较,# $P<0.05$,## $P<0.01$ 。

表 5 热淋清颗粒对 L929 细胞 TGF-β1/α-SMA/Smad 信号通路 mRNA 和蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

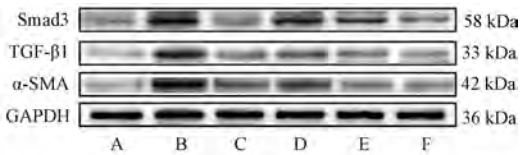
组别	mRNA			蛋白		
	TGF-β1	α-SMA	Smad3	TGF-β1	α-SMA	Smad3
对照组	1.07±0.07	1.02±0.02	0.98±0.02	0.05±0.02	0.08±0.02	0.06±0.02
模型组	3.13±0.23**	2.41±0.19**	2.12±0.12**	0.34±0.03**	0.67±0.04**	0.27±0.06**
热淋清低剂量组	2.71±0.17##	2.06±0.36##	1.67±0.11##	0.16±0.03##	0.31±0.08	0.18±0.03##
热淋清中剂量组	1.47±0.07##	1.55±0.11##	1.65±0.10##	0.10±0.03##	0.16±0.04##	0.15±0.02##
热淋清高剂量组	1.24±0.06##	1.45±0.12##	1.26±0.05##	0.07±0.02##	0.16±0.04##	0.09±0.02##
地塞米松组	2.41±0.10##	1.87±0.23##	1.61±0.21##	0.13±0.03##	0.17±0.03##	0.11±0.03##

注：与对照组比较,** $P<0.01$ ；与模型组比较,## $P<0.01$ 。



注：A 为对照组，B 为模型组，C~E 分别为热淋清低、中、高剂量组，F 为地塞米松组。

图 7 各组 L929 细胞 TLR4、MyD88、NF-κB p65 蛋白条带图



注：A 为对照组，B 为模型组，C~E 分别为热淋清低、中、高剂量组，F 为地塞米松组。

图 8 各组 L929 细胞 TGF-β1、α-SMA、Smad3 蛋白条带图

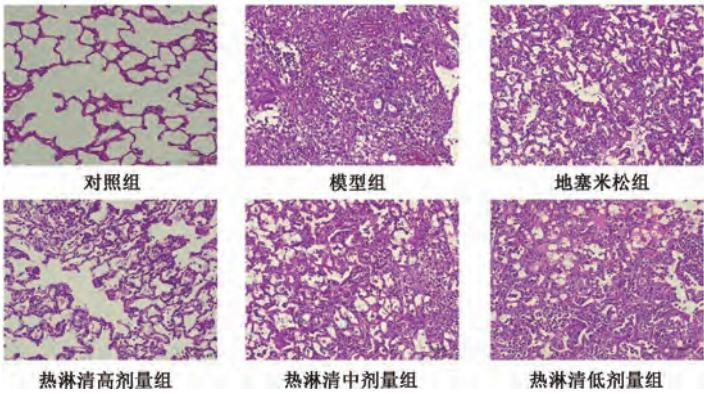


图 9 各组大鼠肺组织 HE 染色 (×200)

表 6 各组大鼠肺指数及纤维化百分比比较 ($\bar{x}\pm s$, $n=5$)

组别	肺指数/%	纤维化比例/%
对照组	0.57±0.01	0.11±0.07
模型组	1.64±0.29**	1.30±0.77**
热淋清低剂量组	1.35±0.20	0.76±0.32
热淋清中剂量组	1.04±0.17#	0.77±0.39
热淋清高剂量组	0.94±0.06#	0.22±0.21##
地塞米松组	0.97±0.08#	0.48±0.29##

注：与对照组比较,** $P<0.01$ ；与模型组比较,# $P<0.05$,## $P<0.01$ 。

模型组肺组织 α-SMA、Smad3、TGF-β1 mRNA 和蛋白表达升高 ($P<0.01$)；与模型组比较，热淋清各剂量组及地塞米松组肺组织 α-SMA、Smad3、TGF-β1 mRNA 和蛋白表达降低 ($P<0.05$, $P<0.01$)，见表 9、图 12，表明热淋清颗粒可通过抑制 TGF-β1/Smad3 通路的激活来减轻肺纤维化。

4 讨论

IPF 是一种慢性、进行性间质性肺病，其特征

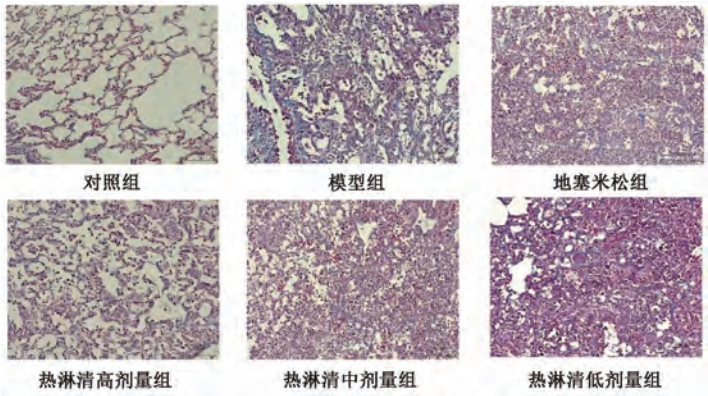


图 10 各组大鼠肺组织 Masson 染色 (×200)

表 7 各组大鼠血清 IL-1β、IL-6、PGE2、TNF-α 水平比较 (ng/L, $\bar{x}\pm s$, $n=5$)

组别	IL-1β	IL-6	PGE ₂	TNF-α
对照组	51.96±5.42	57.22±2.98	228.25±16.20	74.67±4.07
模型组	84.47±7.52**	84.53±5.11**	326.12±12.04**	117.44±8.93**
热淋清低剂量组	71.02±8.76 [#]	77.20±4.15 [#]	297.74±10.59 ^{##}	115.12±6.65
热淋清中剂量组	67.80±8.44 ^{##}	76.63±5.84 [#]	288.10±8.68 ^{##}	111.74±2.56
热淋清高剂量组	64.75±5.80 ^{##}	62.44±3.81 ^{##}	285.05±9.74 ^{##}	87.55±4.96 ^{##}
地塞米松组	61.99±8.97 ^{##}	66.88±6.14 ^{##}	276.50±7.61 ^{##}	81.19±8.52 ^{##}

注：与对照组比较，** $P<0.01$ ；与模型组比较，[#] $P<0.05$ ，^{##} $P<0.01$ 。

表 8 各组大鼠肺组织 TLR4、MyD88、NF-κB p65 mRNA 和蛋白表达比较 ($\bar{x}\pm s$, $n=5$)

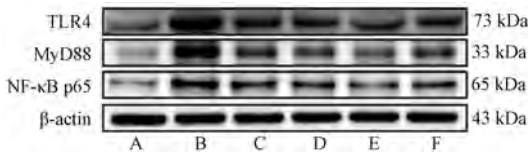
组别	mRNA			蛋白		
	TLR4	MyD88	NF-κB p65	TLR4	MyD88	NF-κB p65
对照组	1.00±0.12	1.00±0.13	1.00±0.10	0.08±0.01	0.07±0.02	0.07±0.02
模型组	3.91±0.59**	3.70±0.51**	4.91±0.75**	0.86±0.03**	0.75±0.01**	0.66±0.02**
热淋清低剂量组	3.38±0.28	2.92±0.49 ^{##}	3.32±0.66 ^{##}	0.47±0.03 ^{##}	0.35±0.05 ^{##}	0.30±0.01 ^{##}
热淋清中剂量组	2.78±0.53 ^{##}	2.72±0.33 ^{##}	3.32±0.50 ^{##}	0.45±0.04 ^{##}	0.29±0.02 ^{##}	0.29±0.02 ^{##}
热淋清高剂量组	1.98±0.47 ^{##}	2.17±0.33 ^{##}	2.82±0.55 ^{##}	0.23±0.01 ^{##}	0.16±0.02 ^{##}	0.16±0.01 ^{##}
地塞米松组	2.68±0.67 ^{##}	2.65±0.53 ^{##}	3.04±0.44 ^{##}	0.44±0.05 ^{##}	0.28±0.02 ^{##}	0.27±0.03 ^{##}

注：与对照组比较，** $P<0.01$ ；与模型组比较，^{##} $P<0.01$ 。

表 9 各组大鼠肺组织 α-SMA、Smad3、TGF-β1 mRNA 和蛋白表达比较 ($\bar{x}\pm s$, $n=5$)

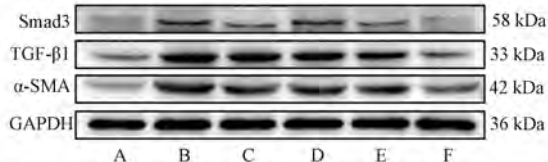
组别	mRNA			蛋白		
	TGF-β1	α-SMA	Smad3	TGF-β1	α-SMA	Smad3
对照组	0.98±0.13	1.14±0.17	1.05±0.11	0.09±0.05	0.06±0.03	0.05±0.01
模型组	2.12±0.13**	2.51±0.37**	2.55±0.26**	0.76±0.07**	0.45±0.17**	0.14±0.03**
热淋清低剂量组	1.69±0.16 ^{##}	2.07±0.40 ^{##}	2.20±0.22 ^{##}	0.66±0.08 [#]	0.30±0.12 ^{##}	0.09±0.01 ^{##}
热淋清中剂量组	1.82±0.39 ^{##}	2.21±0.25 ^{##}	2.23±0.13 ^{##}	0.66±0.10 [#]	0.34±0.11 ^{##}	0.13±0.03 ^{##}
热淋清高剂量组	1.41±0.18 ^{##}	1.93±0.31 ^{##}	2.20±0.19 ^{##}	0.47±0.03 ^{##}	0.23±0.11 ^{##}	0.10±0.02 ^{##}
地塞米松组	1.29±0.44 ^{##}	1.72±0.17 ^{##}	1.62±0.12 ^{##}	0.12±0.05 ^{##}	0.09±0.05 ^{##}	0.06±0.01 ^{##}

注：与对照组比较，** $P<0.01$ ；与模型组比较，[#] $P<0.05$ ，^{##} $P<0.01$ 。



注：A 为对照组，B 为模型组，C~E 分别为热淋清低、中、高剂量组，F 为地塞米松组。

图 11 各组大鼠肺组织 TLR4、MyD88、NF-κB p65 蛋白条带图



注：A 为对照组，B 为模型组，C~E 分别为热淋清低、中、高剂量组，F 为地塞米松组。

图 12 各组大鼠肺组织 TGF-β1、α-SMA、Smad3 蛋白条带图

为细胞外基质（ECM）蓄积及成纤维细胞向肌成纤维细胞转化，最终导致肺功能受损与呼吸衰竭^[5-6]。根据中医理论，热淋清颗粒具有清热解毒功效，其治疗效果在肺炎及其他感染性疾病的治疗中已得到认可，且该作用依赖于 NF- κ B 通路。然而，由于热淋清颗粒化学成分尚未完全明确，其在肺纤维化中的作用及潜在机制仍需进一步研究。

本研究通过网络药理学分析发现，3-羟基黄酮（3-HF）可能是热淋清颗粒的主要活性成分。研究表明，3-HF 可抑制基质金属蛋白酶-2 与尿激酶型纤溶酶原激活剂的表达，从而减少 ECM 的异常降解与沉积，进而影响上皮间质转化（EMT）过程^[7]。此外，3-HF 通过抑制 FAK-Src 信号轴及其下游 MEK/ERK 与 RhoA/MLC2 通路，减轻成纤维细胞活化与胶原沉积。在急性肺损伤模型中，3-HF 类似物（如白藜芦醇衍生的黄酮醇）可通过抑制 NF- κ B 通路并促进自噬，减轻氧化应激及炎症细胞因子（TNF- α 、IL-6）的释放^[8]。然而，热淋清颗粒的整体药理效应可能并非由单一成分主导，而是其多成分协同调控炎症及纤维化信号轴，实现整体抗纤维化作用。

PPI 网络分析进一步显示，IL6、TNF、GAPDH、ALB、AKT1、IL1B 靶点度值较高，其中 TNF、IL6、IL1B 分别对应的编码蛋白是 TNF- α 、IL-6、IL-1 β ，三者均为肺纤维化的关键促炎细胞因子，可通过调控免疫炎症反应、氧化应激及成纤维化信号通路，共同促进肺组织结构损伤及胶原沉积。研究表明，在肺纤维化模型中，TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 表达显著升高，提示慢性炎症在纤维化进程中的驱动作用^[9-10]，可通过促进成纤维细胞增殖和胶原合成，放大局部炎症反应并促进 EMT^[11-12]。分子对接分析显示，91% 对接组合评分低于 -3，表明化合物与靶点间具有较高的亲和力，提示热淋清颗粒通过 TLR4/TGF- β 1/Smad 干预肺纤维化的可行性。为验证这些预测，本研究开展了体内外实验，验证热淋清颗粒对肺纤维化的治疗效果。

EMT 作为肺纤维化发生发展的关键过程，可使上皮细胞转化为包括成纤维细胞在内的间质细胞^[13]，后者在 ECM 的沉积与重塑中扮演重要角色，在这个过程中，炎症因子可通过促进成纤维细胞向损伤组织迁移以加速纤维化进程^[14-15]。本研究通过建立 LPS 诱导的 L929 细胞炎症模型发现，LPS 加速了成纤维细胞增殖、炎症反应及 ECM 沉积。TGF- β 1 作为一种关键细胞因子，可刺激成纤

维细胞快速增殖，其过度分泌促进成纤维细胞迁移至 ECM，加速纤维化进程^[16-17]。而热淋清颗粒可依赖 TLR4/Smad/TGF- β 通路，抑制 LPS 诱导的 L929 成纤维细胞与上皮细胞增殖，并降低 IL-1 β 、IL-6 及 TNF- α 等炎症介质的表达，抑制 TGF- β 1 活性从而减少成纤维细胞向肌成纤维细胞分化，抑制 ECM 蛋白与胶原沉积，最终发挥防治肺纤维化的作用。

本研究为进一步探究热淋清颗粒治疗肺纤维化的作用及机制，采用 BLM 构建大鼠肺纤维化模型^[18-19]。结果显示，热淋清颗粒可降低炎症细胞因子 IL-1 β 、PGE₂、IL-6 及 TNF- α 水平，这些因子在肺纤维化患者的肺组织中也呈高表达^[20]。这可能归因于热淋清颗粒降低了 NF- κ B 通路上游蛋白（包括 TLR4 与 MyD88）的表达，从而抑制 p65 核转位并阻断 NF- κ B 信号激活。高度活化的 NF- κ B 可与 TGF- β 1 启动子结合，促进该关键促纤维化细胞因子的基因激活，加速肺纤维化过程中的 EMT，进而推动纤维化进展^[21]。本研究发现，通过 BLM 造模提高了 TGF- β 1、Smad3 及 α -SMA 等与纤维化相关的关键标志物表达^[22-23]；而经热淋清颗粒给药可逆转这些变化，表明热淋清颗粒可能通过抑制 TLR4/TGF- β 1/Smad 信号通路，抑制大鼠肺组织中 EMT 过程，是治疗肺纤维化的潜在有效策略。

综上所述，热淋清颗粒在体外可有效抑制 LPS 诱导的成纤维细胞活化，在体内可显著减轻 BLM 诱导的大鼠 IPF 进程，其作用机制主要是通过抑制 TLR4/TGF- β 1/Smad 信号通路，发挥抗炎与抗纤维化双重作用。本研究既揭示了热淋清颗粒治疗 IPF 的作用机制，也提示 TLR4/TGF- β 1/Smad 通路可能是干预 IPF 的关键靶点，为热淋清颗粒在 IPF 及相关疾病治疗中的潜在临床应用，以及靶向治疗策略的开发提供了实验基础。

参考文献：

[1] Wongkarnjana A, Yanagihara T, Kolb M R. Treatment of idiopathic pulmonary fibrosis with Nintedanib: an update[J]. *Expert Rev Respir Med*, 2019, 13(12): 1139-1146.

[2] Gulati S, Luckhardt T R. Updated evaluation of the safety, efficacy and tolerability of pirfenidone in the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis[J]. *Drug Healthc Patient Saf*, 2020, 12: 85-94.

[3] 吴亚娜, 宋忠阳, 王功臣, 等. 益肺健脾方调控 TGF- β 1/Smad 信号通路对肺纤维化小鼠炎症及上皮-间质转化的影响[J]. *中成药*, 2026, 48(3): 977-983.

[4] 潘 梅, 卢礼平, 李来来, 等. 热淋清颗粒对脓毒症急性肺损伤大鼠肺组织 TLR4、MyD88、NF- κ B p65 mRNA 及蛋白表达的影响[J]. 时珍国医国药, 2023, 34 (3): 584-587.

[5] Raghu G, Collard H R, Egan J J, *et al.* An official ATS/ERS/JRS/ALAT statement: idiopathic pulmonary fibrosis: evidence-based guidelines for diagnosis and management[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2011, 183(6): 788-824.

[6] 韩兴稷, 焦太强, 高晨曦, 等. 基于 TGF- β /Smad 信号通路探讨麻杏苦甘汤对急性肺损伤大鼠肺纤维化的影响[J]. 中成药, 2025, 47(12): 3943-3950.

[7] Lu K H, Chen P N, Hsieh Y H, *et al.* 3-Hydroxyflavone inhibits human osteosarcoma U2OS and 143B cells metastasis by affecting EMT and repressing u-PA/MMP-2 *via* FAK-Src to MEK/ERK and RhoA/MLC2 pathways and reduces 143B tumor growth *in vivo*[J]. *Food Chem Toxicol*, 2016, 97: 177-186.

[8] Chen L Z, Yao L, Jiao M M, *et al.* Novel resveratrol-based flavonol derivatives: synthesis and anti-inflammatory activity *in vitro* and *in vivo*[J]. *Eur J Med Chem*, 2019, 175: 114-128.

[9] Li Y, Zhang J, Wang H, *et al.* A novel pulmonary fibrosis NOD/SCID murine model with natural aging[J]. *BMC Pulm Med*, 2024, 24(1): 457.

[10] Shen Y H, Cheng M H, Liu X Y, *et al.* Sodium houttuyfonate inhibits bleomycin induced pulmonary fibrosis in mice[J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 596492.

[11] Zhang X, Liu M, Chen H, *et al.* Ferroptosis inducer IKE ameliorate pulmonary fibrosis in collagen-induced arthritis (CIA) mice *via* decreasing the expression of IL-6, CCL5 and CXCL9[J]. *Chin J Cell Mol Immunol*, 2024, 40(2): 115-123.

[12] Wu Q, Liu H, Liao J, *et al.* Colchicine prevents atrial fibrillation promotion by inhibiting IL-1 β -induced IL-6 release and atrial fibrosis in the rat sterile pericarditis model[J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 129: 110384.

[13] 赵红玉, 邓 艳, 朱丽萍, 等. 香芹酚通过调控 TGF- β 1/Smad 信号通路和炎症反应减轻百草枯诱导的小鼠肺纤维化[J]. 中国免疫学杂志, 2025, 41(7): 1714-1719.

[14] Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014, 15(3): 178-196.

[15] Wang Q J, Zhang A L, Kang Z Q, *et al.* Exogenous IL-19 mediates downregulation of TGF- β through Erk and p38 pathway to inhibit epidural fibrosis[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(17): 7184-7190.

[16] Shen B, Deng L, Liu Y, *et al.* Effects of novel Fufang Biejia Ruangan Tablets with sheep placenta as substitute for *Hominis Placenta* on CCl₄-induced liver fibrosis[J]. *Chin Herb Med*, 2022, 14(1): 104-110.

[17] Pardali E, Sanchez-Duffhues G, Gomez-Puerto M C, *et al.* TGF- β -induced endothelial-mesenchymal transition in fibrotic diseases[J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(10): 2157.

[18] Savin I A, Zenkova M A, Sen'kova A V. Pulmonary fibrosis as a result of acute lung inflammation: molecular mechanisms, relevant *in vivo* models, prognostic and therapeutic approaches[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(23): 14959.

[19] Wang K, Zhang T, Lei Y, *et al.* Identification of ANXA2 (annexin A2) as a specific bleomycin target to induce pulmonary fibrosis by impeding TFEB-mediated autophagic flux[J]. *Autophagy*, 2018, 14(2): 269-282.

[20] Papiris S A, Tomos I P, Karakatsani A, *et al.* High levels of IL-6 and IL-8 characterize early-on idiopathic pulmonary fibrosis acute exacerbations[J]. *Cytokine*, 2018, 102: 168-172.

[21] Yu Q, Cheng P, Wu J, *et al.* PPAR γ /NF- κ B and TGF- β 1/Smad pathway are involved in the anti-fibrotic effects of levotetrahypalmatine on liver fibrosis[J]. *J Cell Mol Med*, 2021, 25(3): 1645-1660.

[22] Vermeulen S, Roumans N, Honig F, *et al.* Mechanotransduction is a context-dependent activator of TGF- β signaling in mesenchymal stem cells[J]. *Biomaterials*, 2020, 259: 120331.

[23] Yao Y, Yuan Y, Lu Z, *et al.* Effects of *Nervilia fordii* extract on pulmonary fibrosis through TGF- β /Smad signaling pathway[J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 659627.