

补阳还五汤对肺纤维化小鼠中介导细胞自噬的 mTOR 蛋白的调控机制探讨

潘怡, 王振兴, 郭静, 张川峰, 王丽娟, 杨晗*, 王飞*
(成都中医药大学 临床医学院, 成都 610075)

[摘要] **目的:**观察肺纤维化中介导自噬的哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)的表达、自噬在肺纤维化形成中的作用,探索补阳还五汤对肺纤维化的治疗机制。**方法:**144只C57BL/6小鼠随机分为6组,分别为假手术组、模型组、强的松组,补阳还五汤高、中、低剂量组,每组24只,假手术组小鼠给予气管注入等量的0.9%生理盐水,其余各组采用博来霉素(bleomycin, BLM)气管注入法复制肺纤维化模型,造模后假手术组、模型组给予0.9%生理盐水($0.01\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$),补阳还五汤高剂量组给予补阳还五汤($28.08\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$),补阳还五汤中剂量组给予补阳还五汤($14.04\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$),补阳还五汤低剂量组给予补阳还五汤($7.02\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$),强的松组给予强的松($0.455\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)灌胃,于造模后第7,14,28天分批提取样本。采用苏木素-伊红(HE)及马松(Masson)染色观察小鼠肺炎和纤维化程度;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测小鼠肺组织 mTOR,核糖体 S6,微管相关蛋白 1 轻链 3 II (microtubule-associate protein 1 light chain 3, MAP1LC3-II) 的表达;电镜检测观察小鼠肺组织自噬情况。**结果:**与假手术组比较,模型组小鼠在 7,14,28 d 肺炎及肺纤维化显著($P < 0.01$);与模型组比较,给药组各时间点肺炎和肺纤维化程度均有不同程度的改善($P < 0.05$),补阳还五汤高剂量组下降最明显($P < 0.05$)。与假手术组比较,模型组小鼠肺组织 mTOR, S6 蛋白表达水平显著上调($P < 0.01$),与模型组比较,各给药组 mTOR, S6 蛋白表达下调($P < 0.01$);与假手术组比较,模型组小鼠肺组织 LC3-II 表达水平下调($P < 0.01$),与模型组比较,各给药组 LC3-II 上调($P < 0.01$)。假手术组细胞形态良好,未见自噬。模型组细胞形态最差,存在个别自噬。各给药组细胞形态及自噬数量好于模型组,其中补阳还五汤高、中剂量组自噬数量最多。**结论:**在 BLM 所致小鼠肺纤维化形成的过程中,小鼠肺组织中 mTOR 蛋白被激活,自噬抑制,mTOR 蛋白通过抑制自噬参与了肺纤维化的发病;补阳还五汤对 BLM 所致小鼠肺纤维化有一定的治疗作用,其机制可能与其下调介导细胞自噬的 mTOR 蛋白表达有关。

[关键词] 补阳还五汤;肺纤维化;哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR);自噬;电镜

[中图分类号] R2-0;R22;R285.5;R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)06-0023-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20190602

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20181204.1054.011.html>

[网络出版时间] 2018-12-05 08:58

Regulatory Mechanism of Buyang Huanwu Tang on mTOR Protein that Mediates Autophagy in Mice with Pulmonary Fibrosis

PAN Yi, WANG Zhen-xing, GUO Jing, ZHANG Chuan-feng, WANG Li-juan, YANG Han*, WANG Fei*
(School of Clinical Medicine, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the expression of mammalian target of rapamycin (mTOR) that mediates autophagy in pulmonary fibrosis and the effect of autophagy in the formation of pulmonary fibrosis, in order to explore the treatment mechanism of Buyang Huanwu Tang on pulmonary fibrosis. **Method:** Totally 144 C57BL/6 mice were randomly divided into 6 groups: sham operation group, model group, prednisone group, high-dose

[收稿日期] 20180827(003)

[基金项目] 国家自然科学基金青年基金项目(81503557)

[第一作者] 潘怡,在读博士,从事中医药防治呼吸系统疾病与老年疾病的实验研究,E-mail:904300087@qq.com

[通信作者] *杨晗,博士,副教授,从事中医药防治呼吸系统疾病与老年疾病的实验研究,E-mail:15882458490@163.com;

*王飞,教授,博士生导师,从事中医药防治呼吸系统疾病与老年疾病的实验研究,E-mail:wangfei896@163.com

Buyang Huanwu Tang group, medium-dose Buyang Huanwu Tang group and low-dose Buyang Huanwu Tang group, with 24 mice in each group. The sham operation group was injected with the same amount of 0.9% saline. The remaining groups were treated with bleomycin tracheal injection to replicate the pulmonary fibrosis model. After modeling, sham operation group and model group were given 0.9% normal saline ($0.01 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), group high-dose Buyang Huanwu Tang group was given Buyang Huanwu Tang ($28.08 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), medium-dose Buyang Huanwu Tang group was given Buyang Huanwu Tang ($14.04 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), low-dose Buyang Huanwu Tang group was given Buyang Huanwu Tang ($7.02 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), and P group was given prednisone ($0.455 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) by gavage. The samples were taken in batches on the 7th, 14th and 28th days after modeling; degrees of alveolitis and fibrosis in mice were observed by hematoxylin-eosin (HE) staining and Masson staining. The mTOR protein, ribosomal S6 protein and microtubule associate protein 1 light chain3-II (MAP1LC3-II) of mouse lung tissue were detected by Western blot; electron microscopy was used to observe the autophagy of lung tissue in mice.

Result: Compared with the sham-operated group, the degrees of alveolitis and pulmonary fibrosis were significantly severer in the model group on 7th, 14th and 28th days ($P < 0.01$); compared with the model group, the degrees of alveolitis and pulmonary fibrosis were alleviated at each observation time in the drug-administered groups ($P < 0.05$). The decreased scores in high-dose Buyang Huanwu Tang group were the most obvious, with statistically significant differences ($P < 0.05$). compared with the sham-operated group, the expressions of mTOR and S6 protein in lung tissue of the model group were significantly up-regulated, and each drug-administered group showed down-regulations. Compared with the sham-operated group, the expression of LC3-II protein in lung tissue of the model group was significantly down-regulated, and each drug-administered group showed an up-regulation ($P < 0.01$). The cells in the sham-operated group were well-formed, and no autophagy was observed. The model group had the worst cell morphology, with individual autophagy. The cell morphology and autophagy in each drug-administered group were better than those in the model group. The high-dose Buyang Huanwu Tang group and the medium-dose Buyang Huanwu Tang group had the highest number of autophagosome. **Conclusion:** The mTOR protein is activated in mice lung tissue, autophagy is inhibited, mTOR protein participates in the pathogenesis of pulmonary fibrosis by inhibiting autophagy; Buyang Huanwu Tang has a certain therapeutic effect on BLM-induced pulmonary fibrosis in mice, and its mechanism may be related to the down-regulation of mTOR protein expression that mediates autophagy.

[Key words] Buyang Huanwu Tang; pulmonary fibrosis; mammalian target rapamycin (mTOR); autophagy; electron microscopy

特发性肺纤维化 (idiopathic pulmonary fibrosis, IPF) 是指病因未明的弥漫性肺间质疾病,以慢性进行性的肺间质损害和纤维化为主要特征,也可累及肺泡上皮细胞及肺血管,临床表现以慢性咳嗽,渐进性呼吸困难为主^[1]。病理表现为肺间质细胞的增生和胶原蛋白为主的细胞外基质过度沉积,目前缺乏理想的治疗方法,预后差,诊断后中位生存期 3 ~ 5 年^[2],寻求合理的治疗方法是目前急需解决的重大问题。哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 是一种非典型丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,为磷脂酰肌醇激酶相关激酶 (phosphatidylinositol kinase-related kinase, PIKK) 蛋白质家族成员。作为细胞生理病理过程的关键调控分子,可受细胞内外各种因素 (激素、生长因子、营

养物质、能量转化、缺氧应激) 的影响,介导的信号通路在生命过程中起着重要作用^[3-4]。mTOR 有 2 种不同复合物 mTORC1 和 mTORC2, mTORC1 直接磷酸化 mRNA 翻译的两种下游效应蛋白核糖体 S6 蛋白激酶 (ribosome protein subunit 6 kinase 1, S6K1) 和真核翻译起始因子 4E 结合蛋白 1 (eIF4E-binding protein 1, 4E-BP1), 从而调控 mRNA 的翻译,蛋白的合成^[5]。S6K1 是核糖体 S6 蛋白的激酶, S6 蛋白的活化是 mRNA 翻译的关键步骤,反应了 mTOR 蛋白的激活。mTOR 是细胞内营养水平和能量水平的感受器,是自噬启动阶段的关键调节因子,在自噬体的形成及成熟中发挥关键作用,抑制自噬的发生,是自噬的负调控分子。其中 mTORC1 是自噬过程的主要调节因子^[6]。在营养物质缺乏的情况下,

mTOR 通过诱导 mTORC1 的失活启动细胞内的级联反应,使自噬相关蛋白 1 (autophagy-related protein 1, Atg1) 激酶复合体激活, Atg1 激酶复合体处于 mTORC1 的下游,由 Atg1, Atg13, Atg17, Atg29, Atg31 构成^[7],其能招募其他 Atg 蛋白至前自噬体结构 (preautophagosome malstructure, PAS),并通过磷酸化激活下游位点而启动细胞自噬,因此 mTOR 主要作用于细胞自噬的起始阶段^[8],现有研究表明,肺成纤维细胞及肺泡上皮细胞内 mTOR 信号通路活化^[9-10]及自噬不足^[10-12]在肺纤维化形成的过程中发挥着重要作用。激活 mTOR 信号通路可下调自噬,增加细胞外基质沉积,加速肺纤维化进程^[13],mTOR 可改变自噬活性,导致肺成纤维细胞增殖并抵抗肺成纤维细胞的凋亡^[14]。

本课题组在前期对补阳还五汤干预肺纤维化的研究中发现,补阳还五汤通过阻断高迁移率族蛋白 B1 (high mobility group B1, HMGB1)/RAGE 信号通路,抑制实验性肺纤维化大鼠血清转化生长因子- β_1 (transforming growth factor- β_1 , TGF- β_1) 过度表达,减少肺泡巨噬细胞肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 含量,显著下调 TGF- β_1 , Smad3 mRNA 的含量^[15-20],提示补阳还五汤的多靶点分子药理作用对 IPF 病理过程中肺内复杂的病理机制有较好的调控作用,在肺纤维化的治疗中具有潜在应用价值。那么,补阳还五汤治疗肺纤维化的多靶点调节作用是否与其调控 mTOR 信号通路,进而促进了胞内的自噬机制有关,本研究将围绕肺纤维化的经典胞内能量代谢过程——“自噬”,以 mTOR 信号通路为切入点,从动物实验深入研究补阳还五汤在肺纤维化治疗中的可能机制,也为抗肺纤维化药物的研究提供更科学的途径。

1 材料

1.1 动物 SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠 144 只,8 周龄,体质量 18~22 g,购于成都达硕实验动物有限公司,合格证号 SCXK(川)2015-030,成都中医药大学动物实验伦理审查备案编号 2016-08。饲养于成都中医药大学中医脏腑病证动物饲养室。

1.2 药物及试剂 补阳还五汤药物配比:生黄芪 60 g(批号 17100047),当归尾 9 g(批号 17100105),赤芍 6 g(批号 17080143),川芎 6 g(批号 17050011),桃仁 9 g(批号 17060005),红花 9 g(批号 17060133),地龙 9 g(批号 17010031),生药共 108 g,中药饮片由四川新绿色药业科技发展有限公司提供,经成都中医药大学药学院陈敏教授鉴定后,

于成都中医药大学附属医院药剂科制成智能免煎颗粒,常温保存备用,其中每 100 g 黄芪、川芎免煎剂相当于生药 700 g,得率为 14.29%,每 100 g 红花、赤芍免煎剂相当于生药 1 100 g,得率为 9.09%,每 100 g 当归免煎剂相当于生药 600 g,得率为 16.67%,每 100 g 地龙免煎剂相当于生药 1 000 g,得率为 10%,每 100 g 桃仁免煎剂相当于生药 2 100 g,得率为 4.76%。戊巴比妥钠盐(成都化夏化学试剂有限公司,批号 H1140075);阿米卡星洗剂(海南皇隆制药股份有限公司,批号 20170916);4% 多聚甲醛组织固定液(白鲨生物科技有限公司,批号 1705642);2.5% 戊二醛固定液,苏木素染液,伊红染液,马松(Masson)染液(武汉谷歌生物科技有限公司,批号分别为 G1102, G1005, G1005, G1006);无水乙醇,二甲苯,盐酸,氨水,中性树胶,盐酸,冰乙酸(国药集团化学试剂有限公司,批号分别为 100092683, 10023418, 10011008, 10002118, 10004160, 10011008, 10000218);PVDF 膜 0.45 μm , PVDF 膜 0.22 μm (美国 Millipore 公司,批号分别为 IPVH00010, ISEQ00010);脱脂奶粉, ECL, TBS 缓冲液(武汉谷歌生物科技有限公司,批号分别为 G5002, G2014, G0001);硫酸博来霉素(上海陶素生化科技有限公司,批号 T6116);0.9% 氯化钠注射液(四川科伦药业股份有限公司,批号 T17092208-1);强的松(醋酸泼尼松片,浙江仙琚制药股份有限公司,批号 170623);mTOR, RPS6, LC3-II 抗体(美国 Abcam 公司,批号分别为 ab2732, ab40820, ab48394);辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗兔(武汉谷歌生物科技有限公司,批号 GB23303)。

1.3 仪器 JJ-12J 型脱水机, JB-P5 型包埋机, JB-L5 型冻台(武汉俊杰电子有限公司);RM2016 型病理切片仪(上海徠卡仪器有限公司);NIKON ECLIPSE E100 型正置光学显微镜, NIKON DS-U3 型成像系统(日本尼康公司);HT7700 型透射电子显微镜(日本日立公司);Rt2100c 型酶标检测仪(美国 Rayto 公司);DYY-6C 型电泳仪, DYCZ-40D 型转印电泳仪(北京六一仪器厂);neofuge 13R 型冷冻离心机(力康生物医疗科技控股有限公司);Adobe Photo Shop 图像分析软件(美国 Adobe 公司)。

2 方法

2.1 动物分组及模型制备 参照文献[21]造模方法,144 只 C57BL/6 小鼠在实验条件下适应性饲养 1 周,随机分为 6 组,分别为假手术组,模型组,强的松组,补阳还五汤高、中、低剂量组,每组 24 只。造

模之前禁食 12 h, 饮水如常。除假手术组外, 余各组以 2% 戊巴比妥钠 ($0.056 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 腹腔注射, 麻醉后将小鼠仰卧固定头和四肢于实验台, 常规消毒, 沿颈部正中中线作一切口, 钝性分离各层组织, 暴露气管, 经气管软骨环间隙向气管内缓慢注入博来霉素生理盐水溶液 ($2.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), 注射后迅速将小鼠直立并旋转, 使药液在肺内均匀分布, 假手术组同法向气管内注入等量生理盐水。造模当天及术后 3 d 内, 所有小鼠颈部缝合处喷涂阿米卡星洗剂。

2.2 给药 模型完成后第 2 天开始灌胃给药, 连续给药 28 d。补阳还五汤生药共 108 g, 按人与小鼠体表面积折算等效剂量, 中剂量为 $14.04 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, 高剂量增加一倍为 $28.08 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, 低剂量降低一倍为 $7.02 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, 假手术组、模型组给予 0.9% NS ($0.01 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), Demedts 等^[22] 推荐强的松的起始用量为 $0.05 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, 按人与小鼠体表面积折算等效剂量, 强的松组给予强的松 $0.455 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, 补阳还五汤高、中、低剂量组分别予补阳还五汤 $28.08, 14.04, 7.02 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 。

2.3 标本采集 于造模后第 7, 14, 28 天, 每组随机选取 6 只小鼠, 左胸腔取血法处死。暴露胸腔, 分离肺组织, 剥离双肺, 于右上肺取 1 mm^3 左右肺组织, 固定于 2.5% 戊二醛固定液中, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存供电镜检测 (只取第 28 天, 每组 1 只)。右肺上中肺叶放入 4% 的多聚甲醛中固定, 石蜡包埋, 供病理切片、免疫组化检测; 右肺中下叶 $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱冻存, 供蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测。

2.4 肺组织形态学观察 病理切片行苏木素-伊红 (HE) 染色及 Masson 染色, 光镜下观察病理组织学变化并摄片, 参照 Szapiel 等^[23] 方法评价肺泡炎及肺纤维化的程度。HE 染色: 石蜡切片脱蜡至水, 依次将切片放入二甲苯 I 20 min, 二甲苯 II 20 min, 无水乙醇 I 5 min, 无水乙醇 II 5 min, 75% 乙醇 5 min, 自来水洗; 苏木素染色 3~5 min, 盐酸水溶液分化, 氨水水溶液返蓝, 水洗; 切片依次入 85%, 95% 的梯度乙醇脱水, 入伊红染液中染色 5 min; 切片依次放入无水乙醇 I 5 min, 无水乙醇 II 5 min, 无水乙醇 III 5 min, 二甲 I 5 min, 二甲苯 II 5 min 透明, 中性树胶封片。显微镜镜检, 图像采集分析。Masson 染色: 石蜡切片脱蜡至水, 依次将切片放入二甲苯 I 20 min, 二甲苯 II 20 min, 无水乙醇 I 5 min, 无水乙醇 II 5 min, 75% 乙醇 5 min, 自来水洗; 切片入重铬酸钾浸泡过夜, 自来水洗; 铁苏木素 A 液与 B 液等比混合成铁苏木素染液, 切片入铁苏木素 3 min, 自

来水洗, 盐酸乙醇溶液分化, 自来水冲洗; 切片入丽春红酸性品红浸染 5~10 min, 自来水漂洗; 磷钼酸水溶液浸染 1~3 min; 磷钼酸之后不用水洗, 直接入苯胺蓝染液染 3~6 min; 切片用 1% 冰乙酸分化, 两缸无水乙醇脱水; 切片放入第三缸无水乙醇 5 min, 二甲苯 5 min 透明, 中性树胶封片; 显微镜镜检, 图像采集分析。

2.5 Western blot 检测肺组织中 mTOR, S6 蛋白及自噬相关蛋白 LC3-II 蛋白的表达 灌制蛋白质聚丙烯酰胺凝胶 (SDS-PAGE), 将蛋白进行蛋白定量后上样, 加样体积均为 $7 \text{ } \mu\text{L}$, 浓缩胶电压 75 V, 分离胶 120 V, 电泳至溴酚蓝刚跑出即可终止电泳, 电泳结束后小心取下凝胶, 按海绵垫, 3 张滤纸, 凝胶, PVDF 膜, 3 张滤纸, 海绵垫的顺序放置整齐后置于湿转负极板上, 200 mA 恒流转膜 1 h, 转膜结束后, 5% 脱脂奶粉封闭 PVDF 膜 1 h, TBST 洗膜 3 次, 一抗按 1:1 000 比例稀释于 5% 脱脂奶粉中, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育过夜, TBST 洗膜 3 次, 二抗按 1:3 000 比例稀释于 TBST, 放入 PVDF 膜后室温下孵育 30 min 后, TBST 洗膜 3 次, 取出 PVDF 膜, 使用 ECL 发光液对已孵育完成的 PVDF 膜进行显色, 将胶片进行扫描存档, Photo Shop 整理去色, Alpha 软件处理系统分析目标带的灰度值。

2.6 电镜扫描检测自噬情况 电镜固定液 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 固定 2~4 h 后, $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸缓冲液 (PBS, pH 7.4) 漂洗 3 次, 每次 15 min。1% 的锇酸 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS 室温 ($20 \text{ }^\circ\text{C}$) 固定 2 h。 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS 漂洗 3 次, 每次 15 min。组织依次入 50%, 70%, 80%, 90%, 95%, 100%, 100% 乙醇, 100% 丙酮, 100% 丙酮上行脱水, 每次 15 min。丙酮-812 包埋剂 1:1, 2~4 h, 丙酮-812 包埋剂 2:1 渗透过夜, 纯 812 包埋剂 5~8 h, 将纯 812 包埋剂倒入包埋板, 将样品插入包埋板后 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 烤箱过夜, $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 烤箱聚合 48 h。超薄切片机切片 $60 \sim 80 \text{ nm}$ 超薄切片。铀铅双染色 (2% 醋酸铀饱和乙醇溶液, 枸橼酸铅, 各染色 15 min), 切片室温干燥过夜。透射电子显微镜下观察, 采集图像分析。

2.7 统计学分析 采用 SPSS 22.0 统计软件进行统计分析, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较用单因素方差分析, 方差齐时采用 LSD 法, 方差不齐时用 Tamhane'S T2 法, 以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对肺纤维化小鼠肺泡炎和纤维化程度的影响 假手术组在 3 个时间段均未见明显肺内结构异

常。模型组在第 7 天肺间隔水肿,肺泡腔变小,肺泡壁增厚,肺泡腔内可见大量炎性细胞浸润,Masson 染色见少量蓝色着染胶原增生。14 d 肺泡壁明显增厚,炎症细胞浸润减少,可见较多成纤维细胞,Masson 染色见较多蓝色着染胶原增生。28 d 肺泡结构基本消失,大范围实质化,有少量以淋巴细胞为主的炎症细胞浸润,大量成纤维细胞。

Masson 染色可见多量蓝色着染胶原增生。与假手术组比较,模型组各时间点肺肺炎及肺纤维化积分显著升高($P < 0.01$)。与模型组比较,补阳还五汤高、中、低剂量组及强的松组在 7, 14, 28 d 积分明显降低($P < 0.05$)。补阳还五汤高剂量组与其余各组比较在 7, 14, 28 d 积分明显降低($P < 0.05$)。见表 1, 图 1 ~ 6。

表 1 补阳还五汤对肺纤维化小鼠肺肺炎和纤维化程度的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 1 Effect of Buyang Huanwu Tang on degree of pulmonary alveolitis and fibrosis in mice with pulmonary fibrosis($\bar{x} \pm s, n = 6$) 分

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	7 d		14 d		28 d	
		肺肺炎	肺纤维化	肺肺炎	肺纤维化	肺肺炎	肺纤维化
假手术	0	0	0	0	0	0	0
模型	0.01	2.68 ± 0.46 ¹⁾	2.35 ± 0.49 ¹⁾	2.58 ± 0.34 ¹⁾	2.56 ± 0.43 ¹⁾	2.26 ± 0.24 ¹⁾	2.75 ± 0.22 ¹⁾
强的松	0.455	1.85 ± 0.42 ^{2,4)}	1.60 ± 0.47 ^{2,4)}	1.86 ± 0.53 ^{2,4)}	1.78 ± 0.31 ^{2,4)}	1.67 ± 0.37 ^{2,4)}	2.05 ± 0.27 ^{2,4)}
补阳还五汤	7.02	1.29 ± 0.32 ^{2,3)}	1.11 ± 0.35 ^{2,3)}	1.22 ± 0.41 ^{2,3)}	1.28 ± 0.36 ^{2,3)}	1.11 ± 0.28 ^{2,3)}	1.55 ± 0.29 ^{2,3)}
	14.04	1.82 ± 0.28 ^{2,4)}	1.65 ± 0.26 ^{2,4)}	1.79 ± 0.35 ^{2,4)}	1.77 ± 0.39 ^{2,4)}	1.63 ± 0.26 ^{2,4)}	2.05 ± 0.32 ^{2,4)}
	28.08	1.78 ± 0.39 ^{2,4)}	1.64 ± 0.34 ^{2,4)}	1.83 ± 0.43 ^{2,4)}	1.83 ± 0.28 ^{2,4)}	1.76 ± 0.31 ^{2,4)}	1.93 ± 0.23 ^{2,4)}

注:与假手术组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$;与强的松组比较³⁾ $P < 0.05$;与补阳还五汤高剂量组比较⁴⁾ $P < 0.05$ 。

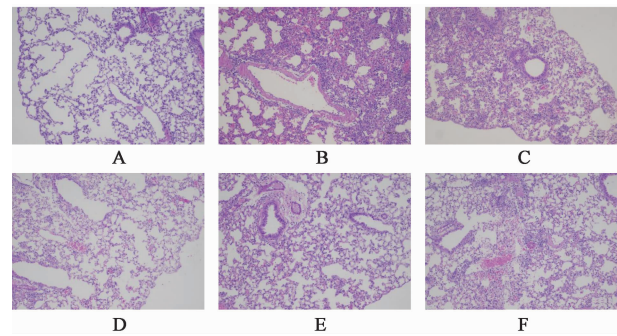


图 1 第 7 天各组小鼠肺组织病理学改变(HE, × 100)

Fig.1 Pathological changes of lung tissue in mice of all group on 7th d(HE, × 100)

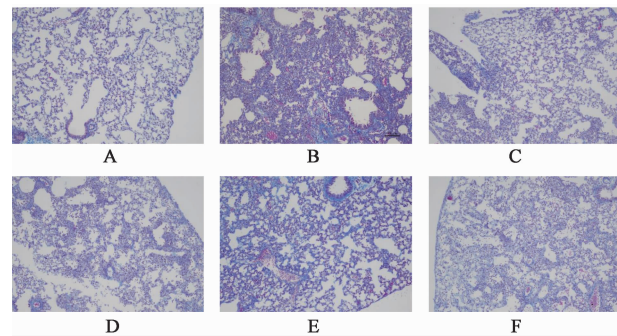


图 2 第 7 天各组小鼠肺组织病理学改变(Masson, × 100)

Fig.2 Pathological changes of lung tissue in mice of all group on 7th d(Masson, × 100)

3.2 对肺纤维化小鼠肺组织 mTOR, S6 蛋白及自噬相关蛋白 LC3-II 表达的影响

3.2.1 对肺纤维化小鼠肺组织 mTOR 蛋白表达的影响

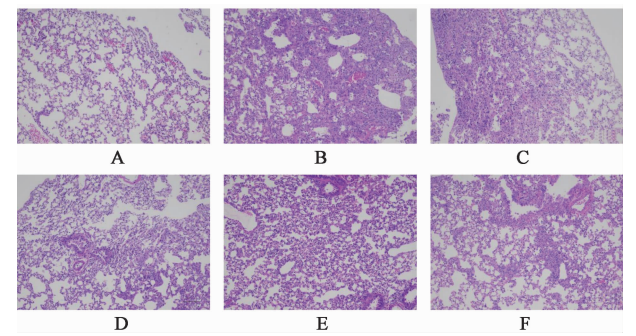


图 3 第 14 天各组小鼠肺组织病理学改变(HE, × 100)

Fig.3 Pathological changes of lung tissue in mice of all group on 14th d(HE, × 100)

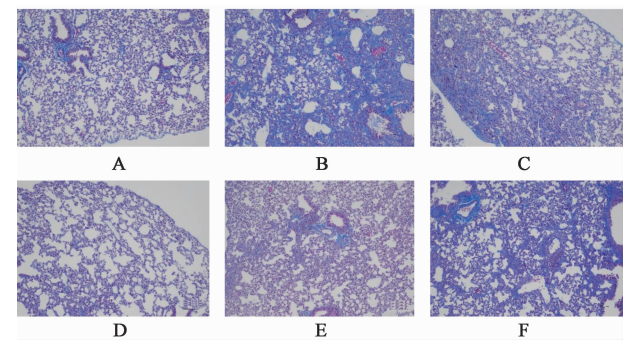


图 4 第 14 天各组小鼠肺组织病理学改变(Masson, × 100)

Fig.4 Pathological changes of lung tissue in mice of all group on 14th d(Masson, × 100)

织中 mTOR 表达水平显著增高($P < 0.01$);补阳还五汤高、中、低剂量组及强的松组 mTOR 表达水平与同期模型组比较有不同程度的降低($P < 0.01$),补阳还五汤高剂量组各时间点与同期强的松组,补

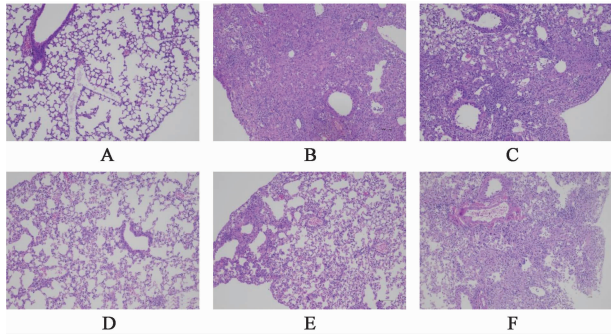


图 5 第 28 天各组小鼠肺组织病理学改变 (HE, ×100)

Fig. 5 Pathological changes of lung tissue in mice of each group on 28th d (HE, ×100)

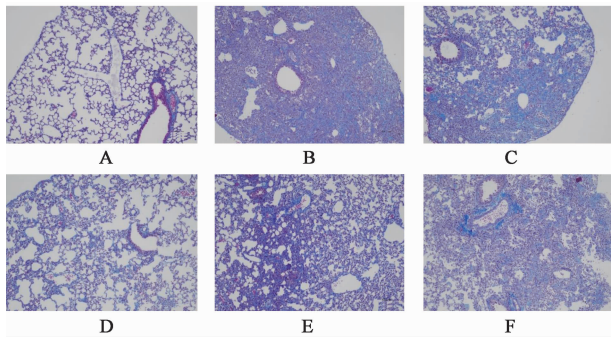


图 6 第 28 天各组小鼠肺组织病理学改变 (Masson, ×100)

Fig. 6 Pathological changes of lung tissue in mice of each group on 28th d (Masson, ×100)

阳还五汤中、低剂量组比较下降显著 ($P < 0.01$), 补阳还五汤中、低剂量组与强的松组各期比较差异无统计学意义。见表 2, 图 7。

表 2 补阳还五汤对小鼠肺组织 mTOR 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Table 2 Effect of Buyang Huanwu Tang on mTOR protein expression in lung tissue of mice with pulmonary fibrosis ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	7 d	14 d	28 d
假手术	0.01	0.71 ± 0.46	0.72 ± 0.05	0.70 ± 0.06
模型	0.01	1.06 ± 0.14 ¹⁾	1.02 ± 0.08 ¹⁾	0.97 ± 0.03 ¹⁾
强的松	0.455	0.86 ± 0.10 ^{2,4)}	0.83 ± 0.02 ^{2,4)}	0.64 ± 0.03 ^{2,4)}
补阳还五汤	7.02	0.71 ± 0.07 ^{2,3)}	0.68 ± 0.01 ^{2,3)}	0.53 ± 0.08 ^{2,3)}
	14.04	0.87 ± 0.07 ^{2,4)}	0.84 ± 0.14 ^{2,4)}	0.65 ± 0.09 ^{2,4)}
	28.08	0.87 ± 0.05 ^{2,4)}	0.84 ± 0.18 ^{2,4)}	0.65 ± 0.11 ^{2,4)}

注: 与假手术组比较¹⁾ $P < 0.01$; 与模型组比较²⁾ $P < 0.01$; 与强的松组比较³⁾ $P < 0.01$; 与补阳还五汤高剂量组比较⁴⁾ $P < 0.01$ 。

3.2.2 对肺纤维化小鼠肺组织 S6 蛋白表达的影响

与假手术组比较, 模型组在 7, 14, 28 d 肺组织中

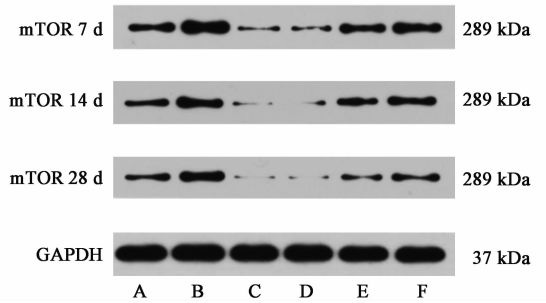


图 7 各组小鼠肺组织 mTOR 蛋白的表达电泳

Fig. 7 Electrophoresis of expression of mTOR protein in lung tissue of mice in each group

S6 表达水平显著增高 ($P < 0.01$), 补阳还五汤高、中、低剂量组及强的松组 S6 表达水平与同期模型组比较有不同程度的降低 ($P < 0.01$), 补阳还五汤高剂量组 7 d 时与强的松组, 补阳还五汤中、低剂量组比较下降显著 ($P < 0.01$), 补阳还五汤高剂量组 14 d 时与强的松、补阳还五汤低剂量组比较下降明显 ($P < 0.01$), 与补阳还五汤中剂量组比较无意义, 补阳还五汤高剂量组 28 d 时与强的松组比较下降明显 ($P < 0.05$), 补阳还五汤中剂量组 14 d 时与强的松组 ($P < 0.01$), 补阳还五汤低剂量组比较下降明显 ($P < 0.05$)。见表 3, 图 8。

表 3 补阳还五汤对肺纤维化小鼠肺组织 S6 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Table 3 Effect of Buyang Huanwu Tang on S6 protein expression in lung tissue of mice with pulmonary fibrosis ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	7 d	14 d	28 d
假手术	0.01	0.70 ± 0.05	0.70 ± 0.06	0.71 ± 0.08
模型	0.01	1.06 ± 0.10 ¹⁾	1.00 ± 0.20 ¹⁾	1.07 ± 0.38 ¹⁾
强的松	0.455	0.87 ± 0.22 ^{2,5)}	0.68 ± 0.09 ^{2,5)}	0.56 ± 0.10 ^{2,5)}
补阳还五汤	7.02	0.70 ± 0.02 ^{2,4)}	0.43 ± 0.10 ^{2,4)}	0.36 ± 0.04 ^{2,3)}
	14.04	0.88 ± 0.07 ^{2,5)}	0.44 ± 0.10 ^{2,4)}	0.50 ± 0.05 ²⁾
	28.08	0.88 ± 0.03 ^{2,5)}	0.60 ± 0.06 ^{2,5,6)}	0.52 ± 0.05 ²⁾

注: 与假手术组比较¹⁾ $P < 0.01$; 与模型组比较²⁾ $P < 0.01$; 与强的松组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$; 与补阳还五汤高剂量组比较⁵⁾ $P < 0.01$; 与补阳还五汤中剂量组比较⁶⁾ $P < 0.05$ 。

3.2.3 对肺纤维化小鼠肺组织 LC3-II 表达的影响

与假手术组比较, 模型组在 7, 14, 28 天肺组织中 LC3-II 表达水平明显降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 补阳还五汤高、中、低剂量组及强的松组 LC3-II 表达水平与同期模型组比较有不同程度的增高 ($P < 0.01$), 补阳还五汤高剂量组 7, 14 d 与同期强的松组、补阳还五汤中、低剂量组比较增高显著 ($P <$

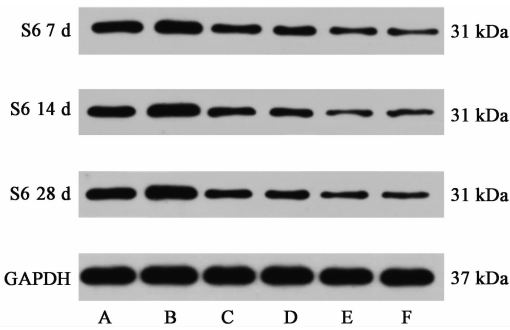


图 8 各组小鼠肺组织 S6 蛋白的表达电泳
Fig. 8 Electrophoresis of expression of S6 protein in lung tissue of mice in each group

0.01), 补阳还五汤中剂量组 28 天时比补阳还五汤低剂量组, 强的松组增高 ($P < 0.05$)。见表 4, 图 9。

表 4 补阳还五汤对肺纤维化小鼠肺组织 LC3-II 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 4 Effect of Buyang Huanwu Tang on LC3-II protein expression in lung tissue of mice of mice with pulmonary fibrosis ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	7 d	14 d	28 d
假手术	0.01	0.62 ± 0.06	0.64 ± 0.06	0.65 ± 0.03
模型	0.01	0.50 ± 0.08 ²⁾	0.47 ± 0.07 ¹⁾	0.49 ± 0.03 ¹⁾
强的松	0.455	0.63 ± 0.06 ^{3,5)}	0.84 ± 0.22 ^{3,5)}	0.86 ± 0.13 ^{5,6)}
补阳还五汤	7.02	0.79 ± 0.08 ^{3,4)}	1.07 ± 0.02 ^{3,4)}	1.09 ± 0.17 ³⁾
	14.04	0.63 ± 0.01 ^{3,5)}	0.84 ± 0.10 ^{3,5)}	1.00 ± 0.09 ³⁾
	28.08	0.60 ± 0.05 ^{3,5)}	0.81 ± 0.14 ^{3,5)}	0.85 ± 0.07 ^{3,5,6)}

注:与假手术组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较³⁾ $P < 0.01$;与强的松组比较⁴⁾ $P < 0.01$;与补阳还五汤高剂量组比较⁵⁾ $P < 0.01$;与补阳还五汤中剂量组比较⁶⁾ $P < 0.05$ 。

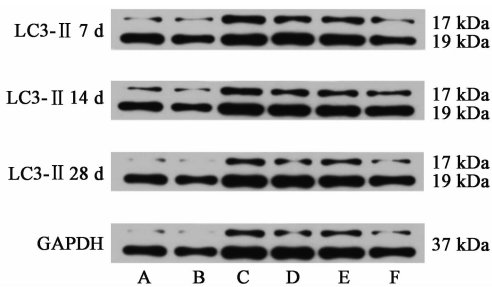


图 9 各组小鼠肺组织 LC3-II 蛋白的表达电泳
Fig. 9 Electrophoresis of expression of LC3-II protein in lung tissue of mice in each group

3.3 对肺纤维化小鼠肺组织自噬的影响 假手术组细胞形态良好,胞质内细胞器丰富,粗面内质网轻度扩张,未见自噬。模型组胞质内可见细胞器较少,大面积区域水肿,细胞核出现核固缩现象,部分区域核膜消失,线粒体数量较少且肿胀明显,存在个别自

噬。强的松组及补阳还五汤高、中、低剂量组细胞形态及自噬数量好于模型组,其中补阳还五汤高、中剂量组自噬数量多于其他组。见图 10。

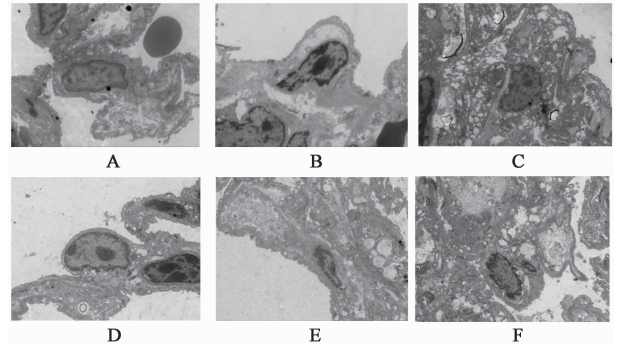


图 10 补阳还五汤对肺纤维化小鼠肺组织自噬情况的影响 (电镜扫描, ×2000)

Fig. 10 Effect of Buyang Huanwu Tang on autophagy of lung tissue in each group of mice of mice with pulmonary fibrosis (SEM, ×2000)

4 讨论

本研究结果显示与假手术组比较,模型组及给药组小鼠肺炎及肺纤维化明显,与模型组比较,给药组各时间点的肺炎和肺纤维化程度均有不同程度的改善;Western blot 结果显示模型组与假手术组比较小鼠肺组织 mTOR, S6 蛋白表达水平明显上升,LC3-II 表达水平下降,各给药组与模型组比较,小鼠 mTOR, S6 蛋白表达水平明显下降,LC3-II 表达水平上升,其中补阳还五汤高剂量组明显优于强的松组,在第 14 天补阳还五汤中剂量组的作用优于强的松组,表明补阳还五汤高剂量为优选剂量。综上所述,在 BLM 所致小鼠肺纤维化形成的过程中,小鼠肺组织中 mTOR 蛋白被激活,自噬抑制,mTOR 蛋白通过抑制自噬参与了肺纤维化的发病;补阳还五汤对 BLM 所致小鼠肺纤维化有一定的治疗作用,其机制可能与其下调介导细胞自噬的 mTOR 蛋白表达有关。

肺纤维化预后不良,致死率高,目前缺乏较佳的治疗方案,近年来,随着对其发病机制的深入研究,认识到自噬不足在其发生发展过程中起到了重要作用。肺纤维化的形成主要是成纤维细胞增殖并向肌成纤维细胞转化,并且分泌的大量细胞外基质沉积^[24]。自噬不足可加重肺泡上皮细胞损伤老化或上皮基底膜破坏^[25-26],使肺泡上皮细胞反复修复、异常修复,上皮细胞凋亡或损伤后的异常激活会产生多种生长因子和趋化因子,从而诱导固有成纤维细胞的增生,成纤维细胞随血液循环到达肺损伤部位后,进一步刺激上皮细胞向间充质细胞转化;另

一方面,自噬不足还会加速成纤维细胞向肌成纤维细胞分化^[27]。

自噬是广泛存在于真核细胞中的基本生命现象,自噬溶酶体系统对细胞质内异物、损伤和衰老细胞器进行吞噬降解,实现降解产物再利用和细胞器更新的过程^[28-29],对细胞内环境的稳态、受损细胞器的清除、异常蛋白质的聚集和抵抗病原体的入侵起着至关重要的作用。多种肺部疾病中存在自噬活性的变化,自噬与肺部疾病的发生、发展密切相关。自噬的启动与 Atg1 激酶复合体的激活有关^[30]。mTOR 是负向调控自噬的靶点,可以感受环境的变化,并调节细胞生长代谢。在富营养的环境下,mTORC1 能直接将 Atg13 和 Atg14 磷酸化,阻止下游 Atg1 激酶复合体的形成和激活,抑制自噬特异的第三磷脂酰肌醇 3 激酶 (Class III phosphatidylinositol-3-kinase, PI3KC3),阻止自噬的激活。在氨基酸剥夺条件下^[31]或外源性应用 mTOR 抑制剂^[32]时 mTOR 会被抑制,进而激活 Atg13,丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 (serine/threonine-protein kinase, ULK1) 和丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 (serine/threonine-protein kinase, ULK2),产生自噬。

肺纤维化归属于中医“肺痿”“肺痹”等疾病范畴,病位在肺、肾,属本虚标实之证,由外邪、痰浊、瘀血、热毒等致病因素,引起肺肾亏虚、气虚血瘀、痰热互结、痹阻肺络等病机改变。在肺纤维化的发展过程中,气虚血瘀是其病机重点,使用益气活血法对肺纤维化进行实验研究取得了较好的效果。补阳还五汤出自清代名医王清任的《医林改错》下卷“瘫痿论”,全方补气活血通络。原方重用生黄芪四两为君药补气扶正以固本,桃仁、红花各一钱、赤芍一钱半兼顾血瘀,归尾二钱、川芎一钱养血行气而不伤正,地龙针对久病入络搜剔通络,且桃仁地龙均可以止咳平喘。现代药理研究发现,本方具有改善血液流变学、抗血栓、抗血管损伤及保护血脑屏障、抑制兴奋性氨基酸毒性、抑制炎症因子的释放、清除自由基与抗氧化作用、抑制细胞凋亡、促进神经元再生等作用^[33]。其单味药成分已有深入研究报告,主要含 7 类成分,包括苷类、苷元类、挥发油类、生物碱类、多糖类、蛋白质类、氨基酸类,其有效成分主要是黄芪甲苷、阿魏酸、芍药苷、红花黄色素、川芎嗪等^[34]。黄芪甲苷作为黄芪的有效成分已被证实可通过增强自噬,改善了 BLM 诱导的小鼠肺纤维化^[35-36]。有效成分阿魏酸^[37]、川芎嗪^[38]、红花黄色素^[39-40]、及单位中药黄芪^[41]、当归^[42]、川芎^[43]、地龙^[44]等均可改

善肺纤维化。补阳还五汤通过调控介导细胞自噬的 mTOR 蛋白表达,改善肺纤维化,对肺纤维化的发生发展起到了很好的治疗作用。

[参考文献]

- [1] Ley B, Brown K K, Collard HR. Molecular biomarkers in idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2014, 307(9): 681-691.
- [2] Katzenstein A L, Zisman D A, Litzky L A, et al. Usual interstitial pneumonia: histologic study of biopsy and explant specimens [J]. *Am J Surg Pathol*, 2002, 26(12): 1567-1577.
- [3] Chiarini F, Evangelisti C, McCubrey J A, et al. Current treatment strategies for inhibiting mTOR in cancer [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2015, 36(2): 124-135.
- [4] HUANG K, Fingar D C. Growing knowledge of the mTOR signaling network [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2014, 36: 79-90.
- [5] MA X M, Blenis J. Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2009, 10(5): 307-318.
- [6] 彭敏, 阳学风. mTOR 信号通路及肝星状细胞功能的关系 [J]. *世界华人消化杂志*, 2017, 25(35): 3141-3148.
- [7] Kamada Y, Funakoshi T, Shintani T, et al. Tor mediated induction of autophagy via an Appl protein kinase complex [J]. *J Cell Biol*, 2000, 150(6): 1507-1513.
- [8] Noda T, Ohsumi Y. TOR, a phosphatidylinositol kinase homologue, controls autophagy in yeast [J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(7): 3963-3966.
- [9] 董洪亮, 刘乃国, 苗双, 等. 1, 25-(OH)-2D-3 对肺纤维化大鼠中 PI3K、AKT、mTOR 表达的影响及其机制研究 [J]. *中国现代医学杂志*, 2018, 28(19): 1-6.
- [10] 林艺凯, 马爱平, 周伟跃, 等. mTOR 信号通路在博来霉素诱导小鼠肺纤维化中的作用机制研究 [J]. *中国呼吸与危重监护杂志*, 2018, 17(2): 178-182.
- [11] Chitra P, Saiprasad G, Manikandan R, et al. Berberine inhibits Smad and non-Smad signaling cascades and enhances autophagy against pulmonary fibrosis [J]. *J Mol Med*, 2015, 93(9): 1015-1031.
- [12] Patel A S, LIN L, Geyer A, et al. Autophagy in idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *PLoS One*, 2012, 7(7): e41394.
- [13] GUI X H, CHEN H W, CAI H R, et al. Leptin promotes pulmonary fibrosis development by inhibiting autophagy via PI3K/Akt/mTOR pathway [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 498(3): 660-666.
- [14] Jessica L, Richard N. The role of the mammalian target of rapamycin (mTOR) in pulmonary fibrosis [J]. *Int J*

- Mol Sci, 2018, 19(3): E778.
- [15] 杨昆,李勇华,王飞,等. 补阳还五汤防治特发性肺纤维化的作用及机制探讨[J]. 北京中医药大学学报, 2017, 40(7): 550-557.
- [16] 王振兴,孙中莉,王明杰,等. 补阳还五汤对肺纤维化中 HMGB1-RAGE 信号通路的调控作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(13): 138-144.
- [17] 杨晗,王飞,杨昆. 补阳还五汤对博来霉素所致肺纤维化大鼠肺组织 ERK 表达的影响[J]. 中华中医药杂志, 2017, 32(4): 1727-1730.
- [18] 郝丽君. 补阳还五汤大鼠含药血清对 HMGB1 诱导的 HFL-1 细胞相关炎症因子的影响[D]. 成都: 成都中医药大学, 2016.
- [19] 李水芹,李学君,王飞,等. 补阳还五汤大鼠含药血清对肺成纤维细胞 TGF- β_1 /Smad/ERK 信号通路的影响[J]. 辽宁中医杂志, 2015, 42(12): 2436-2439.
- [20] 杨晗,王飞,王全林,等. 补阳还五汤对肺纤维化大鼠肺组织 TGF- β_1 /Smad3 表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(24): 240-244.
- [21] Limjunyawong N, Mitzner W, Horton M R. A mouse model of chronic idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Physiol Rep*, 2014, 2(2): e00249.
- [22] Demedts M, Behr J, Buhl R, et al. High-dose acetylcysteine in idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *N Engl J Med*, 2005, 353(21): 2229-2242.
- [23] Szapiel S V, Elson Na, Fulmer J D, et al. Bleomycin-induced interstitial pulmonary disease in the nude athymic mouse [J]. *Am Rev Respir Dis*, 1979, 120(9): 893-899.
- [24] 陶金,孙钰,王静成,等. 细胞自噬与纤维化疾病的研究进展[J]. 江苏医药, 2018, 44(4): 432-437.
- [25] Araya J, Kojima J, Takasaka N, et al. Insufficient autophagy in idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2013, 304(1): 56-69.
- [26] Cabrera S, Maciel M, Herrera I, et al. Essential role for the ATG4B protease and autophagy in bleomycin-induced pulmonary fibrosis [J]. *Autophagy*, 2015, 11(4): 670-684.
- [27] Ricci A, Cherubini E, Scozzi D, et al. Decreased expression of autophagic beclin 1 protein in idiopathic pulmonary fibrosis fibroblasts [J]. *J Cell Physiol*, 2013, 228(7): 1516-1524.
- [28] PEI J J, Hugon J. mTOR-dependent signaling in Alzheimer's disease [J]. *J Cell Mol Med*, 2008, 12(6B): 2525-2532.
- [29] SUI L, REN J. Role of Mtor in memory [J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2011, 27: 748-751.
- [30] Kamada Y, Funakoshi T, Shintani T, et al. Tor mediated induction of autophagy via an Apg1 protein kinase complex [J]. *J Cell Biol*, 2000, 150(6): 1507-1513.
- [31] Ravikumar B, Sarkar S, Davies J E, et al. Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathology [J]. *Physiol Rev*, 2010, 90(4): 1383-1435.
- [32] Cordani M, Butera G, Pacchiana R, et al. Molecular interplay between mutant p53 proteins and autophagy in cancer cells [J]. *BBA Rev Canc*, 2017, 1867(1): 19-28.
- [33] 肖美凤,刘金玲,杨岩涛,等. 补阳还五汤的研究现状及其新药创制关键技术[J]. 中草药, 2018, 49(7): 1688-1694.
- [34] 刘俊娥,张继平. 补阳还五汤药效物质基础的研究进展[J]. 中医药信息, 2012, 29(5): 117-119.
- [35] 王鹏飞,林昶,刘杨,等. 黄芪甲苷对博来霉素诱导的小鼠特发性肺纤维化自噬和焦亡的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(10): 144-149.
- [36] 徐昌君,王鹏飞,刘杨,等. 黄芪甲苷对特发性肺纤维化自噬活性作用及 PI3K/Akt/mTOR 信号调控的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(18): 75-82.
- [37] 况菊,魏小林,谢敏. 阿魏酸钠对 NALP3 炎性复合体的调节及在肺纤维化中的作用[J]. 四川大学学报: 医学版, 2017, 48(4): 503-508.
- [38] 徐博,王甜,郭伟,等. 不同剂量丹参联合川芎嗪对肺纤维化大鼠的保护作用[J]. 西部医学, 2017, 29(10): 1364-1368.
- [39] 李海. 基于 Hippo 信号通路的红花黄色素治疗百草枯中毒肺纤维化的研究[D]. 济南: 山东大学, 2017.
- [40] 孙桂香. 红花黄色素氯化钠注射液联合甲基泼尼龙治疗特发性肺纤维化的疗效及安全性[J]. 实用临床医药杂志, 2016, 20(5): 46-49.
- [41] 孙雪鹏. 单味中药及其提取物治疗矽肺的研究进展[J]. 中医学报, 2018, 46(4): 127-130.
- [42] 任春贞,骆亚莉,刘永琦,等. 当归防治肺纤维化的研究进展[J]. 时珍国医国药, 2017, 28(1): 199-201.
- [43] 庞宇涵,王彤,李瑞丽. 8 种中药有效成分治疗肺纤维化研究[J]. 吉林中医药, 2017, 37(9): 952-954, 965.
- [44] 喻婷,李国辉,贾仰民,等. 染尘大鼠高迁移率蛋白 B1 的表达及地龙对大鼠的干预作用[J]. 中华全科医学, 2018, 16(5): 697-700, 707.

[责任编辑 周冰冰]