

基于自噬探究补肺活血胶囊对博来霉素诱发小鼠肺纤维化的抑制作用

李鹏，牛璐，赵国静，孙英，陶红卫，周佩夏，陆学超，胡海波*

[青岛大学附属青岛市海慈医院（青岛市中医医院）呼吸与危重症医学科（肺病）中心，山东青岛266033]

摘要：目的 基于自噬与上皮间质转化（EMT）角度探究补肺活血胶囊对肺纤维化（PF）小鼠的作用。方法 105只C57BL/6J小鼠随机分为正常组，模型组，雷帕霉素组（2 mg/kg，腹腔注射），低、中、高剂量补肺活血组（0.32、0.63、1.62 g/kg 补肺活血胶囊，灌胃）和补肺活血+3-MA组（1.62 g/kg 补肺活血胶囊，灌胃；30 mg/kg 3-MA，腹腔注射）。通过对小鼠气管内单次注射2.5 mg/kg 博来霉素（BLM）来诱导PF，造模成功后1 d开始给药，持续21 d。统计小鼠存活率与体质量，采集肺泡灌洗液（BALF）并测定总细胞与总蛋白，测定肺组织湿干重比与羟脯氨酸水平，苏木精和伊红（HE）染色和Masson三色染色观察肺组织病理学变化，RT-qPCR法检测肺组织EMT相关因子（*E-cad*、*Vim*、 α -SMA、*TGF-β1*）mRNA表达，Western blot法检测肺组织EMT相关蛋白以及自噬相关蛋白（p-mTOR、mTOR、P62、LC3-II、LC3-I、Beclin1）表达。结果 与模型组比较，雷帕霉素与补肺活血胶囊干预后PF小鼠生存率提高，体质量增加，肺组织湿干重比、BALF总细胞和总蛋白、羟脯氨酸水平均降低，肺组织病理形态改善，肺组织上皮细胞标志物*E-cad* mRNA及蛋白表达升高，间质细胞标志物*Vim*、 α -SMA、*TGF-β1* mRNA和蛋白表达降低，p-mTOR/mTOR、P62蛋白表达降低，LC3-II/LC3-I、Beclin1蛋白表达升高；3-MA干预后PF小鼠各指标与模型组无明显差异。结论 补肺活血胶囊可通过促进上皮细胞自噬并抑制EMT来缓解BLM诱导的PF小鼠肺损伤。

关键词：补肺活血胶囊；肺纤维化；自噬；上皮间质转化；mTOR

中图分类号：R285.5

文献标志码：B

文章编号：1001-1528(2024)04-1337-06

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2024.04.044

肺纤维化（pulmonary fibrosis, PF）是许多间质性肺部疾病的终末期改变，确诊后平均预期寿命仅为3年^[1]。从已有的研究来看，目前PF暂无较好的药物治疗手段^[2]。PF发病率的日益上升加重了医疗负担，故研发安全可靠的药物对于改善PF患者预后具有重要的临床价值。

中医药对PF具有很好的治疗作用^[3-6]，如淫羊藿苷可通过降低博来霉素（bleomycin, BLM）诱导的大鼠模型中大麻素受体I型和II型的表达来减轻肺损伤^[5]，还可抑制Hippo通路表达以预防PF^[6]；补阳还五汤可启动Keap1/Nrf2/HO-1介导的抗氧化效应，延缓PF大鼠病理进程^[4]；益气养阴活血方可能通过调控TGF-β1、Smad3表达，调节MMP-9/TIMP-1平衡，降解细胞外基质，延缓PF发展^[3]。

补肺活血胶囊由黄芪、赤芍、补骨脂组成，具有益气活血、补肺固肾功效，常用于临床治疗PF等疾病^[7]。研究表明，补肺活血胶囊可以减少肺组织炎性浸润，改善肺部炎性损伤及纤维化样变程度^[8]，一定程度上延缓肺功能下降，改善临床症状^[9]，然而其具体的作用机制尚不明确。本研究拟通过BLM诱导建立小鼠PF模型，并给予补

肺活血胶囊进行干预，以确认它对PF小鼠的改善作用。然后，基于自噬途径研究补肺活血胶囊对PF小鼠上皮间质转化（epithelial-mesenchymal transition, EMT）的影响，以期为其临床治疗PF提供科学依据。

1 材料

1.1 动物 SPF级健康雄性C57BL/6小鼠，105只，体质量20~22 g，购自北京华阜康生物科技股份有限公司[实验动物生产许可证号SCXK(京)2019-0008]，饲养于青岛大学附属青岛市海慈医院动物实验中心[实验动物使用许可证号SYXK(鲁)2020-0009]，室温(21±2)℃，相对湿度50%~60%，明暗12 h/12 h，自由进饮水，每笼5只。动物实验得到动物保护和使用机构的批准，并严格按照规定进行操作（伦理号2023HC09LS001）。

1.2 试剂与药物 雷帕霉素、3-MA（货号HY-10219、HY-19312，美国MedChemExpress公司）；博来霉素（货号M2100，美国AbMole公司）；补肺活血胶囊（货号Z20030063，广东雷允上药业有限公司）。BCA法微量蛋白检测试剂盒、牛血清白蛋白、Masson染液、苏木素-伊红

收稿日期：2023-12-25

基金项目：山东省中医药科技项目（2020Q074）；青岛市中医药科研项目（2019-zyy001）；青岛市医药科研指导计划（2020-WJZD051）

作者简介：李鹏（1986—），男，硕士，主治医师，研究方向为中医、中西医结合防治呼吸系统疾病。Tel：15806599839，E-mail：lipeng3402@163.com

*通信作者：胡海波（1982—），男（蒙古族），硕士，副主任医师，研究方向为中医、中西医结合防治呼吸系统疾病。Tel：18560610599，E-mail：Iamhhb1982@163.com

(HE) 染液、羟脯氨酸检测试剂盒(碱水解法)、羊抗鼠 IgG-HRP、羊抗兔 IgG-HRP(货号 W041-1-1、W071-1-1、D026-1-3、D006-1-4、A030-2-1、KS001、KS002, 南京建成生物工程研究所); β -肌动蛋白(β -actin)、E-钙黏蛋白(E-cad)、波形蛋白(Vim)、 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)、转化生长因子 β (TGF- β)、磷酸化雷帕霉素靶蛋白(p-mTOR)、雷帕霉素靶蛋白(mTOR)、泛素结合蛋白(P62)、自噬微管相关蛋白轻链3(LC3)、自噬效应蛋白(Beclin1)抗体(货号3700、14472、3932、69319、3711、2971、4517、39749、4108、3495, 美国Cell Signaling Technology公司); 总RNA提取试剂盒、cDNA反转录试剂盒、SYBR扩增试剂盒[货号DP419、KR116-02、P205-02, 天根生化科技(北京)有限公司]。

1.3 仪器 SuPerMax 3200型多功能酶标仪(上海闪谱生物科技有限公司); KH30RF型高速冷冻离心机(湖南凯达科学仪器有限公司); PowerPAC Basic电泳仪、ChemiDoc XRS凝胶成像自动分析仪(美国Bio-Rad公司); MDF-C8V(N)型-80℃冷冻冰箱(日本SANYO公司); LEPGEN-96荧光定量PCR仪[乐普(北京)医疗器械股份有限公司]。

2 方法

2.1 造模、分组与给药 105只小鼠随机分为正常组,模型组,雷帕霉素组,低、中、高剂量补肺活血组和补肺活血+3-MA组。通过对小鼠气管内单次注射2.5 mg/kg BLM来诱导PF模型,正常组单次气管注射PBS。在气管注射后第1天开始,雷帕霉素组每天腹腔注射2 mg/kg雷帕霉素,低、中、高剂量补肺活血组每天分别灌胃0.32、0.63、1.26 g/kg(临床等效剂量0.5、1、2倍)补肺活血胶囊,补肺活血+3-MA组每天灌胃1.26 g/kg补肺活血并腹腔注射30 mg/kg 3-MA,正常组和模型组每天灌胃生理盐水,持续21 d。给药过程中,每天统计各组小鼠存活的数量,在接受气管注射后第22天处死,称定质量,收集样本。

2.2 肺组织标本采集 小鼠处死后切开胸腔,并充分暴露颈部气管,结扎右肺,4℃ PBS对左肺进行3次灌洗,每次0.5 mL,回收液即为肺泡灌洗液(BALF),摘下灌洗后的左肺于-80℃冰箱中保存。将BALF在4℃下150×g离心5 min,收集上清液,于-80℃冰箱中保存,采用总蛋白测定试剂盒分析总蛋白浓度。再将BALF中的细胞颗粒重新悬浮在PBS中,进行细胞计数。

2.3 肺组织病理学染色 收集BALF后,摘取结扎的右肺放入4%多聚甲醛中固定,取下叶称量湿重,然后置于60℃烘箱中烘72 h,称量干重,计算肺组织湿干重比;剩余右肺嵌入石蜡包埋后制成3 μm切片,进行常规HE染色和Masson三色染色,于光学显微镜下观察,并评估肺部炎症和胶原沉积水平。采用Szapiel法量化HE染色^[10],改良的Ashcroft法量化Masson染色^[11]。

2.4 肺组织羟脯氨酸水平检测 取30 mg肺组织,使用生化试剂盒进行检测。羟脯氨酸氧化后与二甲氨基苯甲醛反应显紫红色,用酶标仪在550 nm波长处测定吸光度,并计

算肺部胶原蛋白主成分羟脯氨酸水平。

2.5 RT-qPCR法检测肺组织EMT相关因子的mRNA表达 使用RNA提取试剂盒提取肺组织总RNA,再使用反转录试剂盒获得cDNA,随后进行qPCR反应,引物序列见表1。以 β -actin为内参,通过 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算E-cad、Vim、 α -SMA、TGF- β 1 mRNA表达。

表1 引物序列

基因	引物序列(5'→3')
E-cad	正向 AACCCAAGCACGTATCAGGG 反向 GAGTGTGGGGGCATCATCA
Vim	正向 TGCTTCAAGACTCGGTGAC 反向 AACGCCACCTTGTCGATGTA
α -SMA	正向 GTACCACCATGTACCCAGGC 反向 GCTGGAAGCTAGACAGCGAA
TGF- β 1	正向 ACTGGAGTTGTACGGCACTG 反向 GGGCTGATCCCCTTGATTT
β -actin	正向 CCCCTGAACCTAAGGCCA 反向 ATGGCTACGTACATGGCTGG

2.6 Western blot法检测肺组织EMT以及NLRP3信号通路相关蛋白表达 取适量肺组织,加入含1 mmol/L PMSF的冰冷的RIPA缓冲液,超声均质提取总蛋白,使用BCA蛋白检测试剂盒测定上清液中蛋白浓度。蛋白质通过SDS-PAGE凝胶电泳分离后电转到PVDF膜,5%脱脂奶粉封闭1 h,加入E-cad、Vim、 α -SMA、TGF- β 1、p-mTOR、mTOR、P62、LC3、Beclin1抗体,在4℃下孵育过夜,TBST清洗3次,加入HRP标记的二抗,在室温下培养1 h,再次洗膜后经ECL化学发光显影,使用Image J软件对条带进行量化分析。

2.7 统计学分析 通过Excel 2019、SPSS Pro软件进行处理,数据以($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用t检验。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 补肺活血胶囊对PF小鼠肺纤维化进程的影响

3.1.1 生存率 造模及给药结束后,正常组小鼠生存率为100%,模型组小鼠生存率为40%,雷帕霉素(生存率为73%)和低、中、高剂量补肺活血胶囊(生存率为53%、60%、67%)干预可增加生存率,但补肺活血+3-MA组PF小鼠生存率降至47%,见图1。最终,生存的小鼠数量分别为正常组15只、模型组6只、雷帕霉素11只、低剂量补肺活血组8只、中剂量补肺活血组9只、高剂量补肺活血组10只、补肺活血+3-MA组7只。

3.1.2 体征与生化指标 与正常组比较,模型组小鼠体质质量降低($P < 0.01$),肺组织湿干重比、BALF总细胞数和总蛋白含量均升高($P < 0.01$);与模型组比较,雷帕霉素组和中、高剂量补肺活血组小鼠体质质量均升高($P < 0.05$, $P < 0.01$),肺组织湿干重比、BALF总细胞数和总蛋白含量均降低($P < 0.05$, $P < 0.01$),低剂量补肺活血组小鼠BALF总细胞数降低($P < 0.05$),补肺活血+3-MA组各指标均无

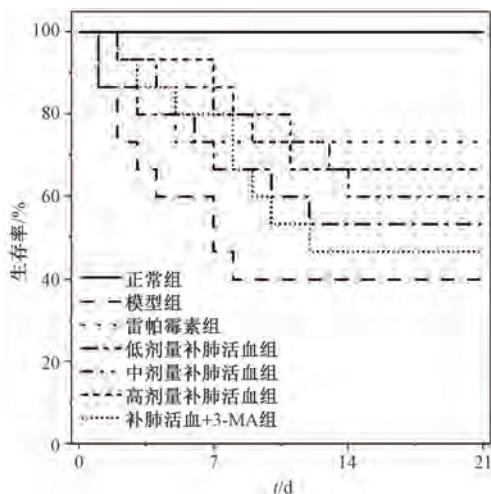
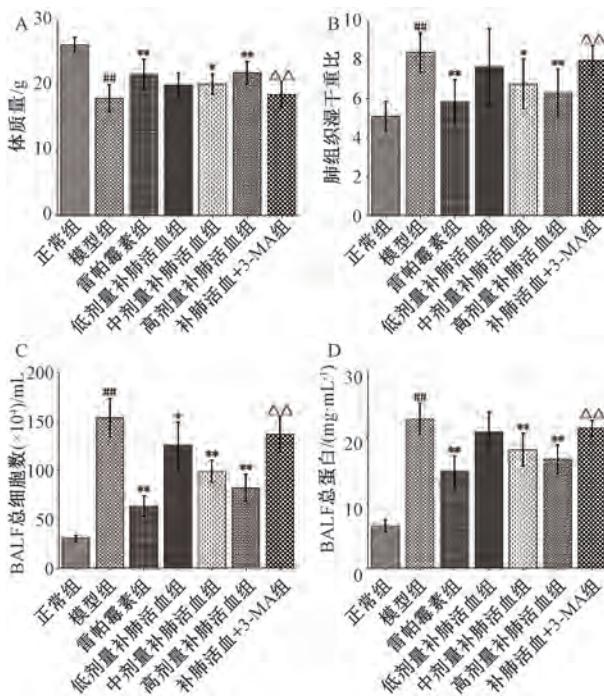


图1 补肺活血胶囊对PF小鼠生存率的影响 (n=15)

明显变化 ($P>0.05$)；与高剂量补肺活血组比较，补肺活血+3-MA组小鼠体质量降低 ($P<0.01$)，肺组织湿干重比、BALF总细胞数和总蛋白含量均升高 ($P<0.01$)，见图2。



注：A~D分别为体质量、肺组织湿干重比、BALF总细胞数、总蛋白含量。与正常组比较，^{##} $P<0.01$ ；与模型组比较，^{*} $P<0.05$ ，^{**} $P<0.01$ ；与高剂量补肺活血组比较，^{△△} $P<0.01$ 。

图2 补肺活血胶囊对PF小鼠体征与生化指标的影响

($\bar{x}\pm s$, n=6~15)

3.1.3 肺组织病理损伤 HE染色及评分结果见图3A~3B，可知正常组小鼠肺组织未发现肺泡炎性渗出及纤维化病变，肺泡结构清晰完整；模型组小鼠肺间质细胞数量增加，纤维组织增生加剧，肺组织严重受损，HE染色评分高于正常组 ($P<0.01$)；雷帕霉素组和各剂量补肺活血组小鼠肺组织纤维化样变减轻，肺组织结构较为清晰，肺间质

略有增加，HE染色评分低于模型组 ($P<0.01$)；与高剂量补肺活血组比较，补肺活血+3-MA组小鼠肺组织纤维化进程加重，HE染色评分升高 ($P<0.01$)。

Masson染色及评分结果见图3A、3C，可知正常组小鼠肺组织结构形态正常；模型组小鼠肺间质中存在蓝色胶原蛋白沉积，肺组织纤维化程度严重，Masson染色评分高于正常组 ($P<0.01$)；雷帕霉素组和各剂量补肺活血组小鼠肺组织中蓝色胶原蛋白沉积减少，肺纤维化得到改善，Masson染色评分低于模型组 ($P<0.01$)；与高剂量补肺活血组比较，补肺活血+3-MA组小鼠肺组织蓝色胶原蛋白沉积加重，肺纤维化程度加重，Masson染色评分升高 ($P<0.01$)。

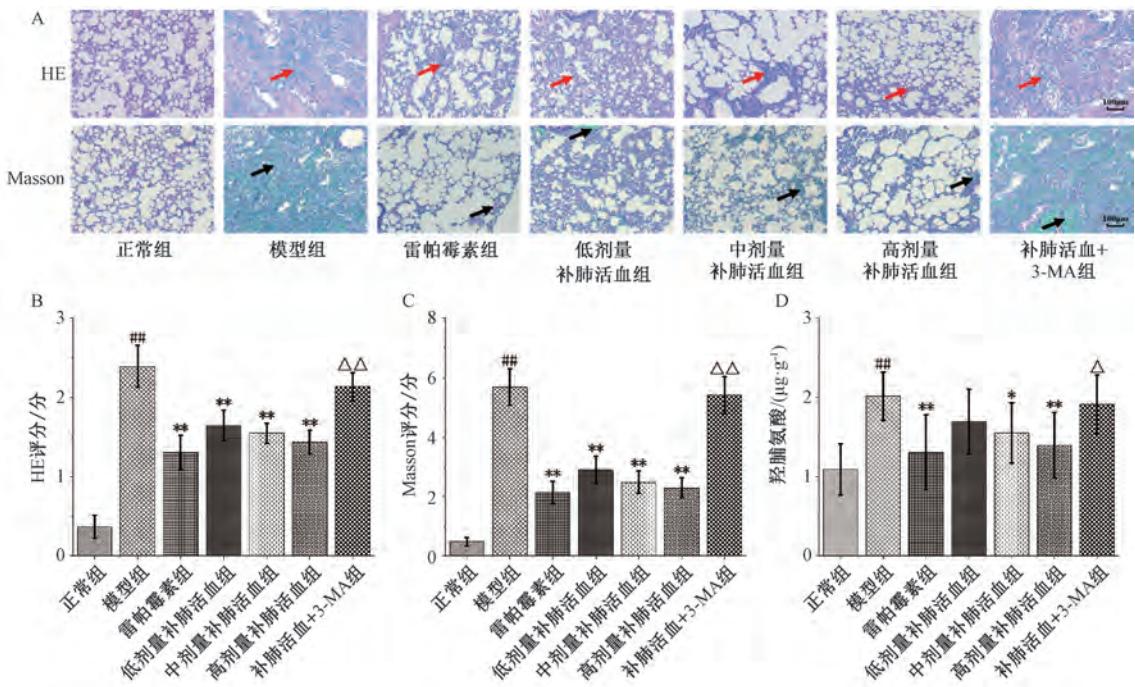
如图3D所示，与正常组比较，模型组小鼠肺组织羟脯氨酸水平升高 ($P<0.01$)；与模型组比较，雷帕霉素组和中、高剂量补肺活血组小鼠肺组织羟脯氨酸水平降低 ($P<0.05$, $P<0.01$)；与高剂量补肺活血组比较，补肺活血+3-MA组小鼠肺组织羟脯氨酸水平升高 ($P<0.05$)。

3.2 补肺活血胶囊对PF小鼠肺组织EMT相关因子表达的影响 如图4所示，与正常组比较，模型组小鼠肺组织E-cad mRNA和蛋白表达均降低 ($P<0.01$)，Vim、 α -SMA、TGF- β 1 mRNA和蛋白表达均升高 ($P<0.05$, $P<0.01$)；与模型组比较，雷帕霉素组和中、高剂量补肺活血组小鼠肺组织E-cad mRNA和蛋白表达均升高 ($P<0.05$, $P<0.01$)，Vim、 α -SMA、TGF- β 1 mRNA和蛋白表达均降低 ($P<0.05$, $P<0.01$)；与高剂量补肺活血组比较，补肺活血+3-MA组小鼠肺组织E-cad mRNA和蛋白表达均降低 ($P<0.05$, $P<0.01$)，Vim、 α -SMA、TGF- β 1 mRNA和蛋白表达均升高 ($P<0.05$, $P<0.01$)。

3.3 补肺活血胶囊对PF小鼠肺组织自噬相关蛋白表达的影响 如图5所示，与正常组比较，模型组小鼠肺组织p-mTOR/mTOR、P62蛋白表达均升高 ($P<0.01$)，LC3-II/LC3-I、Beclin1蛋白表达均降低 ($P<0.01$)；与模型组比较，雷帕霉素组和中、高剂量补肺活血组小鼠肺组织p-mTOR/mTOR、P62蛋白表达均降低 ($P<0.05$, $P<0.01$)，LC3-II/LC3-I、Beclin1蛋白表达均升高 ($P<0.05$, $P<0.01$)，低剂量补肺活血组小鼠肺组织P62蛋白表达降低 ($P<0.05$)，LC3-II/LC3-I蛋白表达升高 ($P<0.05$)；与高剂量补肺活血组比较，补肺活血+3-MA组小鼠肺组织p-mTOR/mTOR、P62蛋白表达均升高 ($P<0.05$)，LC3-II/LC3-I、Beclin1蛋白表达均降低 ($P<0.05$, $P<0.01$)。

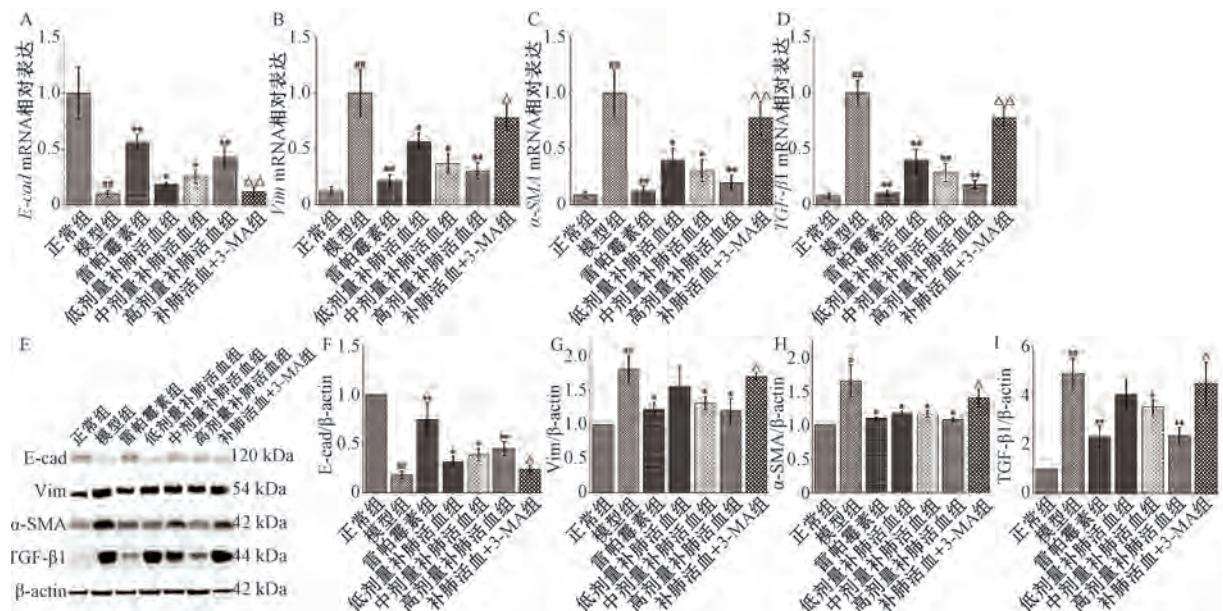
4 讨论

BLM是轮生链霉菌中提取的一种抗癌药物，其主要的毒副作用是导致肺纤维化，BLM肺纤维化模型与人肺纤维化相似，因此被广泛应用于肺纤维化动物模型建立^[12]。本研究通过BLM建立PF模型小鼠，发现模型组小鼠生存率降低，存活的PF小鼠体质量降低，肺组织湿干重比、BALF总细胞数和总蛋白含量、羟脯氨酸水平均升高，肺部呈现纤维化病变；雷帕霉素与补肺活血胶囊给药后，以上指标均得以改善，肺纤维化进程缓解；3-MA可逆转补肺



注：A为HE和Masson染色，其中红色箭头指示增厚的肺泡壁，黑色箭头指示胶原纤维；B为HE评分；C为Masson评分，D为羟脯氨酸水平。与正常组比较，[#] $P<0.01$ ；与模型组比较，^{*} $P<0.05$ ，^{**} $P<0.01$ ；与高剂量补肺活血组比较，[△] $P<0.05$ ，^{△△} $P<0.01$ 。

图3 补肺活血胶囊对PF小鼠肺组织病理损伤的影响 ($\times 100$, $\bar{x} \pm s$, $n=6\sim 15$)



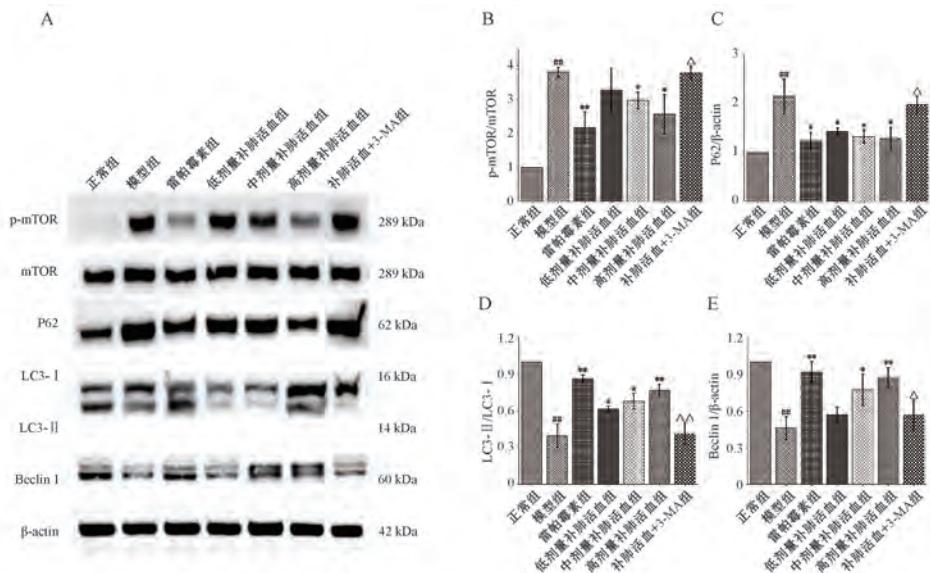
注：A~D分别为E-cad、Vim、 α -SMA、TGF- β 1 mRNA表达，E为蛋白条带，F~I分别为E-cad、Vim、 α -SMA、TGF- β 1蛋白表达。与正常组比较，[#] $P<0.05$ ，^{##} $P<0.01$ ；与模型组比较，^{*} $P<0.05$ ，^{**} $P<0.01$ ；与高剂量补肺活血组比较，[△] $P<0.05$ ，^{△△} $P<0.01$ 。

图4 补肺活血胶囊对PF小鼠肺组织EMT相关因子表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=6\sim 15$)

活血胶囊的作用，使肺部纤维化病变加剧。

EMT是上皮细胞表型的转变，伴随着上皮细胞标记物的消失和间质细胞特征的出现，在各种损伤刺激下分化的上皮细胞经过表型转化可形成大量的成纤维细胞以及肌成纤维细胞，而肌成纤维细胞则可以通过细胞外基质

(ECM)的过度积累促进PF的发展^[13]。在EMT过程中，上皮细胞基因表达受到抑制导致上皮细胞标记物如E-cad蛋白表达减少，间质细胞基因表达激活导致间质细胞标记物如Vim、 α -SMA蛋白表达增加^[14]。TGF- β 1是ECM过度积累、成纤维细胞增殖和分化为肌成纤维细胞的主要诱导



注: A 为蛋白条带, B~E 分别为 p-mTOR/mTOR、P62、LC3-II/LC3-I、Beclin1 蛋白表达。与正常组比较, **P<0.01; 与模型组比较, *P<0.05, **P<0.01; 与高剂量补肺活血组比较, △P<0.05, △△P<0.01。

图 5 补肺活血胶囊对 PF 小鼠肺组织自噬相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=6 \sim 15$)

剂, 即肺纤维化中诱导 EMT 发的关键因子, 抑制 TGF- β 1 的表达可改善 EMT 的发展^[15-16]。本研究发现, 补肺活血胶囊干预后可提高 PF 小鼠肺组织 E-cad 表达, 降低 Vim、 α -SMA、TGF- β 1 表达, 表明补肺活血胶囊可通过抑制 PF 小鼠 EMT 减轻其 PF 进程。

除了 EMT 以外, 自噬对 PF 的发展也有着关键而复杂的调节作用^[17]。自噬是细胞对氧化应激或导致受损蛋白质或细胞器堆积的一种主要防御, 与细胞凋亡关系紧密^[18]。自噬功能维持着细胞平衡, 受损和过度激活都会对其产生负面影响, 并导致 PF 病理的发展^[19-20]。研究表明, 激活自噬可以通过抑制肺上皮细胞 EMT 来改善 BLM 诱导的 PF^[21]。自噬缺陷则会导致 α -SMA 过量表达并且增加 ECM 的沉积^[22]。已有研究发现, IL-37 可以通过增强自噬和抑制 TGF- β 1 诱导的 PF 炎症, 减少肺纤维细胞的增殖, 从而达到抗纤维化的作用^[23]。以上研究表明, 通过调控自噬可干预 PF 的进程。Beclin1 是一种自噬的重要启动蛋白, 可促进自噬膜的延伸, 进而使 LC3-I 与磷脂酰乙醇胺结合转化为 LC3-II, 推动自噬体的延伸和闭合; 之后 LC3-II 与 P62 在自噬小体中结合, 最终形成自噬泡, 与溶酶体融合^[24]。P62 是一种泛素连接酶, 与 LC3-II 结合后会发生降解, 其水平的增加提示自噬流受阻, 抑制 P62 并增加 LC3-II 与 Beclin1 表达表明自噬水平升高^[25]。mTOR 是一种丝氨酸/苏氨酸激酶, 参与细胞增殖、自噬、蛋白质合成和代谢等多种生物过程, 抑制 mTOR 表达可以促进自噬^[26]。本研究发现, 雷帕霉素与补肺活血胶囊干预后, PF 小鼠肺组织中 LC3-II/LC3-I 及 Beclin1 表达升高, p-mTOR/mTOR、P62 表达降低, 表明补肺活血可以促进保护性自噬来改善 BLM 诱导的小鼠肺损伤。

研究表明, 雷帕霉素可通过抑制 mTOR 激活自噬, 减

轻炎症因子和氧化应激损伤, 保护脂多糖诱导的急性肺损伤^[27]。3-MA 是一种常用的自噬抑制剂, 研究表明, 5 mmol/L 3-MA 可显著抑制 A549 细胞自噬^[28]。因此, 本研究选取雷帕霉素作为阳性对照, 并在补肺活血干预的同时加入自噬抑制剂 3-MA, 验证补肺活血胶囊通过激活自噬、抑制 EMT 发挥治疗 PF 的作用。结果显示补肺活血胶囊与雷帕霉素均能激活自噬并抑制 TGF- β 1 诱导的 EMT 过程。此外, 3-MA 干预后, 补肺活血胶囊对 TGF- β 1 诱导的 EMT 作用及对自噬的作用减弱, 证明了促进自噬是补肺活血胶囊抑制上皮细胞 EMT 的主要途径。

综上所述, 补肺活血胶囊可改善 PF 小鼠肺纤维化, 这主要与促进上皮细胞自噬并抑制 EMT 有关。本研究表明调控自噬可以成为一种 PF 治疗的新思路, 并且揭示了补肺活血胶囊是一种治疗 PF 的潜在药物。

参考文献:

- Hettiarachchi S U, Li Y H, Roy J, et al. Targeted inhibition of PI3 kinase/mTOR specifically in fibrotic lung fibroblasts suppresses pulmonary fibrosis in experimental models [J]. *Sci Transl Med*, 2020, 12(567): eaay3724.
- Yu D, Xiang Y, Gou T, et al. New therapeutic approaches against pulmonary fibrosis [J]. *Bioorg Chem*, 2023, 138: 106592.
- 周世琴, 骆亚莉, 张秋菊, 等. 益气养阴活血方对肺纤维化大鼠 TGF- β 1、Smad3、MMP9 及 TIMP1 表达的影响 [J]. 中国中医药信息杂志, 2023, 30(6): 100-105.
- 张 喆, 赵 舒, 韩云鹏, 等. 补阳还五汤对特发性肺纤维化大鼠 Keap1/Nrf2/HO-1 抗氧化信号通路的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(17): 9-16.
- Du W, Zhang T, Yang F, et al. Endocannabinoid signalling/

- cannabinoid receptor 2 is involved in icariin-mediated protective effects against bleomycin-induced pulmonary fibrosis [J]. *Phytomedicine*, 2022, 103; 154187.
- [6] Du W, Tang Z, Yang F, et al. Icariin attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis by targeting Hippo/YAP pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 143; 112152.
- [7] 张俊华, 张伯礼. 感染性疾病的挑战与中医药替代研究[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(8): 1415-1417.
- [8] 敬岳, 唐诗环, 金津, 等. 补肺活血胶囊对颗粒物致小鼠肺纤维化样变的影响[J]. 世界中西医结合杂志, 2017, 12(6): 774-778.
- [9] 孟泳, 贺启萌, 任璐璐. 补肺活血胶囊治疗特发性肺纤维化的临床研究[J]. 中国临床医生杂志, 2020, 48(8): 995-997.
- [10] Szapiel S V, Elson N A, Fulmer J D, et al. Bleomycin-induced interstitial pulmonary disease in the nude, athymic mouse [J]. *Am Rev Respir Dis*, 1979, 120(4): 893-899.
- [11] Hübner R H, Gitter W, El Mokhtari N E, et al. Standardized quantification of pulmonary fibrosis in histological samples [J]. *Biotechniques*, 2008, 44(4): 507-511.
- [12] 陶章, 李惠萍. 不同剂量博莱霉素致小鼠肺纤维化模型的比较[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2009, 13(7): 1214-1218.
- [13] Lamouille S, Xu J, Deryck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014, 15(3): 178-196.
- [14] Deryck R, Muthusamy B P, Saeteurn K Y. Signaling pathway cooperation in TGF- β -induced epithelial-mesenchymal transition [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2014, 31: 56-66.
- [15] Mi S, Li Z, Yang H Z, et al. Blocking IL-17A promotes the resolution of pulmonary inflammation and fibrosis via TGF- β 1-dependent and -independent mechanisms [J]. *J Immunol*, 2011, 187(6): 3003-3014.
- [16] Varga J, Pasche B. Antitumor growth factor- β therapy in fibrosis: recent progress and implications for systemic sclerosis [J]. *Curr Opin Rheumatol*, 2008, 20(6): 720-728.
- [17] Mizumura K, Cloonan S, Choi M E, et al. Autophagy: Friend or foe in lung disease? [J]. *Ann Am Thorac Soc*, 2016, Suppl 1(Suppl 1): S40-S47.
- [18] Booth L A, Tavallai S, Hamed H A, et al. The role of cell signalling in the crosstalk between autophagy and apoptosis [J]. *Cell Signal*, 2014, 26(3): 549-555.
- [19] Kim K H, Lee M S. Autophagy—A key player in cellular and body metabolism [J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2014, 10(6): 322-337.
- [20] Ornatowski W, Lu Q, Yegambaram M, et al. Complex interplay between autophagy and oxidative stress in the development of pulmonary disease [J]. *Redox Biol*, 2020, 36: 101679.
- [21] 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.
- [22] Patel A S, Lin L, Geyer A, et al. Autophagy in idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *PLoS One*, 2012, 7(7): e41394.
- [23] Kim M S, Baek A R, Lee J H, et al. IL-37 attenuates lung fibrosis by inducing autophagy and regulating TGF- β 1 production in mice [J]. *J Immunol*, 2019, 203(8): 2265-2275.
- [24] Zhao Y, Feng X, Li B, et al. Dexmedetomidine protects against lipopolysaccharide-induced acute kidney injury by enhancing autophagy through inhibition of the PI3K/AKT/mTOR pathway [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 128.
- [25] 黄亚光, 王金凤, 杜利鹏, 等. 葛根素调节 AMPK-mTOR 信号通路抑制自噬改善大鼠脑缺血再灌注损伤研究[J]. 中草药, 2019, 50(13): 3127-3133.
- [26] Sun X, Wang D, Zhang T, et al. Eugenol attenuates cerebral ischemia-reperfusion injury by enhancing autophagy via AMPK-mTOR-P70S6K pathway [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 84.
- [27] 佟雪超, 邵美琪, 陈达. 雷帕霉素对脂多糖诱导急性肺损伤的保护作用及可能机制研究[J]. 解剖科学进展, 2021, 27(4): 421-424.
- [28] Zhang L, Dai F, Sheng P L, et al. Resveratrol analogue 3, 4, 4'-trihydroxy-trans-stilbene induces apoptosis and autophagy in human non-small-cell lung cancer cells *in vitro* [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2015, 36(10): 1256-1265.