

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2022.21.014

肺痹汤 2 号对肺纤维化模型小鼠肺组织 ROS/Hippo/YAP 信号通路的影响

庞庆禄¹, 李国栋², 曹芳³, 刘浩歌¹, 韦婉³, 焦扬³✉

1. 北京中医药大学, 北京市朝阳区北三环东路 11 号, 100029; 2. 北京昌平中西医结合医院; 3. 北京中医药大学东方医院

[摘要] **目的** 探讨肺痹汤 2 号治疗特发性肺纤维化的可能分子机制。**方法** 将 40 只雄性 C57BL/6 小鼠随机分为空白组、模型组、肺痹汤 2 号组和吡非尼酮组, 每组 10 只。除空白组外, 其余各组小鼠采用气管滴注博来霉素建立肺纤维化动物模型。造模第 2 天开始, 吡非尼酮组予以吡非尼酮 270.3 mg/(kg·d) 灌胃, 肺痹汤 2 号组予以肺痹汤 2 号 21.02 g/(kg·d) 灌胃, 空白组和模型组予 10 ml/kg 生理盐水灌胃, 各组均每日灌胃 1 次, 共 14 天。各组小鼠肺组织采用 HE 染色以及 Masson 染色评估肺组织炎症损伤和纤维化程度, 免疫组化观察肺组织 I 型胶原 (Col I) 表达, 化学发光法检测肺组织活性氧 (ROS) 水平, 检测肺组织氧化应激相关指标 [包括丙二醛 (MDA)、总抗氧化能力 (T-AOC)、超氧化物歧化酶 (SOD)] 水平, Western blot 法检测肺组织大肿瘤抑制基因 1 蛋白 (LATS1)、磷酸化大肿瘤抑制基因 1 蛋白 (p-LATS1)、Yes 相关蛋白 (YAP)、磷酸化 Yes 相关蛋白 (p-YAP) 水平。**结果** HE 染色、Masson 染色、免疫组化结果显示, 空白组小鼠肺组织结构正常, 胶原沉积不明显; 模型组小鼠肺组织可见肺泡腔塌陷甚至闭合, 有明显的炎症细胞浸润和大量 Col I 沉积。与模型组相比, 肺痹汤 2 号组和吡非尼酮组小鼠肺组织结构明显改善, 炎症及胶原沉积明显减轻, Col I 水平亦降低。与空白组比较, 模型组、肺痹汤 2 号组和吡非尼酮组血清 MDA、ROS 以及 YAP 水平显著升高 ($P<0.05$), T-AOC、SOD、LATS1、p-LATS1 以及 p-YAP 水平显著降低 ($P<0.05$); 与模型组相比, 肺痹汤 2 号组和吡非尼酮组 MDA、ROS 以及 YAP 水平显著降低 ($P<0.05$), T-AOC、SOD 活性、LATS1、p-LATS1 以及 p-YAP 水平显著升高 ($P<0.05$)。**结论** 肺痹汤 2 号可能通过调控肺组织 ROS/Hippo/YAP 信号通路来改善特发性肺纤维化。

[关键词] 特发性肺纤维化; 肺痹汤 2 号; 氧化应激; 博来霉素; ROS/Hippo/YAP 信号通路

特发性肺纤维化 (idiopathic pulmonary fibrosis, IPF) 是一种慢性致死性疾病, 可导致患者肺功能进行性下降并最终引起呼吸衰竭。目前, 肺移植是治疗本病最有效的方法, 但由于肺组织供体不足以及术后免疫排斥等原因, 肺移植在临床治疗中未能得到广泛应用。尼达尼布和吡非尼酮是美国食品和药物管理局有条件推荐用于治疗 IPF 的两种药物^[1], 但由于价格昂贵和一些副作用, 在临床应用中受到一定限制^[2-3]。周平安教授认为, IPF 属于中医学“肺痹”范畴, 其病机不离痰、热、瘀、虚, 并创立了肺痹汤, 用于治疗 IPF, 疗效显著^[4]。

本课题组认为, 气虚血瘀贯穿了 IPF 的全过程, 而热毒之邪是病情进展的重要因素。因此, 在肺痹汤基础上进行加减化裁, 创立了具有益气活血、清热解毒功效的肺痹汤 2 号。前期研究^[5-6]表明, 肺痹汤 2 号能够改善二氧化硫引起的肺组织氧化应激和纤维化。近年来有研究显示, Hippo/YAP 通路与肺纤维化具有相关性^[7], 博来霉素诱导的小鼠肺纤维化可通过下调 Yes 相关蛋白 (YAP) 的表达而减轻^[8]。另外, 氧化应激一直被认为是肺纤维化的主要机制之一, 而活性氧 (ROS) 是氧化应激的关键因素, ROS 可通过抑制 Hippo 信号通路促进 YAP 在细胞中的积累, 进而诱导细胞增殖^[9-10]。因此, 本研究通过博来霉素诱导 C57BL/6 小鼠产生肺纤维化

基金项目: 北京市自然科学基金 (7202118)

✉ 通讯作者: yangjiao2013@sina.cn

建立动物模型,以吡非尼酮作为对照,观察肺痹汤2号对肺纤维化模型小鼠组织病理变化、氧化应激和ROS/Hippo/YAP信号通路的影响,探讨肺痹汤2号治疗肺纤维化的可能作用机制。本研究通过北京中医药大学医学与实验动物伦理委员会批准(编号:BUCM-4-2021030105-1033)。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF级雄性C57BL/6小鼠40只,周龄7~8周,体质量18~20 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,实验动物生产许可证编号:SYXK(京)2016-0006。饲养于北京中医药大学动物实验室的SPF级隔离设施中,环境温度20~25℃,相对湿度60%~70%,12 h/12 h明暗周期,自由饮水与进食。适应性喂养7天后进行实验研究。

1.2 药品与试剂

肺痹汤2号组成:黄芪、红景天、黄芩、金银花、丹参、甘草,药物比例为3:3:3:2:2:1,每剂生药总重量为140 g,饮片由北京中医药大学东方医院中药制剂室配制成浓度为2.102 g/ml的溶液。吡非尼酮胶囊购自北京康蒂尼药业有限公司,规格为100 mg/粒,批号:H20133376,配制成浓度为27.03 mg/ml的溶液。

1.3 主要试剂及仪器

总抗氧化能力(T-AOC,货号:A015-2-1)、丙二醛(MDA,货号:A003-1-2)、超氧化物歧化酶(SOD,货号:A001-1-2)和ROS(货号:E004)试剂盒,南京建成生物工程研究所;I型胶原(Col I)抗体(批号:AF7001)、大肿瘤抑制基因1蛋白(LATS1)抗体(批号:AF7669)、YAP抗体(批号:DF3182)、磷酸化Yes相关蛋白(p-YAP)抗体(批号:AF3328),江苏亲科生物科学生物研究中心有限公司;磷酸化大肿瘤抑制基因1蛋白(p-LATS1)抗体(批号:bs-3246R),北京生物科技有限公司;博来霉素冻干粉(15 U/瓶,批号:6115292,1 U=1 mg),德国费森尤斯卡比公司;4%多聚甲醛固定液(货号:P1110),北京索莱宝科技有限公司;苏木素染液(货号:ZLI-9610)、伊红染液(货号:ZLI-9613)、Masson三色染色液(货号:BSBA-4079B)、柠檬酸钠抗原修复液(货号:ZLI-9065)、DBA试剂盒(货号:ZLI-9017),北京中杉金桥生物技术有限公司;5%BSA封闭液(货号:AR0004),武汉博士德生物工程有

限公司;裂解液(货号:MD912016)、BCA试剂盒(货号:MD913053),MDL公司;异氟烷(货号:9700022800),沃瑞德科技有限公司;丙二醇(货号:30157018),国药集团药业有限公司。

RM2135石蜡切片机、ASP-300自动脱水机、HI1220烤片台、G1150H加热石蜡包埋系统、DM3000正置荧光显微镜,德国LEICA公司;KH-LQ3500冰冻切片机(阔海医疗科技有限公司);NanoDrop™ Lite分光光度计(美国Thermo Fisher Scientific);HWS-24电热恒温水浴槽(上海一恒恒温设备厂);BG-subMIDI电泳仪(北京百晶生物技术有限公司);3-30K低温离心机(德国Sigma公司);SDS-PAGE电泳系统(美国Bio-Rad公司);凝胶成像系统(美国UVP公司);化学发光成像系统(中国勤翔科学仪器有限公司)。

1.4 动物分组与造模

将40只小鼠采用随机数字表法分为空白组、模型组、肺痹汤2号组和吡非尼酮组,每组10只。适应性喂养结束后,模型组、肺痹汤2号组和吡非尼酮组用博来霉素气管滴注建立肺纤维化动物模型^[11]:使用丙二醇和异氟烷体积比2:3混合配置麻药,于自制装置对小鼠行吸入麻醉。当小鼠呼吸状态由急促转变为深慢时,将麻醉后的小鼠上齿迅速悬挂于设置好的细线上,令其身体垂直于地面,用弯镊拽出其舌体,并向气管内快速滴入博来霉素生理盐水溶液(2 U/kg)。然后保持直立状态片刻,待小鼠将药物吸至肺内,取下小鼠,旋转3~5次,使博来霉素尽可能均匀地分布肺中。完成操作后将小鼠放回鼠笼,待自然苏醒。以肺组织HE和Masson染色切片显示肺组织结构破坏以及大量胶原纤维沉积提示造模成功^[11]。空白组予以等量生理盐水器官滴注。

1.5 给药方法

造模第2天开始给药。依据人和小鼠的药物剂量换算公式(人:小鼠=1:9.01)^[12],吡非尼酮组予以吡非尼酮270.3 mg/(kg·d)灌胃,每日1次;肺痹汤2号组予以肺痹汤2号21.02 g/(kg·d)灌胃,每日1次。空白组和模型组予以10 ml/kg生理盐水灌胃,每日1次。各组均灌胃14天。

1.6 观察指标及方法

给药结束后第2天进行组织采集。小鼠吸入麻醉后,摘眼球取血。血液4℃、3000 r/min(半径8.5 cm)离心10 min。离心后,分离血清保存于-20℃冰箱中备用。然后,脱颈椎法处死小鼠,取

肺组织。其中，左肺浸泡于 4% 多聚甲醛中固定，用于制作石蜡切片。右肺组织一部分用于制作冰冻切片，另一部分液氮速冻后， -80°C 保存。

1.6.1 肺组织形态学检测 肺组织于 4% 多聚甲醛中固定后，进行常规脱水、石蜡包埋及切片，用于 HE 染色及 Masson 染色。切片染色后于镜下观察，评估肺组织形态结构、炎症浸润以及纤维化程度。

1.6.2 免疫组化观察肺组织 Col I 水平 石蜡切片脱蜡和复水后，放入柠檬酸钠抗原修复液中修复抗原。切片经过 3% H_2O_2 孵育后，添加 5% BSA 进行反应。然后经封闭液稀释后的一抗（1:500）、二抗（1:500）处理后，加入显色剂显色，复染。脱水、脱酒精和透明化处理后，加入中性树胶封片，并在显微镜下观察。

1.6.3 氧化应激指标检测 取肺组织，在 $0\sim 4^{\circ}\text{C}$ 条件下研磨，制成肺组织匀浆。匀浆液在 4°C 、12 000 r/min（半径 8.5 cm）离心 5 min 后取上清液，用于检测 SOD 活性和 MDA 含量。小鼠血清检测 T-AOC 水平，操作过程严格依据试剂盒说明书进行操作，依据标准曲线，根据样品相应 OD 值，计算结果。

1.6.4 肺组织 ROS 化学荧光检测 肺组织在冰冻切片机上制作冰冻切片后，滴加 4% 的多聚甲醛，于冰上固定 15 min。PBS 冲洗后，滴加封闭液，封闭 60 min。滴加 DCFH-DA 探针（1:500 稀释）孵育 60 min。经 PBS 冲洗后，滴加甘油封片，于共聚焦显微镜下观察并拍照。使用 Image pro plus 6.0 图像分析软件检测各组荧光强度。

1.6.5 Western blot 法检测肺组织 LATS1、p-LATS1、YAP、p-YAP 水平 各组采用随机数字表选取 3 只小鼠，称取适量肺组织，充分研磨并加入裂解液制成匀浆。冰浴后，在 4°C 、12 000 r/min（半径 8.5 cm）离心 5 min，取上清液。BCA 蛋白定量法测量上清液蛋白浓度。然后制备 SDS-PAGE 凝胶，进行电泳、转膜、免疫反应、显色、成像。使用 Image

pro plus 6.0 图像分析软件，分析图像灰度值。

1.7 统计学方法

使用 R 4.1.0 软件对数据进行统计分析。本研究数据均满足正态分布且方差齐，采用均值 $\pm$ 标准差（ $\bar{x}\pm s$ ）进行描述统计，多组间比较采用单因素方差分析，两两比较采用 HSD 检验。以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

在饲养过程中，模型组死亡 2 只小鼠，吡非尼酮组和肺痹汤 2 号组各死亡 1 只。因此，除模型组外，每组采用随机数字表法选取 8 只小鼠进行统计。

2.1 各组小鼠肺组织 HE 染色结果比较

图 1 示，空白组小鼠肺组织结构正常，肺泡结构完整清晰，无明显炎症细胞浸润表现。与空白组相比，模型组、肺痹汤 2 号组和吡非尼酮组小鼠肺组织可见肺泡间隔增宽，肺泡腔塌陷甚至闭合，肺组织可见明显的炎症细胞浸润。与模型组相比，肺痹汤 2 号组和吡非尼酮组小鼠肺组织结构明显改善，炎症明显减轻。

2.2 各组小鼠肺组织 Masson 染色结果比较

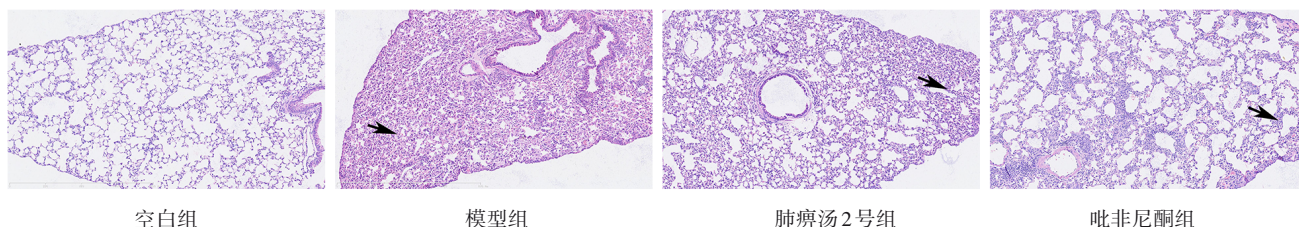
图 2 示，各组小鼠肺组织结构表现与 HE 染色一致。在胶原沉积方面，空白组小鼠胶原沉积并不明显。而模型组则显示出在气道、血管周围以及实变区存在明显的胶原沉积。与模型组相比，肺痹汤 2 号组和吡非尼酮组小鼠肺组织胶原沉积明显减轻。

2.3 各组小鼠肺组织 Col I 水平比较

图 3 示，与空白组相比，模型组显示大量 Col I 沉积，主要分布在实变区。与模型组相比，肺痹汤 2 号组和吡非尼酮组小鼠肺组织 Col I 水平明显降低。

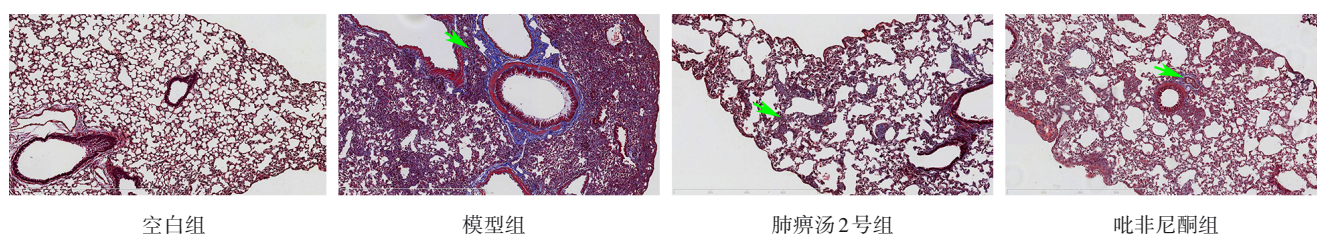
2.4 各组小鼠氧化应激相关指标比较

表 1 示，与空白组相比，模型组、肺痹汤 2 号组和吡非尼酮组小鼠肺组织 MDA 水平显著升高，肺组织 SOD 活性和血清 T-AOC 水平显著降低（ $P<0.05$ ）。与模型组相比，吡非尼酮组和肺痹汤 2 号



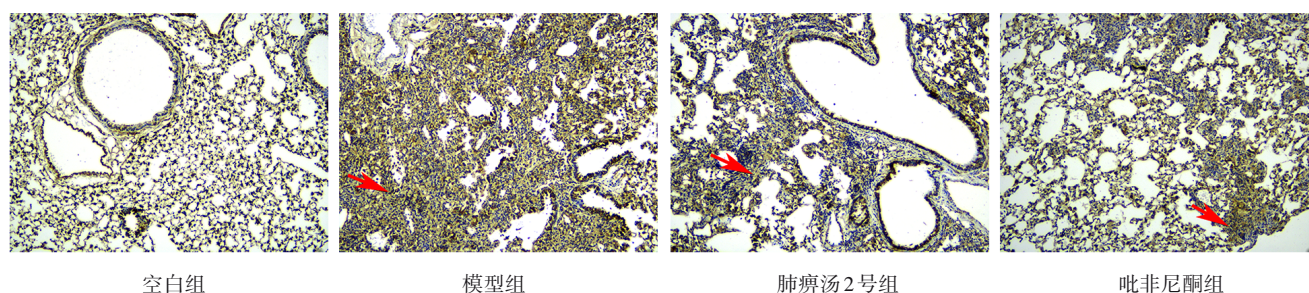
注：黑色箭头指示肺泡间隔增宽。

图 1 各组小鼠肺组织 HE 染色结果（ $\times 100$ ）



注：绿色箭头指示胶原沉积部位。

图2 各组小鼠肺组织 Masson 染色结果 (×100)



注：红色箭头指示 Col I 沉积部位。

图3 各组小鼠肺组织 Col I 表达水平 (免疫组化, ×100)

组肺组织MDA水平显著降低,肺组织SOD活性和血清T-AOC水平显著升高 ($P<0.05$)。与吡非尼酮组相比,肺痹汤2号组小鼠肺组织SOD活性水平显著升高 ($P<0.05$)。

表1 各组小鼠氧化应激相关指标水平比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	MDA/ nmol·mgprot ⁻¹	SOD活性/ U·mgprot ⁻¹	T-AOC/ pg·ml ⁻¹
空白组	8	45.77±4.26	66.72±1.37	0.44±0.02
模型组	8	78.24±3.69 ^{a)}	31.10±2.12 ^{a)}	0.23±0.01 ^{a)}
肺痹汤2号组	8	54.17±3.76 ^{a)b)}	48.65±2.38 ^{a)b)}	0.38±0.02 ^{a)b)}
吡非尼酮组	8	52.29±4.83 ^{a)b)}	52.08±1.99 ^{a)b)c)}	0.37±0.03 ^{a)b)}

注:MDA,丙二醛;SOD,超氧化物歧化酶;T-AOC,总抗氧化能力。

a) 与空白组比较, $P<0.05$; b) 与模型组比较, $P<0.05$; c) 与吡非尼酮组比较, $P<0.05$ 。

2.5 各组小鼠肺组织 ROS 荧光强度比较

表2、图4示,与空白组相比,模型组、肺痹汤2号组和吡非尼酮组小鼠肺组织ROS水平升高 ($P<0.05$)。与模型组相比,肺痹汤2号组和吡非尼酮组小鼠肺组织ROS水平显著降低 ($P<0.05$)。

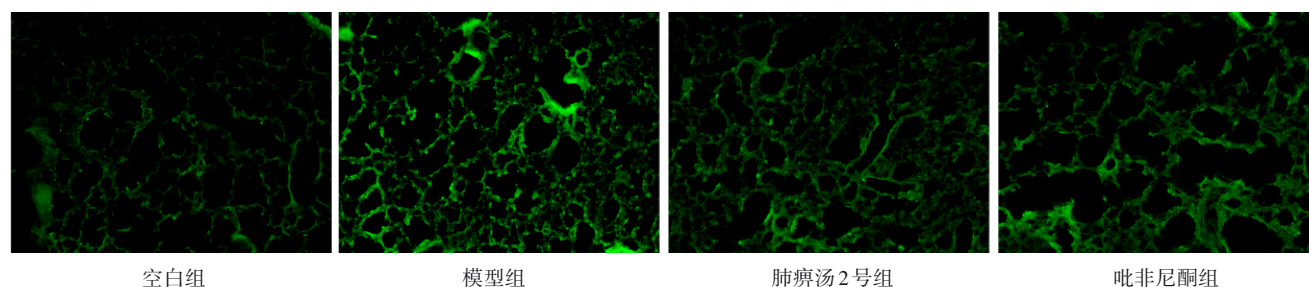


图4 各组小鼠肺组织 ROS 分子水平化学荧光法检测结果 (×100)

肺痹汤2号组和吡非尼酮组小鼠肺组织ROS水平差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

表2 各组小鼠肺组织 ROS 荧光强度比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	ROS
空白组	8	0.05±0.01
模型组	8	0.22±0.03 ^{a)}
肺痹汤2号组	8	0.11±0.01 ^{a)b)}
吡非尼酮组	8	0.11±0.02 ^{a)b)}

注:ROS,活性氧。

a) 与空白组比较, $P<0.05$; b) 与模型组比较, $P<0.05$ 。

2.6 各组小鼠肺组织 LATS1、p-LATS1、YAP、p-YAP 蛋白表达比较

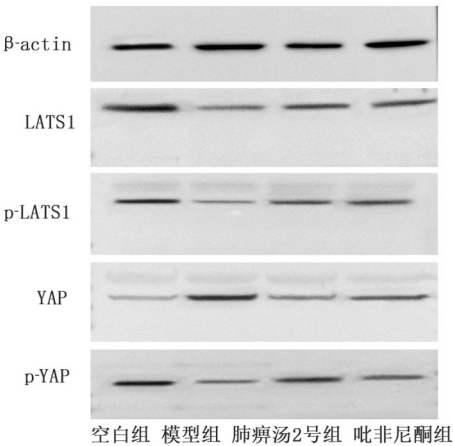
表3示,与空白组相比,模型组、肺痹汤2号组和吡非尼酮组小鼠肺组织YAP水平显著升高, LATS1、p-LATS1以及p-YAP水平显著降低 ($P<0.05$)。与模型组相比,肺痹汤2号组和吡非尼酮组小鼠肺组织YAP水平显著降低, LATS1、p-LATS1以及p-YAP水平显著升高 ($P<0.05$)。肺痹汤2号组和吡非尼酮组小鼠肺组织YAP、LATS1、

表3 各组小鼠肺组织 LATS1、p-LATS1、YAP、p-YAP 蛋白表达比较

组别	鼠数	LATS1	p-LATS1	YAP	p-YAP
空白组	3	0.89±0.08	0.72±0.06	0.29±0.03	0.91±0.02
模型组	3	0.32±0.01 ^{a)}	0.33±0.04 ^{a)}	0.94±0.13 ^{a)}	0.35±0.02 ^{a)}
肺痹汤2号组	3	0.48±0.04 ^{a) b)}	0.58±0.03 ^{a) b)}	0.52±0.04 ^{a) b)}	0.65±0.05 ^{a) b)}
吡非尼酮组	3	0.46±0.03 ^{a) b)}	0.57±0.04 ^{a) b)}	0.69±0.09 ^{a) b)}	0.57±0.03 ^{a) b)}

注：LATS1，大肿瘤抑制基因1蛋白；p-LATS1 磷酸化大肿瘤抑制基因1蛋白；YAP，Yes 相关蛋白；p-YAP，磷酸化Yes 相关蛋白。
a) 与空白组比较， $P<0.05$ ；b) 与模型组比较， $P<0.05$ 。

p-LATS1 以及 p-YAP 水平差异无统计意义 ($P>0.05$)。各组小鼠肺组织 LATS1、p-LATS1、YAP、p-YAP 蛋白电泳图见图5。



注：LATS1，大肿瘤抑制基因1蛋白；p-LATS1 磷酸化大肿瘤抑制基因1蛋白；YAP，Yes 相关蛋白；p-YAP，磷酸化Yes 相关蛋白。

图5 各组小鼠肺组织 LATS1、p-LATS1、YAP 和 p-YAP 蛋白电泳图

3 讨论

根据其临床表现 IPF 可归属为中医学“肺痹”“肺萎”“喘证”等范畴。本病病机较为复杂，但总不离“虚、瘀、痰、热”，其中又以“虚”为本，“痰、热、瘀”为标。肺气虚弱，血行瘀滞，又逢热毒之邪客肺，正不胜邪，肺络为热毒之邪所伤，血行脉外，化为血瘀，阻闭气机，肺气不利，肺失宣降，津液不布，停积于肺，又为热邪煎熬，化为痰浊；痰瘀互结，痹阻肺络，日久又郁而化热，痰热瘀交结，进一步损伤正气，形成恶性循环，导致肺功能进行性下降，最终引起呼吸衰竭。因此，益气活血、清热解毒应为治疗 IPF 的基本原则。肺痹汤2号方中黄芪甘温，补益肺气；红景天补益肺气、活血化瘀，与黄芪相合补益肺气，固本培元，共为君药。金银花甘而性寒，清热解毒；黄芩苦而性寒，善清肺中火毒，与金银花相伍，祛除外来邪毒，清泄肺中郁热，共为臣药；丹参苦而微寒，善

活血通经，为佐药；甘草甘而性平，清热解毒、调和诸药，既可助黄芪补益肺气，又助金银花、黄芩清泄肺热，还可调和诸药，为佐使药。全方共奏益气活血、清热解毒之功。本研究 HE 和 Masson 染色结果显示，模型组出现明显肺组织结构破坏、炎症细胞浸润和胶原沉积，说明本研究模型建立成功。与模型组相比，肺痹汤2号组以及吡非尼酮组肺组织病变情况明显好转，提示肺痹汤2号具有抑制博来霉素诱导的小鼠肺纤维化的作用。Col I 是肺纤维化的主要病理产物之一^[13]，免疫组化结果提示，肺痹汤2号组明显抑制 Col I 的产生，进一步肯定了肺痹汤2号抗纤维化的作用。另外，肺痹汤2号与吡非尼酮对博来霉素诱导的肺组织结构破坏以及胶原沉积的改善作用相近，提示肺痹汤2号与吡非尼酮具有相似的抗纤维化的作用。

目前 IPF 发病机制尚不清楚，氧化应激被认为是 IPF 的发病机制之一，而 ROS 在氧化应激过程中起着重要作用^[14-15]。研究显示，ROS 可诱导细胞膜性结构脂质过氧化产生 MDA，引起膜性结构损伤^[16]；T-AOC 反映了机体抗氧化能力的总体水平，SOD 则是细胞内清除 ROS 的重要的抗氧化酶^[17-18]。在博来霉素诱导的肺纤维化动物模型中，肺组织 MDA、ROS 升高，血清 T-AOC、肺组织 SOD 活力降低^[19-21]。ROS 可以促进肺成纤维细胞的活化和增殖，在肺纤维化的发生发展中起着重要作用^[22]。Hippo 信号通路参与调节细胞增殖^[23]。Hippo 信号通路的核心激酶包括 STE20 样蛋白激酶 (MST1/2) 和 LATS1/2^[24]。YAP 是 Hippo 途径的主要下游效应分子，其可与 TEA 结构域家族成员 (TEAD) 结合，并作用于相应的靶基因，促进细胞增殖^[25]。当 Hippo 信号通路被激活时，MST1/2 和 LATS1/2 将构成激酶级联，将 YAP 磷酸化，并使其滞留在细胞质而被降解^[26]。基于这个过程，细胞增殖被限制在一定的范围内^[27]。本研究结果表明，肺痹汤2号可上调血清 T-AOC 以及肺组织 SOD 活性水平，下调肺组织 MDA 分子水平，提示肺痹汤2号具有

抑制氧化应激的作用。此外, SOD 活性水平结果显示吡非尼酮对 SOD 活性的改善优于肺痹汤 2 号, 但两组在血清 T-AOC 以及肺组织 MDA 水平上并无明显差异, 这提示肺痹汤 2 号可能通过提高 SOD 活性以外的途径改善氧化应激。ROS/Hippo/YAP 信号通路相关分子结果显示, 肺痹汤 2 号与吡非尼酮均可降低肺组织 ROS 及 YAP 水平, 升高 LATS1、p-LATS1 及 p-YAP 水平, 且这两组并无显著差异, 说明肺痹汤 2 号和吡非尼酮在调控 ROS/Hippo/YAP 信号通路上具有相似的作用。

综上所述, 肺痹汤 2 号可能通过调控 ROS/Hippo/YAP 信号通路改善博来霉素诱导的小鼠肺纤维化。后续将通过细胞实验探讨其对成纤维细胞的作用, 来进一步揭示其潜在的抗纤维化机制。

参考文献

- [1]王潇,岳红梅,王若利,等. 吡非尼酮对结缔组织病相关间质性肺疾病的治疗进展[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2020, 25(5): 584-590.
- [2]LEE JS, COLLARD HR, ANSTROM KJ, et al. Anti-acid treatment and disease progression in idiopathic pulmonary fibrosis: an analysis of data from three randomised controlled trials [J]. *Lancet Respir Med*, 2013, 1 (5): 369-376.
- [3]RYERSON CJ, KOLB M, RICHELDI L, et al. Effects of nintedanib in patients with idiopathic pulmonary fibrosis by GAP stage [J]. *ERJ Open Res*, 2019, 5 (2): 00127-2018.
- [4]付小芳,吴志松,曹芳,等. 肺痹汤治疗特发性肺间质纤维化 30 例临床观察[J]. 现代中医临床, 2015, 22(4): 26-28.
- [5]吴志松,曹芳,牛洁,等. 肺痹汤 2 号对二氧化硫染毒小鼠肺氧化损伤的影响[J]. 中医杂志, 2018, 59(23): 2043-2046.
- [6]刘艳芳,牛洁,吴志松,等. 肺痹汤 2 号对二氧化硫染毒小鼠肺损伤的干预研究[J]. 环球中医药, 2020, 13(7): 1130-1133.
- [7]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. doi: 10.1016/j.biopha.2021.112152.
- [8]XU W, SONG W, WANG YU, et al. Efficacy of YAP1-gene knockdown to inhibit alveolar-epithelial-cell senescence and alleviate idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) [J]. *Cancer Genom Proteom*, 2021, 18 (3 Suppl): 451-459.
- [9]JEON SA, KIM DW, CHO JY. Neural precursor cell-expressed, developmentally down-regulated 4 (NEDD4) regulates hydrogen peroxide-induced cell proliferation and death through inhibition of Hippo signaling [J]. *FASEB J*, 2019, 33(12): 14772-14783.
- [10]OHSAWA S, SATO Y, ENOMOTO M, et al. Mitochondrial defect drives non-autonomous tumour progression through Hippo signalling in *Drosophila* [J]. *Nature*, 2012, 490(7421): 547-551.
- [11]卢锦辉,张丽,刘子豪,等. 博来霉素诱导小鼠肺纤维化模型的建立及评价[J]. 兰州大学学报(医学版), 2019, 45(6): 37-42.
- [12]施新猷. 医用实验动物学[M]. 西安:陕西科学技术出版社, 1989: 382.
- [13]CUTRONEO KR, WHITE SL, PHAN SH, et al. Therapies for bleomycin induced lung fibrosis through regulation of TGF-beta1 induced collagen gene expression [J]. *J Cell Physiol*, 2007, 211(3): 585-589.
- [14]CHERESH P, KIM SJ, TULASIRAM S, et al. Oxidative stress and pulmonary fibrosis [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1832(7): 1028-1040.
- [15]MARTINS SG, ZILHÃO R, THORSTEINSDÓTTIR S, et al. Linking oxidative stress and DNA damage to changes in the expression of extracellular matrix components [J]. *Front Genet*, 2021, 12: 673002. doi: 10.3389/fgene.2021.673002.
- [16]LIU Y, LU F, KANG L, et al. Pirfenidone attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice by regulating Nrf2/Bach1 equilibrium [J]. *BMC Pulm Med*, 2017, 17(1): 63.
- [17]彭艳芳,张莹雯,张亚兵,等. 紫檀芪通过 TLR4/NF-κB 信号通路对肺纤维化大鼠的保护作用[J]. 武汉大学学报(医学版), 2022, 43(2): 205-209.
- [18]罗娜,孙蔚林,罗成,等. 白藜芦醇对盆腔炎模型大鼠氧化应激和炎症反应的影响[J]. 中国妇产科临床杂志, 2022, 23(2): 196-198.
- [19]林朝展,祝晨蓁,刘方乐,等. 毛翠雀提取物对博来霉素致大鼠肺纤维化的保护作用[J]. 中药材, 2018, 41(5): 1181-1185.
- [20]童佳欢,刘肇恒,龙杞,等. 黄芪甲苷对博来霉素肺纤维化模型小鼠 miR-29b 及其相关因子表达的影响[J]. 环球中医药, 2021, 14(6): 1013-1019.
- [21]胡少丹,仕丽,孙峰,等. 助阳补肺除痹颗粒对肺纤维化大鼠肺组织超氧化物歧化酶活性、丙二醛含量影响的研究[J]. 陕西中医, 2019, 40(6): 683-686.
- [22]ZHOU SY, XIAO W, PAN XJ, et al. Thrombin promotes human lung fibroblasts to proliferate via NADPH oxidase/reactive oxygen species/extracellular regulated

- kinase signaling pathway [J]. Chin Med J (Engl), 2010, 123(17):2432-2439.
- [23] SUN M, SUN Y, FENG Z, et al. New insights into the Hippo/YAP pathway in idiopathic pulmonary fibrosis[J]. Pharmacol Res, 2021, 169: 105635. doi: 10.1016/j.phrs. 2021. 105635.
- [24] 郑志煌, 张志刚, 吴慧娟, 等. Hippo 信号通路及肾病[J]. 临床与病理杂志, 2017, 37(7):1518-1523.
- [25] 王琪, 陈希彦, 文勇. Hippo/YAP 信号通路及细胞增殖相关信号通路交叉作用的研究进展[J]. 国际口腔医学杂志, 2017, 44(5):614-618.
- [26] 陈敬腾, 方硕, 郭卫春. Hippo 信号通路在骨肉瘤中的研究进展[J]. 医学研究杂志, 2019, 48(10):188-191.
- [27] 罗志荣, 韩小晶, 邵水金, 等. Hippo-YAP 信号通路在心脏发育和心肌再生中的作用[J]. 中国老年学杂志, 2017, 37(8):2052-2055.

Effect of *Feibi Decoction* II (肺痹汤 2 号) on ROS/Hippo/YAP Signaling Pathway in Lung Tissue of Pulmonary Fibrosis Model Mice

PANG Qinglu¹, LI Guodong², CAO Fang³, LIU Haoge¹, WEI Wan³, JIAO Yang³

1. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing, 100029; 2. Changping Hospital of Integrated Chinese and Western Medicine; 3. Dongfang Hospital, Beijing University of Chinese Medicine

ABSTRACT **Objective** To explore the possible molecular mechanism of *Feibi Decoction* No. 2 (肺痹汤 2 号, FD-2) in the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis (IPF). **Methods** Forty mice were randomly divided into blank group, model group, FD-2 group and pirfenidone group, with 10 mice in each group. The model of pulmonary fibrosis was established by intratracheal instillation of bleomycin in all groups except the blank group. Since the second day of modeling, 270.3 mg/(kg·d) of pirfenidone and 21.02 g/(kg·d) of FD-2 were given by gavage to the corresponding groups, while 10 ml/kg of normal saline by gavage was given to the blank group and the model group, once a day for 14 days. HE and Masson staining were used to evaluate the degree of inflammatory injury and fibrosis in lung tissue. The expression level of collagen I (Col I) in lung tissue was observed by immunohistochemistry. The level of reactive oxygen species (ROS) was detected by chemiluminescence method, and the levels of oxidative stress-related indicators including malondialdehyde (MDA), total antioxidant capacity (T-AOC) and superoxide dismutase (SOD) were assessed. Large tumor suppressor gene 1 (LATS1), phosphorylated LATS1 (p-LATS1), Yes-related protein (YAP) and phosphorylated YAP (p-YAP) levels were detected by western blot. **Results** The results of HE staining, Masson staining and immunohistochemistry showed that the lung tissue structure was normal, and the collagen deposition was not obvious of the mice in the blank group, while there were alveolar collapse or even closure in the lung tissues, with obvious inflammatory cell infiltration and Col I deposition of the mice in the model group. Compared to those in the model group, the lung tissue structures, inflammation and collagen deposition were significantly improved, and the Col I level decreased in the FD-2 group and pirfenidone group. Compared to those in the blank group, the levels of serum MDA, ROS and YAP in the model group, pirfenidone group and FD-2 group increased significantly, and the levels of T-AOC, SOD activity, LATS1, p-LATS1 and p-YAP decreased significantly ($P < 0.05$). Compared to those in the model group, the levels of MDA, ROS and YAP in pirfenidone and FD-2 group decreased significantly, and the levels of T-AOC, SOD activity, LATS1, p-LATS1 and p-YAP increased significantly ($P < 0.05$). **Conclusion** FD-2 may improve IPF by regulating ROS/Hippo/YAP signaling pathway.

Keywords idiopathic pulmonary fibrosis; *Feibi Decoction* II (肺痹汤 2 号); oxidative stress; bleomycin; ROS/Hippo/YAP signaling pathway

(收稿日期: 2022-02-24; 修回日期: 2022-03-19)

[编辑: 邓媛]