

• XXXX •

金水缓纤组分方Ⅱ联合基质软化抑制上皮间质转化改善肺纤维化的作用机制

吴晓杰, 李明艳, 邝施宇, 彭西玲, 侯晓荣, 刘含*

(河南中医药大学 中医药科学院, 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, 郑州 450046)

【摘要】 目的:明确金水缓纤组分方Ⅱ(ECC-JHF Ⅱ)与基质硬度是否通过调控整合素 β_1 (ITG β_1),干预肺纤维化过程中上皮间质转化(EMT)的作用机制。**方法:**通过一次性气管内滴注博来霉素(BLM)来建立肺纤维化小鼠模型,为了观察各时间段小鼠病程进展,分别于造模前,造模后第7、14、21、28、42天结束后处死小鼠检测相关指标。为评估药物治疗干预效果,在造模后第29天给予ECC-JHF Ⅱ和吡非尼酮(PFD)灌胃干预治疗14 d后处死小鼠,检测评估肺功能、病理变化、胶原沉积、肺组织硬度及EMT标志物。体外借助生物材料八臂聚乙二醇巯基(PEG-SH)与八臂聚乙二醇马来酰亚胺(PEG-MAL)等制备不同硬度的聚乙二醇(PEG)复合水凝胶。将低、中、高剂量的ECC-JHF Ⅱ(15.31 、 30.63 、 61.25 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)加入硬基质培养皿培养的人Ⅱ型肺泡上皮细胞中,观察ECC-JHF Ⅱ对转化生长因子- β_1 (TGF- β_1)诱导的人Ⅱ型肺泡上皮细胞EMT的干预作用。将ECC-JHF Ⅱ分别作用于软(3.8 kPa)、硬基质(培养皿,~GPa)上培养的人Ⅱ型肺泡上皮细胞,通过实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)和免疫荧光检测上皮标志物E-钙黏蛋白(CDH1),间质标志物中N-钙黏蛋白(CDH2)和波形蛋白(VIM)及ITG β_1 的mRNA与荧光表达水平。蛋白免疫印迹法(Western blot)检测CDH1、CDH2及ITG β_1 的蛋白表达量,并通过敲低与特异性激活ITG β_1 验证ECC-JHF Ⅱ作用于EMT和肺纤维化的生物力学机制。**结果:**ECC-JHF Ⅱ可改善BLM诱导的小鼠肺纤维化,表现为与模型组比较,每分钟通气量(MV)和50%潮气量呼气流量(EF_{50})明显增加($P<0.05$),治疗后潮气量(TV)显著增加($P<0.01$);免疫组织病理学分析显示炎症、肺泡损伤减轻,I型胶原蛋白(COL-I)沉积减少,并且肺组织硬度显著降低($P<0.01$),缓解疾病进程。Real-time PCR结果显示,与模型组比较,ECC-JHF Ⅱ组小鼠肺组织的CDH1表达升高,CDH2与VIM表达明显降低($P<0.05$, $P<0.01$),ECC-JHF Ⅱ抑制EMT进程改善肺纤维化。体外实验结果表明,ECC-JHF Ⅱ与基质软化均可逆转EMT表型转换,具体表现为,与硬基质组比较,在软基质上培养的细胞上皮标志物CDH1显著上调($P<0.01$),间质标志物CDH2与VIM明显下调($P<0.05$)。此外,ECC-JHF Ⅱ在体内外能抑制ITG β_1 的表达,并通过敲低与特异性激活ITG β_1 进一步证实,ITG β_1 参与了ECC-JHF Ⅱ抑制EMT,改善肺纤维化作用的调控过程。**结论:**ECC-JHF Ⅱ与基质软化可阻断EMT进程,改善肺纤维化,其作用机制可能与抑制ITG β_1 参与机械传导有关。本研究从生物力学角度揭示了ECC-JHF Ⅱ干预肺纤维化的新机制。

【关键词】 金水缓纤方; 组分方; 肺纤维化; 基质硬度; 整合素 β_1 ; 上皮间质转化

【中图分类号】 R242;R563;R256 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-9903(XXXX)XX-0001-14

【doi】 10.13422/j.cnki.syfjx.20260761

【网络出版地址】

【网络出版日期】 XXXX-XX-XX



Mechanism of Jinshui Huanxian Component Formula Ⅱ Combined with Matrix Softening in Ameliorating Pulmonary Fibrosis through Inhibition of Epithelial-mesenchymal Transition

WU Xiaojie, LI Mingyan, KUANG Shiyu, PENG Xiling, HOU Xiaorong, LIU Han*

(Henan Key Laboratory of Chinese Medicine for Respiratory Disease, Collaborative Innovation Center for Chinese Medicine and Respiratory Diseases Co-constructed by Henan Province & Ministry of Education of China,

【收稿日期】 2026-01-28

【基金项目】 河南省高等学校重点科研项目(25A360013);国家自然科学基金面上项目(82474313);河南省自然科学基金优秀青年项目(252300421135)

【第一作者】 吴晓杰,在读硕士,从事中医药防治呼吸疾病研究,E-mail:1678506540@qq.com

【通信作者】 *刘含,研究员,博士生导师,博士后合作导师,从事中医药防治呼吸系统疾病的生物力学机制、功能性微组织及器官芯片的制备等研究,E-mail:liuhan1969@hactcm.edu.cn

Academy of Chinese Medical Sciences, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China)

[Abstract] **Objective:** To determine whether Jinshui Huanxian component formula II (ECC-JHF II) and matrix hardness interfere with the process of epithelial-mesenchymal transition (EMT) during pulmonary fibrosis by regulating integrin β_1 (ITG β_1), and to elucidate the underlying mechanism. **Methods:** A pulmonary fibrosis mouse model was established by a single intratracheal instillation of bleomycin (BLM). To observe the disease progression at various time points, the mice were sacrificed before modeling and on days 7, 14, 21, 28 and 42 after modeling for assessment of relevant indicators. To evaluate the therapeutic effect of drug intervention, the mice were given ECC-JHF II and pirfenidone (PFD) by gavage starting on day 29 after modeling for 14 days of treatment, after which the mice were sacrificed. Pulmonary function, pathological changes, collagen deposition, lung tissue hardness and EMT markers were detected. Polyethylene glycol (PEG) composite hydrogels with different hardness were prepared *in vitro* using biomaterials such as eight-arm polyethylene glycol thiol (PEG-SH) and eight-arm polyethylene glycol maleimide (PEG-MAL). Human type II alveolar epithelial cells cultured in hard matrix culture dishes were treated with low, medium, and high doses of ECC-JHF II (15.31, 30.63, 61.25 mg·L⁻¹) to observe the intervention effect of ECC-JHF II on EMT induced by transforming growth factor beta 1 (TGF- β_1). Human type II alveolar epithelial cells cultured on soft (3.8 kPa) and hard (culture dishes, ~ GPa) matrices were treated with ECC-JHF II, respectively. The mRNA and fluorescence expression levels of the epithelial marker E-cadherin (CDH1), the mesenchymal marker N-cadherin (CDH2) and vimentin (VIM), as well as ITG β_1 , were detected by real-time quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR) and immunofluorescence. Western blot was used to detect the protein expression of CDH1, CDH2 and ITG β_1 , and the biomechanical mechanism of ECC-JHF II on EMT and pulmonary fibrosis was further verified by knocking down and specific activation of ITG β_1 . **Results:** ECC-JHF II treatment improved BLM-induced pulmonary fibrosis in mice, as evidenced by significantly increased minute ventilation (MV) and 50% expiratory flow at tidal volume (EF₅₀) ($P<0.05$), and significantly increased tidal volume (TV) after treatment ($P<0.01$) compared with the model group. Immunohistopathological analysis revealed attenuated inflammation and alveolar injury, reduced deposition of type I collagen (COL-I), and significantly decreased lung tissue stiffness ($P<0.01$), thereby alleviating disease progression. The real-time PCR results showed that, compared with the model group, the ECC-JHF II group showed increased CDH1 expression and decreased CDH2 and VIM expression in mouse lung tissues ($P<0.05$, $P<0.01$), indicating that ECC-JHF II inhibited the EMT process to ameliorate pulmonary fibrosis. *In vitro* experimental results showed that both ECC-JHF II and matrix softening reversed the EMT phenotype switch. Specifically, compared with the hard matrix group, the cells cultured on the soft matrix exhibited significantly upregulated expression of the epithelial marker CDH1 ($P<0.01$) and significantly downregulated expression of the mesenchymal markers CDH2 and VIM ($P<0.05$). Furthermore, ECC-JHF II inhibited the expression of ITG β_1 both *in vitro* and *in vivo*. Knockdown and specific activation of ITG β_1 further confirmed that ITG β_1 is involved in the regulatory process by which ECC-JHF II inhibits EMT and ameliorates pulmonary fibrosis. **Conclusion:** ECC-JHF II and matrix softening can block the EMT process and ameliorate pulmonary fibrosis, and the underlying mechanism may be associated with the inhibition of ITG β_1 -mediated mechanotransduction. This study reveals a novel mechanism of ECC-JHF II intervention in pulmonary fibrosis from a biomechanical perspective.

[Keywords] Jinshui Huanxian Formula; component formula; pulmonary fibrosis; matrix hardness; integrin β_1 ; epithelial-mesenchymal transition

特发性肺纤维化(IPF)是一种以肺泡上皮损伤、成纤维细胞异常增殖及细胞外基质(ECM)过度沉积为病理特征的高致死性间质性肺病,最终导致肺组织不可逆的结构破坏与呼吸功能进行性丧失^[1-2]。该病预后不良,死亡率高,对社会经济及医疗系统均构成沉重负担。目前临床已批准使用吡非尼酮和尼达尼布治疗IPF,两者虽能一定程度上延缓肺功能下降、缓解相关症状,但仍常引起恶心、腹泻等不良反应,且无法从本质上逆转疾病的进展^[3-4],因此迫切需要探究有效防治IPF的策略。

在IPF病理过程中,进行性慢性肺组织损伤会导致肺泡上皮细胞功能的丧失或者改变,这不仅直接激活上皮间质转化(EMT),还会促使大量促纤维

化因子的分泌,进而驱动肺内成纤维细胞向肌成纤维细胞转化,最终共同引起ECM过度沉积和肺结构破坏。研究表明,EMT是肌成纤维细胞的重要来源之一^[5]。研究人员分别在肺纤维化患者肺组织及博来霉素(BLM)诱导的小鼠肺纤维化模型中,通过细胞谱系追踪的方法发现肺纤维化进程存在EMT^[6]。在EMT过程中,上皮细胞标志物E-钙黏蛋白(CDH1)表达下调,而间充质细胞标志物N-钙黏蛋白(CDH2)和波形蛋白(VIM)表达上调^[7],通过抑制EMT的发生发展可以显著改善BLM诱导的肺纤维化小鼠模型^[8-9],有研究表明,氯硝柳胺^[10]、艾拉莫德片^[8]和硝唑尼特^[11]等药物均可以通过抑制EMT改善肺纤维化^[7,12]。由此可见,抑制EMT可能是肺纤

维化的有效治疗策略。

近年来,生物物理因素(如ECM硬度)在肺纤维化进展及防治中的重要作用日益凸显。在IPF疾病进程中,EMT与成纤维细胞活化促进了ECM成分的过度分泌,同时导致局部肺组织形成进行性、不可逆的瘢痕,从而使肺组织局部硬度显著增加^[13]。肺组织硬度的增加对肺细胞的生物学行为具有重要影响。研究表明,正常人肺组织硬度为 (1.96 ± 0.13) kPa,而IPF的肺组织硬度高达 (16.52 ± 2.25) kPa^[14]。整合素 β_1 (ITG β_1)是连接细胞与ECM力学环境的关键蛋白之一^[15]。肺组织硬度升高后,肺泡上皮细胞及成纤维细胞如何感知并转导力学信号的机制尚不清楚。ITG β_1 能够感知由基质硬度变化产生的生物力学信号,并将其转化为化学信号传递至细胞内,进而调控细胞行为与功能,因此,推测肺组织硬度升高这一过程可能通过ITG β_1 传导。然而,基质硬度在上皮间质转化及肺纤维化发生发展中的具体调控作用,仍有待进一步阐明。

在中医学理论中,肺纤维化主要归属于“肺痿”与“肺痹”范畴,其病机多本虚标实,涉及气阴两虚、痰瘀阻络等证候。李建生教授基于多年临床实践及科学研究,提出“正虚络痹积损”为本病主要病机^[16],治以“扶正通络消积”为法^[17],其中针对IPF后期肺肾两虚兼痰瘀互结证拟定了具有补益肺肾、止咳平喘兼化痰活血之功的金水缓纤方(专利号为Z1.201610877761.4),该方由人参、淫羊藿、浙贝母和熟地黄等药物组成可以有效改善患者临床症状^[18]。然而,由于中药复方具有多成分、多途径、多靶点的药效特征,难以全面探析其作用机制,课题组对金水缓纤方进行优化,筛选该方有效组分,优化药物配伍配比,形成金水缓纤组分方I(ECC-JHF I,ZL.2018.1.1415482.1),并基于BLM诱导的肺纤维化大鼠模型及多指标R值综合评价疗效,精简配伍形成金水缓纤组分方II(ECC-JHF II),ECC-JHF II成分明确,且与金水缓纤方疗效相当^[19]。研究发现,有关金水缓纤方抗纤维化机制的研究多集中于调控细胞因子网络[如抑制转化生长因子- β_1 (TGF- β_1)^[20]、调节免疫细胞功能(如巨噬细胞极化^[21])等。同时,ECC-JHF II能够通过抑制脂滴分解以阻断巨噬细胞向M2型极化^[22],并且该方可通过血管内皮生长因子(VEGF)/内皮型一氧化氮合酶(eNOS)抑制内皮间质转化^[23]等多种作用机制改善肺纤维化。有研究显示,ECC-JHF II可调控SET结构域分叉组蛋白赖氨酸甲基转移酶1

(SETDBI)/蜗牛家族转录抑制因子1(SNAI1)表观抑制人II型肺泡上皮细胞(A549)的EMT转化^[24]。目前,对该方的研究多聚焦于生化途径,尚缺乏从生物力学角度对其作用机制的探讨,尤其ECC-JHF II是否通过调控细胞对基质硬度的力学感知与转导进而影响EMT及纤维化进程。

基于此,本研究旨在探讨ECC-JHF II改善肺纤维化过程中EMT的潜在治疗作用及其生物力学机制,重点关注细胞水平上基质硬度变化与EMT进程之间的相互作用。通过构建硬度可调的聚乙二醇(PEG)复合水凝胶,模拟肺纤维化相关的力学特征,进一步阐明基质软化对EMT表型转化的调控作用及ECC-JHF II的干预效应。本研究从力学生物学视角揭示ECC-JHF II防治特发性肺纤维化的潜在作用机制,为中药复方干预肺纤维化提供新的理论依据和临床转化潜力。

1 材料

1.1 动物与细胞 选用SPF级C57BL/6J雄性小鼠48只,体质量 (20 ± 2) g,合格证号110324221101674161,购自北京斯贝福实验动物有限公司,生产许可证号SCXK(京)2019-0010。小鼠饲养于温度 (25 ± 2) °C、相对湿度 $(55\pm 10)\%$ 环境中,可自由摄食与饮水。此外,实验所用A549细胞购自武汉普诺赛生命科技有限公司,货号CP-H209,传代至第3代后用于实验。

1.2 伦理 本研究通过河南中医药大学第一附属医院实验动物福利伦理审查委员会审查批准,审批编号为DWLLGZR202202035。

1.3 药物与试剂 注射用盐酸博来霉素(日本化药株式会社,货号410730,15 mg/瓶,国药准字H20090885),吡啡尼酮胶囊(北京康蒂尼药业有限公司,货号20210903,100 mg/粒,54粒/瓶,国药准字H20133376),ECC-JHF II由异甘草素、贝母素甲、川陈皮素、芍药苷、淫羊藿苷5个单体组成(中药单体成分购买于成都曼斯特生物科技有限公司,纯度均 $\geq 98\%$,货号分别为961-29-5、23496-41-5、478-01-3、23180-57-6、489-32-7)。八臂聚乙二醇马来酰亚胺、八臂聚乙二醇巯基(上海芃硕生物科技有限公司,货号分别为PS8-M-10K、PS8-S-10K),精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(RGD)多肽(上海淘普生物科技有限公司,货号TP-WY-4168),DMEM/F-12培养基(赛默飞世尔科技公司,货号C11330500BT),聚氰基丙烯酸正丁酯(BCA)蛋白浓度测定试剂盒、增强化学发光(ECL) Plus超敏发光液、苏木素-伊红(HE)染色试

剂盒、Masson三色染色试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,货号分别为PC0020、PE0010、G1120、G1340),链霉素和素-生物素复合物(SABC)免疫组化染色试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司,货号SA1022),4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)染色液(上海尚宝生物科技有限公司,货号R21858),RT SuperMix for qPCR试剂、Universal SYBR qPCR Master Mix试剂(南京诺唯赞生物科技股份有限公司,货号分别为R223-01-AC、Q711-02-AA),ITG β_1 抗体(武汉赛维尔生物科技有限公司,货号gb115173),甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体、CDH2抗体、CDH1抗体(武汉三鹰生物技术有限公司,货号分别为10494-1-AP、22018-1-AP、20874-1-AP),小干扰核糖核酸(siRNA)序列(上海吉玛制药有限公司,货号220),吡林整合素(pyrintegrin)、TGF- β_1 (美国MCE公司,货号分别为HY-13306、HY-P7118)等。

1.4 仪器 LSM700型激光共聚焦显微镜(德国Carl Zeiss AG公司),QuantStudio 6型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪(新加坡Life Technologies公司),MCR 302e型流变仪(奥地利Anton Par公司),Sentry 2.0型冻干机(日本SP SCIENTIFIC公司),SYNERGY/HTX型多功能酶标仪(美国BioTek公司),WIX-EP600型通用电泳仪电源(北京韦克斯科技有限公司),非束缚小动物肺功能测量仪(美国Buxco公司),RM2016型病理切片机(上海徕卡仪器有限公司),PM-10AD型光学显微镜及照相系统(日本Olympus optical公司)等。

2 方法

2.1 药物制备 ECC-JHF II由异甘草素、贝母素甲、川陈皮素、芍药苷和淫羊藿苷5种中药单体组成,按照淫羊藿苷-异甘草素-川陈皮素-贝母素甲-芍药苷=50:4:1:3.125:3.125的质量比溶解于二甲基亚砷中配制成 $61.25\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的储备液,用于体外细胞实验。同时,在灌胃前按照相同质量比溶于0.5%羧甲基纤维素钠(CMC-Na)中配制成混悬液备用。吡啡尼酮使用前用0.5% CMC-Na配置。

2.2 动物分组与药物干预 为了观察各时间段小鼠病程进展,在小鼠适应性喂养7 d后,采用气管滴注盐酸博莱霉素($5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)制备肺纤维化小鼠模型,随机将C57BL/6J雄性小鼠分为模型7 d组、模型14 d组、模型21 d组、模型28 d组、模型42 d组,每组6只,另设空白组6只。为了观察造模后不同时间点小鼠体质量与肺组织硬度变化规律,分别于造模前

及造模后第7、14、21、28、42天结束后,在称量小鼠体质量后处死小鼠,取肺组织进行硬度测量。模型组小鼠体质量下降且肺组织硬度升高,表明小鼠动物模型构建成功。根据课题组前期模型研究^[25],将造模日定为第0天和第29天开始进行药物干预,为评价ECC-JHF II与吡啡尼酮对肺纤维化模型后期小鼠的干预作用,将C57BL/6J雄性小鼠随机分为模型组、ECC-JHF II组、吡啡尼酮组,每组6只,另设空白组6只。其中,根据小鼠与成人的体表面积折算等效剂量比值,得出小鼠与人的剂量比值折算系数为 $0.002\text{ 6}^{[26]}$,按成人体质量70 kg,小鼠体质量20 g折算,给予吡啡尼酮($156\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)和ECC-JHF II溶液($6.82\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$),并分别按 $0.02\text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$ 进行灌胃。正常组和模型组给予等剂量0.5%CMC-Na溶液灌胃,持续给药14 d后取材,观察小鼠肺组织病理变化并在各时间点称量小鼠体质量。

2.3 肺功能指标检测 分别于造模前,造模后第7、14、21、28、42天采用小动物全身体积描记检测系统测定小鼠潮气量、每分钟通气量、50%潮气量呼气流量并进行统计分析,模型组小鼠肺功能下降。并在造模后第29天给予ECC-JHF II和吡啡尼酮灌胃处理14 d后,同样检测各组小鼠肺功能后进行统计分析。

2.4 肺组织病理观察 10%多聚甲醛灌注小鼠左肺15 min后置于甲醛固定,每24 h更换1次甲醛固定液,72 h后进行石蜡包埋:在近肺门处切取厚度为3 mm的组织薄块,脱水后浸入石蜡固定,制成蜡块。肺组织石蜡块 $4\text{ }\mu\text{m}$ 切片,用相关染色试剂盒进行HE染色和Masson染色,于显微镜下观察并采集图像。肺泡炎症水平依据Szapiel法进行评分,纤维化程度依据Ashcroft法进行评分。

2.5 制作PEG复合水凝胶 玻璃片经清洗和亲水处理后,置于烘箱中干燥,备用。制备PEG复合水凝胶,首先用双蒸水配制含 $0.005\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 八臂聚乙二醇马来酰亚胺(PEG-MAL)和 $2\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ RGD的混合溶液。然后,称取适量的八臂聚乙二醇巯基(PEG-SH)粉末溶于双蒸水中,以制备浓度为 0.002 、 0.003 、 0.004 、 0.005 、 $0.006\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的PEG-SH溶液,其次将PEG-MAL分别与不同浓度的PEG-SH迅速混匀,PEG-MAL:PEG-SH=1:1。接着用移液枪抽取 $180\text{ }\mu\text{L}$ 混合液滴于封口薄膜包裹的平整玻璃板上,轻柔缓慢覆盖亲水玻片,注意避免产生气泡,室温静置20 min即可成胶。

2.6 检测肺纤维小鼠肺组织硬度与PEG复合水凝胶硬度(杨氏模量) 借助流变仪MCR 302e检测小

鼠肺组织硬度,并将制备出的5组不同比例配比的水凝胶,于磷酸盐缓冲生理盐水(PBS)中37℃过夜,待水凝胶溶胀平衡后分别取出,吸干表面水分,在37℃下进行流变学测试。检测上述样本的储能模量(G')和损耗模量(G''),从而获得其杨氏模量。使用以下公式计算杨氏模量, $E=2G(1+\nu)$, $G=(G'+G''^2)^{1/2}$,其中 E 为杨氏模量, ν 为材料的泊松比(小鼠肺组织为0.4), G 为剪切模量, G' 为储能模量, G'' 为损耗模量。

2.7 细胞的培养、分组与处理 A549细胞用含有10%胎牛血清和1%双抗的DMEM/F-12完全培养基培养于37℃、5% CO₂培养箱。将已成胶的PEG复合水凝胶用PBS洗涤4次,每次约5 min去除未反应的基团,并用75%乙醇浸泡3~4 h进行灭菌处理。PBS清洗3次,浸泡30 min后进行细胞实验。将状态良好的A549细胞以 1×10^8 个/L/孔的密度接种于直径为32 mm的PEG水凝胶(3.8 kPa)基底和6孔细胞培养板中,将细胞分为软基质(soft)组(3.8 kPa)和硬基质(stiff)组(培养皿,~GPa)^[27],在硬基质上将不同低、中、高剂量的ECC-JHF II(15.31、30.63、61.25 mg·L⁻¹)作用于TGF- β_1 诱导24 h后的A549细胞,考察对CDH1、CDH2、VIM mRNA表达的影响以确定后续给药剂量。

2.8 免疫荧光检测 EMT 标志物与 ITG β_1 的表达 检测小鼠肺组织中CDH1、CDH2和ITG β_1 的共染情况在切片烘烤脱蜡处理后,浸入1×枸橼酸缓冲液中进行加热、抗原修复、一抗和二抗孵育。随后加入含DAPI的封片剂封片,于激光共聚焦显微镜下观察、采集图像,并使用Image J进行荧光强度定量分析。检测不同基质用药干预后CDH1和CDH2共染情况,在培养皿中每孔加入PBS 1 mL润洗2次,每孔加入多聚甲醛1 mL固定细胞30 min。每孔加入0.3%的TritonX 200 μ L孵育30 min,10%山羊血清室温封闭2 h。一抗用PBS以1:200稀释后孵育过夜,PBS润洗后加入对应用PBS以1:200稀释后的异硫氰酸荧光素(FITC)与花菁素3(Cy3)荧光标记的二抗室温2 h,然后在激光共聚焦显微镜下观察拍片,并使用Image J进行荧光强度定量分析。

2.9 Real-time PCR 检测 EMT 标志物与 ITG β_1 的 mRNA 表达 使用QIAzol法从A549细胞中提取RNA,随后将采用SuperMix将所提取的RNA逆转录为cDNA。选用GAPDH作为内参,进行Real-time PCR检测。使用SYBR qPCR Master Mix和相应的引物进行扩增反应,反应体系为5 μ L,扩增条

件为95℃预变性30 s,95℃变性10 s,60℃退火延伸30 s,共40个循环,溶解曲线60~95℃。本实验所使用的引物包括CDH1、CDH2、VIM、TGF- β_1 、I型胶原蛋白(COL-I)和ITG β_1 ,引物由深圳点睛科技有限公司合成,引物序列见表1。

表1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物	序列(5'-3')	长度/bp
hGAPDH	上游 GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT	138
	下游 GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG	
hCDH1	上游 CGAGAGCTACACGTTACCGG	119
	下游 GGGTGTGCGAGGGAATAAGG	
hCDH2	上游 AGCCTGACACTGTGGAGCCT	207
	下游 TCAGCGTGGATGGGTCTTTC	
hVIM	上游 AGTCCACTGAGTACCGAGAC	98
	下游 CATTTCACGCATCTGGCGTTC	
hITG β_1	上游 GTAACCAACCGTAGCAAAGGA	76
	下游 TCCCCTGATCTTAATCGCAAAAC	
mGAPDH	上游 TGTGTCCGTCGTGGATCTGA	150
	下游 TTGCTGTTGAAGTCGAGGAG	
mCDH1	上游 CAGTTCCGAGGTCTACACCTT	131
	下游 TGAATCGGGAGTCTTCCGAAAA	
mCDH2	上游 AGGCTTCTGGTGAATTCAT	176
	下游 GTCCACCTTGAAATCTGCTGG	
mVIM	上游 CGTCCACACGCACCTACAG	74
	下游 GGGGGATGAGGAATAGAGGCT	
mITG β_1	上游 ATGCCAAATCTGCGGAGAAT	209
	下游 TTTGCTGCGATTGGTGACATT	
mTGF- β_1	上游 TCTGCATTGCACTTATGCTGA	107
	下游 AAAGGGCGATCTAGTGATGGA	
mCOL-I	上游 GCTCCTCTTAGGGGCCACT	103
	下游 CCACGTCTCACCATTGGGG	

注:引物前缀h为人类来源,m为小鼠来源

2.10 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测相关蛋白表达 使用放射免疫沉淀裂解液(RIPA)提取A549细胞总蛋白,并使用BCA蛋白测定试剂盒测定蛋白浓度。蛋白变性后每组加入10 μ g左右蛋白样品进行电泳,采用湿转法将目标蛋白转移至PVDF膜上。在室温条件下,使用10%脱脂奶粉室温封闭1 h。4℃条件下孵育一抗CDH1、CDH2、ITG β_1 (1:2 000)和GAPDH(1:5 000)过夜。洗膜后加入二抗(1:5 000),室温孵育1 h后,用TBST洗3次,ECL Plus超敏化学发光显影液显影后,通过Image J软件分析目的蛋白与内参蛋白条带灰度值。

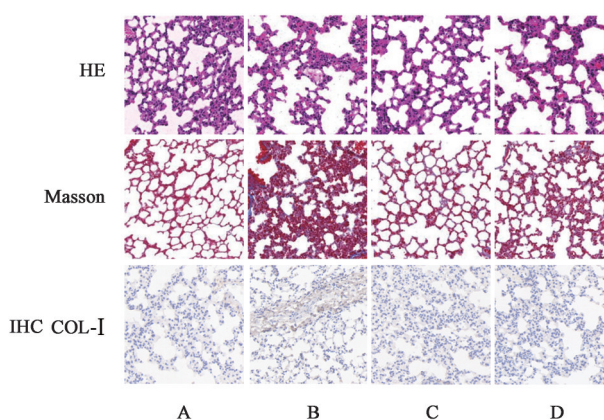
2.11 siRNA 转染与激活 ITG β_1 将细胞在不同基质上培养贴壁后,按照说明书流程对硬基质上的

A549细胞进行siRNA转染,分组为空白组、TGF- β_1 组、TGF- β_1 +ECC-JHF II组、TGF- β_1 +si ITG β_1 组、TGF- β_1 +si NC组、TGF- β_1 +ECC-JHF II +si ITG β_1 组、TGF- β_1 +ECC-JHF II +si NC组,转染24 h后加入TGF- β_1 ,用药组加入TGF- β_1 与ECC-JHF II作用24 h后收集样本进行实验检测。ITG β_1 siRNA靶标序列上游为5'-GGGUGGUGCACAAAUUCAATT-3';下游为5'-UUGAAUUUGUGCACCACCCTT-3',及阴性对照si NC的靶标序列上游为5'-UUCUCCGAACGUGU CACGUTT-3';下游为5'-ACGUGACACGUUCGGAGAATT-3'。后续用质量浓度为1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的pyrintegrin提前1 h预处理Soft组细胞激活ITG β_1 ,分组为空白组、TGF- β_1 组、TGF- β_1 +ECC-JHF II组、TGF- β_1 +ECC-JHF II +pyrintegrin组、TGF- β_1 +pyrintegrin组,预处理后分别对应加入TGF- β_1 ,用药组加入TGF- β_1 与ECC-JHF II作用24 h后收集样本,共同检测CDH1、CDH2、VIM、ITG β_1 的mRNA表达水平变化。

2.12 统计学方法 实验数据采用GraphPad Prism 10.2.3软件进行统计分析,组间差异分析采用单因素方差分析,方差齐者,采用最小显著差异法(LSD);方差不齐者,采用Dunnett's T3法。显著性水准取 $\alpha=0.05$,所有数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示。

3 结果

3.1 ECC-JHF II对肺组织硬度、EMT及肺纤维化的影响 HE和Masson染色结果显示,经ECC-JHF II干预后,小鼠肺组织中的炎症细胞浸润程度减轻,肺泡结构损伤得到缓解,胶原沉积显著减少。免疫组化结果显示,经ECC-JHF II干预后,COL- I沉积减少,见图1。与空白组比较,模型组肺泡炎与纤维化的病理学评分显著升高($P<0.01$)。与模型组比较,ECC-JHF II治疗组肺泡炎与纤维化的病理学评分明显降低($P<0.05$, $P<0.01$),见表2。造模后28 d后分别给予肺纤维化小鼠ECC-JHF II及吡非尼酮药物干预14 d后,药物干预组小鼠体质量较模型组升高,见表3。肺功能检测结果显示,与空白组比较,模型组每分钟通气量与潮气量显著下降($P<0.01$),



注:A.空白组;B.模型组;C.ECC-JHF II组;D.吡非尼酮(图3、图7同)

图1 ECC-JHF II对小鼠肺组织病理形态及COL- I表达的影响($\times 200$)
Fig. 1 Effect of ECC-JHF II on pathological morphology and COL- I expression in lung tissue of mice ($\times 200$)

表2 ECC-JHF II对小鼠肺泡炎与肺纤维化病理评分的影响($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

Table 2 Effect of ECC-JHF II on pathological scores of alveolitis and pulmonary fibrosis in mice ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)				分
组别	剂量/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	肺泡炎评分	纤维化评分	
空白组		0.83 $\pm$ 0.41	0.67 $\pm$ 0.52	
模型组		2.83 $\pm$ 0.41 ²⁾	5.33 $\pm$ 0.52 ²⁾	
ECC-JHF II组	6.82	1.67 $\pm$ 0.52 ³⁾	3.33 $\pm$ 0.82 ⁴⁾	
吡非尼酮组	156	2.5 $\pm$ 0.84	4.17 $\pm$ 0.98	

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$;与模型组比较³⁾ $P<0.05$,⁴⁾ $P<0.01$ (表4、表5-表7、表14同)

50%潮气量呼气流量明显下降($P<0.05$)。ECC-JHF II治疗后与模型组比较,50%潮气量呼气流量、每分钟通气量明显升高($P<0.05$),潮气量显著升高($P<0.01$),见表4。这些结果表明,ECC-JHF II对小鼠肺纤维化有治疗作用。各模型组不同时间点小鼠肺组织硬度发生变化,与第0天比较,模型第21天与第42天肺组织硬度显著升高($P<0.01$),见图2。与空白组比较,模型组肺组织硬度显著升高($P<0.01$),与模型组比较,经ECC-JHF II治疗后显著降低了肺组织的杨氏模量($P<0.01$),见表5。同时,Real-time PCR分析结果显示,与空白组比较,模

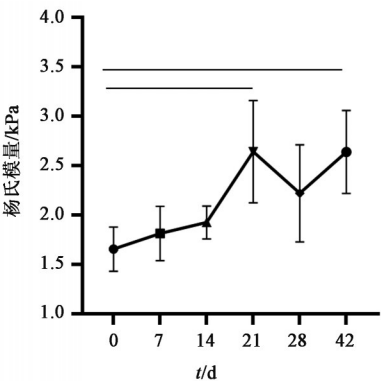
表3 ECC-JHF II对造模后小鼠不同时间点体质量的影响($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

Table 3 Effect of ECC-JHF II on body weight of mice at different time points after modeling ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)								g
组别	剂量/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	第0天	第7天	第14天	第21天	第28天	第42天	
空白组		21.55 $\pm$ 0.21	23.47 $\pm$ 0.59	23.97 $\pm$ 0.74	24.68 $\pm$ 0.74	26.10 $\pm$ 0.88	28.40 $\pm$ 1.45	
模型组		21.23 $\pm$ 0.20	22.17 $\pm$ 0.20	23.17 $\pm$ 0.38	23.67 $\pm$ 0.62	24.57 $\pm$ 1.03	26.12 $\pm$ 1.99	
ECC-JHF II组	6.82	20.97 $\pm$ 0.30	22.2 $\pm$ 0.20	22.93 $\pm$ 0.23	23.72 $\pm$ 0.17	24.85 $\pm$ 0.23	27.78 $\pm$ 0.93	
吡非尼酮组	156	21.07 $\pm$ 0.37	22.13 $\pm$ 0.08	22.97 $\pm$ 0.19	24.07 $\pm$ 0.14	24.8 $\pm$ 0.18	27.13 $\pm$ 0.56	

表4 ECC-JHF II 对小鼠肺功能相关指标的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 4 Effect of ECC-JHF II on pulmonary function related indexes in mice ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	每分钟通气量 /mL·min ⁻¹	潮气量 /mL	50%潮气量呼 气流量/mL·S ⁻¹
空白组		155.76±10.59	0.38±0.01	0.47±0.14
模型组		127.80±15.00 ²⁾	0.27±0.05 ²⁾	0.30±0.07 ¹⁾
ECC-JHF II 组	6.82	151.12±9.62 ³⁾	0.34±0.02 ⁴⁾	0.46±0.01 ³⁾
吡非尼酮组	156	137.10±15.04	0.31±0.02	0.43±0.08



注:与第0天比较¹⁾P<0.01

图2 造模后各组小鼠不同时间点肺组织硬度杨氏模量的变化 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Fig. 2 Change of Young's modulus of lung tissue hardness at different time points in model groups ($\bar{x}\pm s, n=6$)

表5 ECC-JHF II 对小鼠肺组织杨氏模量(组织硬度)的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 5 Effect of ECC-JHF II on Young's modulus (tissue stiffness) of lung tissue in mice ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	杨氏模量/kPa
空白组		1.66±0.22
模型组		2.64±0.42 ²⁾
ECC-JHF II 组	6.82	1.95±0.34 ⁴⁾
吡非尼酮组	156	1.43±0.23 ⁴⁾

型组 COL- I 显著升高 ($P<0.01$)。与模型组比较, ECC-JHF II 组 COL- I 显著降低 ($P<0.01$), 见表 6。上述结果显示 ECC-JHF II 可缓解肺组织硬化。

EMT 进程中上皮标志物 CDH1 表达降低, 间质标志物 CDH2 表达升高, 是肺纤维化的关键驱动因素。Real-time PCR 分析结果显示, ECC-JHF II 可以

抑制 EMT 进程。与空白组比较, 模型组小鼠 CDH1 表达显著降低 ($P<0.01$), CDH2 表达显著升高 ($P<0.01$)。同时, 与模型组比较, 经 ECC-JHF II 治疗后 CDH1 显著升高 ($P<0.01$), VIM 明显降低 ($P<0.05$), CDH2 与 TGF- β_1 显著降低 ($P<0.01$), 见表 6。同时, 通过免疫荧光显示分析评估 ECC-JHF II 对 EMT 的影响, 结果显示, ECC-JHF II 治疗组小鼠肺组织中 CDH1 表达增加, CDH2 表达降低, 表明 EMT 受到抑制, 见图 3。在此结果基础上对 CDH1 和 CDH2 进行荧光强度定量, 结果表明, 经 ECC-JHF II 治疗后, 与模型组比较, CDH1 表达显著增强 ($P<0.01$), CDH2 表达显著减弱 ($P<0.01$), 见表 7。以上结果表明, ECC-JHF II 具有不仅能抑制 EMT, 还能降低纤维化肺组织的硬度, 且作用与吡非尼酮相当。

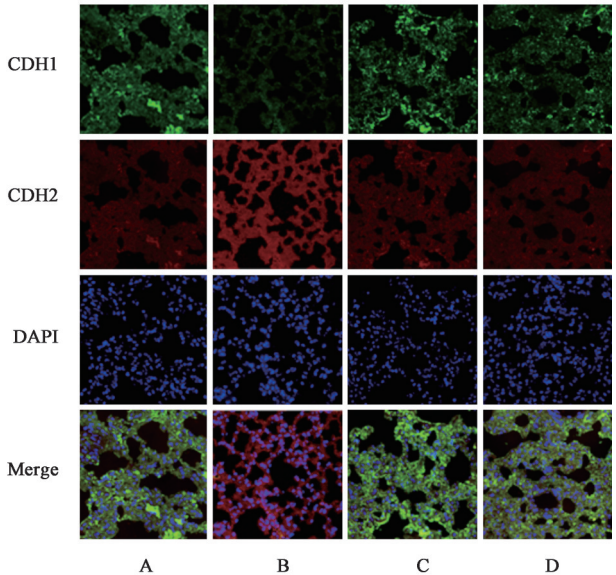


图3 ECC-JHF II 对小鼠肺组织 EMT 标志物 CDH1、CDH2 荧光表达强度的影响 (免疫荧光, $\times 200$)

Fig.3 Effect of ECC-JHF II on fluorescence expression intensity of EMT markers CDH1 and CDH2 in lung tissue of mice (IF, $\times 200$)

3.2 基质软化对 TGF- β_1 诱导的 EMT 的影响 ECM 的力学特性(尤其是硬度)在细胞行为和组织稳态中起关键作用。肺纤维化过程中, ECM 发生显著重塑, 导致组织硬度增加, 推测这一变化可促进 EMT。为探讨这一关系, 我们制备 PEG 复合水凝胶基质模拟

表6 ECC-JHF II 对小鼠肺组织 CDH1、CDH2、VIM、COL- I、TGF- β_1 mRNA 表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 6 Effect of ECC-JHF II on mRNA expressions of CDH1, CDH2, VIM, COL- I and TGF- β_1 in lung tissue of mice ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	CDH1	CDH2	VIM	COL- I	TGF- β_1
空白组		1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
模型组		0.60±0.06 ²⁾	3.32±0.92 ²⁾	2.43±0.32 ¹⁾	2.36±0.23 ²⁾	2.20±0.54 ²⁾
ECC-JHF II 组	6.82	0.85±0.08 ⁴⁾	0.23±0.28 ⁴⁾	0.87±0.72 ³⁾	0.43±0.10 ⁴⁾	0.90±0.14 ⁴⁾
吡非尼酮组	156	1.33±0.03	1.19±0.48	1.39±0.46	0.91±0.05	0.80±0.16

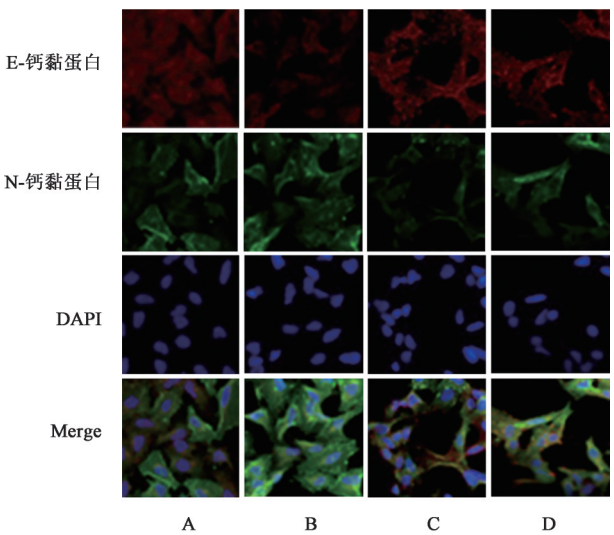
表7 ECC-JHF II 对小鼠肺组织 EMT 标志物 CDH1、CDH2 相对荧光强度的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 7 Effect of ECC-JHF II on relative fluorescence intensity of EMT markers CDH1 and CDH2 in lung tissue of mice ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	CDH2 相对 荧光强度	CDH1 相对 荧光强度
空白组		3.19±1.40	8.48±3.45
模型组		8.82±3.04 ²⁾	3.14±1.26 ²⁾
ECC-JHF II 组	6.82	3.22±0.83 ⁴⁾	8.28±3.65 ⁴⁾
吡非尼酮组	156	3.34±1.40	6.30±2.50

不同硬度的肺组织环境。根据流变学数据显示,调整 PEG-MAL 与 PEG-SH 的比例,PEG-MAL 设置为 2.5,调整 PEG-SH 分别为 1、1.5、2.5、3,PEG 复合水凝胶硬度依次为 0.76、3.8、7.31、8.16 kPa,当 PEG-SH 的浓度逐渐增加时,复合水凝胶的硬度也逐渐增加。为探究基质硬度对 EMT 进程的影响,模拟肺纤维化进程中在体正常肺组织硬度,选取 3.8 kPa 左右的水凝胶用于后续实验,将 A549 细胞分别在软基质(3.8 kPa)和硬基质(培养皿,~GPa)^[27]上培养,A549 细胞在不同基质上培养 24 h 后,免疫荧光染色显示,在软基质上,CDH1 表达明显增加($P<0.05$),CDH2 ($P<0.05$)表达明显降低,见图 4、表 8。Real-time PCR 分析结果与免疫荧光及其定量结果一致,与硬基质比较,在软基质上培养的 A549,上皮细胞标记物 CDH1 显著升高($P<0.01$)、间充质细胞标记物 CDH2 和 VIM mRNA 表达明显降低($P<0.05$),见表 9。实验结果共同表明,在没有化学因子 TGF- β_1 存在的情况下,相对于 Soft 组,在硬基质上培养的肺泡上皮细胞,其 CDH1 表达降低,CDH2 表达升高,表明改变基质硬度可以调控 EMT。现有研究,借助化学因子 TGF- β_1 来诱导 A549 的 EMT 模型已被广泛运用^[28-29]。并且,在表 6 动物实验结果表明,模型组小鼠 TGF- β_1 显著升高($P<0.01$)。A549 在 TGF- β_1 诱导 24 h 后,相对于 Stiff+TGF- β_1 组,Soft+TGF- β_1 组细胞 CDH1 显著升高($P<0.01$)、CDH2 和 VIM mRNA 表达显著降低($P<0.01$),见表 9。免疫荧光及其定量结果显示,CDH1 表达显著增加($P<0.01$),CDH2 表达显著降低($P<0.01$),见图 4、表 8。实验结果表明,在有化学因子 TGF- β_1 诱导的情况下,相对于 Stiff 组,在软基质 PEG 水凝胶(3.8 kPa)上培养的肺泡上皮细胞中 CDH1 表达升高,CDH2 和 VIM 表达降低,表明软基质可以抑制 EMT。

3.3 ECC-JHF II 及软基质对 TGF- β_1 诱导的 EMT 的影响 在硬基质上将不同质量浓度的 ECC-JHF II



注:A.Stiff组;B. Stiff+TGF- β_1 组;C.Soft组;D. Soft+TGF- β_1 组
图4 不同基质硬度对上皮间质转化标记物 CDH1、CDH2 荧光强度的影响(免疫荧光,×400)

Fig. 4 Effects of different matrix hardness on fluorescence intensity of epithelial-mesenchymal transition markers CDH1 and CDH2 (IF, ×400)

表8 不同基质硬度对 A549 细胞 EMT 标志物 CDH1、CDH2 相对荧光强度的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 8 Effect of different matrix stiffness on relative fluorescence intensity of EMT markers CDH1 and CDH2 in A549 cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	CDH2 相对荧光强度	CDH1 相对荧光强度
Stiff 组	9.33±2.69	9.73±2.20
Stiff+TGF- β_1 组	15.39±3.07	3.92±0.62
Soft 组	5.31±1.91 ¹⁾	7.32±1.75 ¹⁾
Soft+TGF- β_1 组	8.87±3.54 ²⁾	6.76±1.48 ²⁾

注:与 Stiff 组比较 ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$;与 Stiff+TGF- β_1 组比较 ³⁾ $P<0.01$, ⁴⁾ $P<0.05$ (表 9 同)

表9 不同基质硬度对 A549 细胞 EMT 标志物 CDH1、CDH2、VIM mRNA 表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 9 Effects of different matrix stiffness on mRNA expressions of EMT markers CDH1, CDH2 and VIM in A549 cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	CDH1	CDH2	VIM
Stiff 组	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
Stiff+TGF- β_1 组	0.33±0.07	3.79±0.16	2.40±0.33
Soft 组	1.70±0.26 ²⁾	0.23±0.12 ¹⁾	0.42±0.15 ¹⁾
Soft+TGF- β_1 组	1.01±0.15 ⁴⁾	2.31±0.51 ⁴⁾	0.58±0.18 ⁴⁾

(15.31、30.63、61.25 mg·L⁻¹)作用于 TGF- β_1 诱导 24 h 后的 A549,Real-time PCR 结果显示,与空白组比较,TGF- β_1 组上皮细胞标志物 CDH1 显著下调($P<0.01$),间质细胞标记物 CDH2 和 VIM($P<0.01$)显著上调。与 TGF- β_1 组比较,TGF- β_1 +ECC-JHF II 各剂量组,上

表 10 硬基质上不同质量浓度 ECC-JHF II 对 CDH1、CDH2、VIM mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 10 Effect of different concentrations of ECC-JHF II on mRNA expression of CDH1, CDH2 and VIM in rigid matrix ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/mg·L ⁻¹	CDH1	CDH2	VIM
空白组		1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
TGF-β ₁ 组		0.23±0.01 ¹⁾	3.50±0.29 ³⁾	2.44±0.21 ¹⁾
TGF-β ₁ +ECC-JHF II 低剂量组	15.31	0.94±0.12 ³⁾	1.09±0.24 ³⁾	1.47±0.76 ²⁾
TGF-β ₁ +ECC-JHF II 中剂量组	30.63	0.99±0.05 ³⁾	1.46±0.09 ³⁾	1.09±0.02 ³⁾
TGF-β ₁ +ECC-JHF II 高剂量组	61.25	1.20±0.11 ³⁾	1.03±0.06 ³⁾	0.82±0.07 ³⁾

注:与空白组比较¹⁾P<0.01;与TGF-β₁组比较²⁾P<0.05,³⁾P<0.01

皮细胞标志物 CDH1 显著增加 ($P<0.01$), 间质细胞标记物 CDH2 和 VIM 明显下调 ($P<0.05, P<0.01$), 不同低、中、高质量浓度比较, 整体高质量浓度效果较好, 因此, 确定用于后续实验的 ECC-JHF II 药物质量浓度为 61.25 mg·L⁻¹。见表 10。

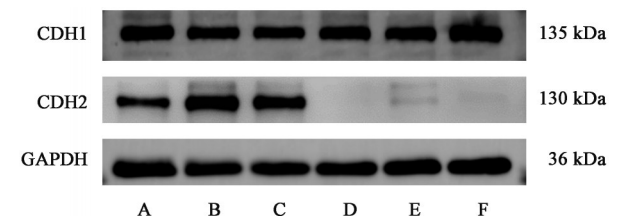
基于基质硬度与 EMT 之间的关系, 将细胞分为 Stiff、Stiff+TGF-β₁组、Stiff+TGF-β₁+ECC-JHF II 组、Soft 组、Soft+TGF-β₁组和 Soft+TGF-β₁+ECC-JHF II 组, Real-time PCR 结果显示, 相对于 Stiff+TGF-β₁组, Soft+TGF-β₁组上皮细胞标志物 CDH1 显著上调 ($P<0.01$), 间质细胞标记物 CDH2 和 VIM 显著下调 ($P<0.01$), 见表 11。实验结果证明, 基质软化可以改善 EMT 进程。相对于 Stiff+TGF-β₁+ECC-JHF II 组, Soft+TGF-β₁+ECC-JHF II 组, 上皮细胞标志物 CDH1 显著上调 ($P<0.01$), 间质细胞标记物 CDH2 和 VIM 明显下调 ($P<0.05, P<0.01$), 见表 11。Western blot 结果与 Real-time PCR 结果一致, 与 Stiff+TGF-β₁+ECC-JHF II 组比较, Soft+TGF-β₁+ECC-JHF II 组, 上皮细胞标志物 CDH1 明显上调 ($P<0.05$), 间质细胞标记物 CDH2 明显下调 ($P<0.05$), 见图 5、表 12。免疫荧光及定量结果显示, 相对于 Stiff+TGF-β₁组, Soft+TGF-β₁组上皮细胞标志物 CDH1 显著上调 ($P<0.01$), 间质细胞标记物 CDH2 显著下调 ($P<0.01$); 相对于 Stiff+TGF-β₁+ECC-JHF II 组, Soft+TGF-β₁+ECC-JHF II 组, 上皮细胞标志物 CDH1 显著上调 ($P<0.01$), 间质细胞标记物 CDH2 明显下调 ($P<0.05$), 见图 6、表 13。这些结果表明, ECC-JHF II 及软基质可以上调肺泡上皮细胞中 CDH1 及下调 CDH2 和 VIM 表达, 抑制 TGF-β₁ 诱导的 EMT。并且, 相对于硬基质加 ECC-JHF II 组, 软基质加 ECC-JHF II 组上调 CDH1

表 11 ECC-JHF II 联合软基质对 A549 细胞 EMT 相关基因 CDH1、CDH2、VIM mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 11 Effect of ECC-JHF II combined with soft matrix on mRNA expressions of EMT-related genes CDH1, CDH2 and VIM in A549 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/mg·L ⁻¹	CDH1	CDH2	VIM
Stiff组		1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
Stiff+TGF-β ₁ 组		0.30±0.05	3.71±0.09	2.74±0.59
Stiff+TGF-β ₁ +ECC-JHF II 组	61.25	1.04±0.17	1.33±0.08	1.20±0.10
Soft组		1.86±0.13	0.49±0.03	0.57±0.12
Soft+TGF-β ₁ 组		1.06±0.16 ¹⁾	2.01±0.4 ¹⁾	1.41±0.13 ¹⁾
Soft+TGF-β ₁ +ECC-JHF II 组	61.25	1.74±0.33 ³⁾	0.53±0.05 ³⁾	0.48±0.07 ²⁾

注:与Stiff+TGF-β₁组比较¹⁾P<0.01;与Stiff+TGF-β₁+ECC-JHF II组比较²⁾P<0.05,³⁾P<0.01(表12-表13、表15同)



注: A. Stiff 组; B. Stiff+TGF-β₁ 组; C. Stiff+TGF-β₁+ECC-JHF II 组; D. Soft 组; E. Soft+TGF-β₁ 组; F. Soft+TGF-β₁+ECC-JHF II 组(图 6、图 8 同)
图 5 ECC-JHF II 联合软基质对 A549 细胞 CDH1、CDH2 蛋白表达的影响

Fig. 5 Effect of ECC-JHF II combined with soft matrix on protein expressions of CDH1 and CDH2 in A549 cells

表 12 ECC-JHF II 联合软基质对 A549 细胞 EMT 相关蛋白 CDH1、CDH2 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 12 Effect of ECC-JHF II combined with soft matrix on expressions of EMT-related proteins CDH1 and CDH2 in A549 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/mg·L ⁻¹	CDH1/GAPDH	CDH2/GAPDH
Stiff组		1.00±0.00	1.00±0.00
Stiff+TGF-β ₁ 组		0.70±0.17	1.69±0.11
Stiff+TGF-β ₁ +ECC-JHF II 组	61.25	1.14±0.43	1.35±0.33
Soft组		1.85±0.11	0.88±0.25
Soft+TGF-β ₁ 组		1.39±0.07 ¹⁾	0.78±0.16 ¹⁾
Soft+TGF-β ₁ +ECC-JHF II 组	61.25	1.77±0.16 ²⁾	0.76±0.12 ²⁾

及下调 CDH2 和 VIM 的表达, 表明软基质增强 ECC-JHF II 抑制 EMT。

3.4 ITG β₁ 参与 ECC-JHF II 与软基质的协同作用, 从而影响 TGF-β₁ 诱导的 EMT 肺组织硬度增加时, 肺泡上皮细胞通过细胞表面的黏附受体感知生物力学信号进而引导细胞行为和功能发生变化。

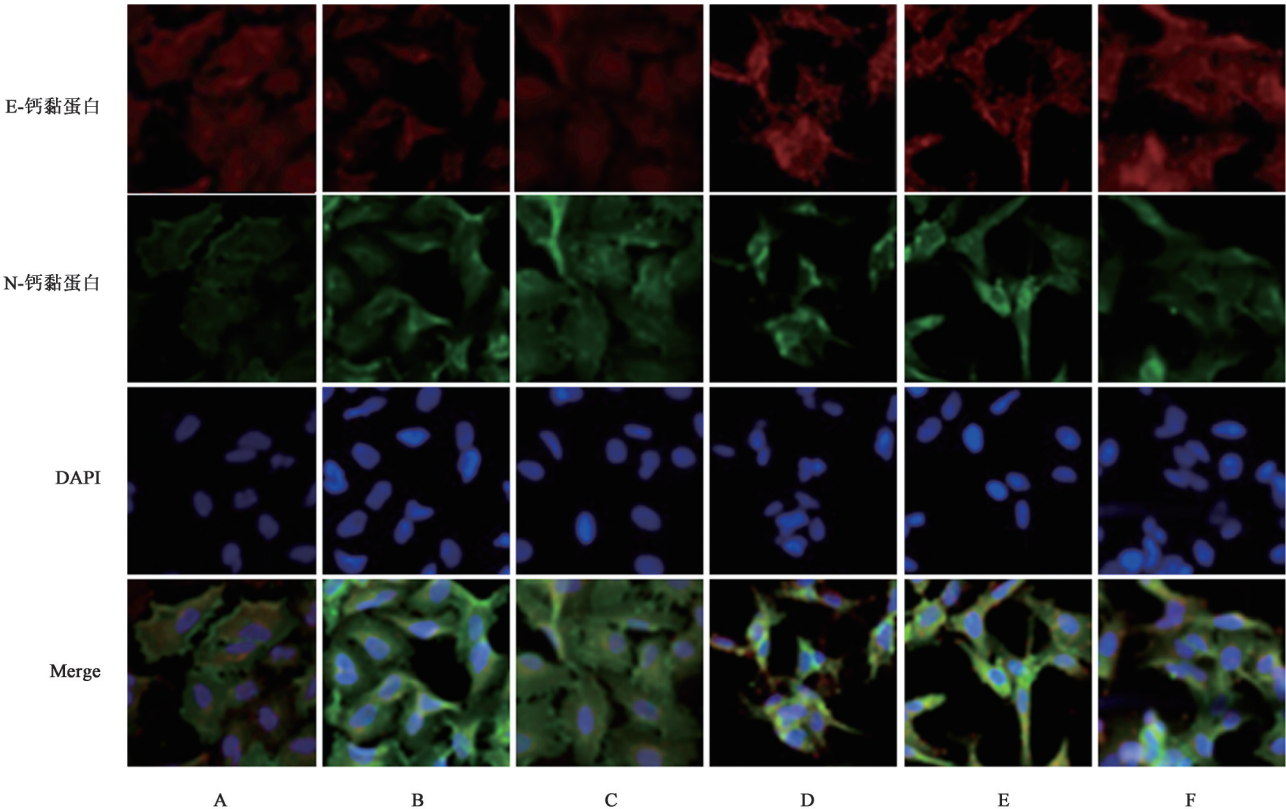


图6 ECC-JHF II及软基质对上皮间质转化标记物CDH1、CDH2荧光强度的影响(免疫荧光,×400)

Fig. 6 Effect of ECC-JHF II and soft matrix on the fluorescence intensity of epithelial-mesenchymal transition markers CDH1 and CDH2 (IF, ×400)

表13 ECC-JHF II联合软基质对A549细胞EMT标志物CDH1、CDH2相对荧光强度的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 13 Effect of ECC-JHF II combined with soft matrix on relative fluorescence intensity of EMT markers CDH1 and CDH2 in A549 cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/mg·L ⁻¹	CDH2	CDH1
Stiff组		7.92±2.78	7.11±1.72
Stiff+TGF-β ₁ 组		13.93±1.29	2.98±1.11
Stiff+TGF-β ₁ + ECC-JHF II组	61.25	9.48±1.89	5.01±1.54
Soft组		6.87±1.73	8.61±1.52
Soft+TGF-β ₁ 组		8.12±3.29 ¹⁾	5.85±1.07 ¹⁾
Soft+TGF-β ₁ + ECC-JHF II组	61.25	6.11±0.82 ²⁾	7.30±1.49 ³⁾

免疫荧光染色结果显示,纤维化小鼠肺组织中ITG β₁升高,而ECC-JHF II治疗后,ITG β₁低表达,并对各组小鼠肺组织进行荧光强度定量,与对照组比较,模型组ITG β₁表达显著升高($P<0.01$),而ECC-JHF II治疗后,ITG β₁表达显著降低($P<0.01$),见图7、表14。对各组小鼠进行Real-time PCR检测,与空白组比较,模型组小鼠ITG β₁显著升高($P<0.01$)。经ECC-JHF II治疗后,ITG β₁显著降低

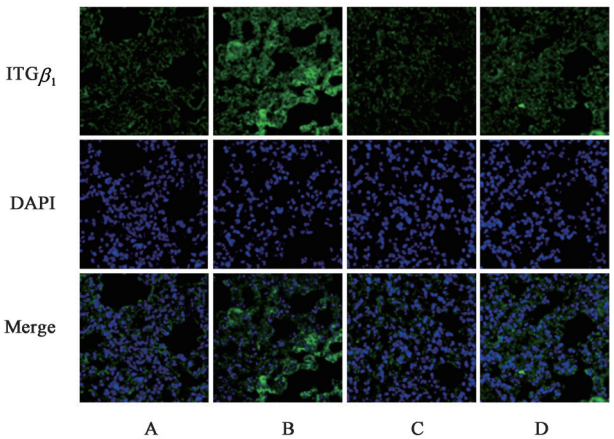


图7 ECC-JHF II对小鼠肺组织ITG β₁荧光表达水平的影响(免疫荧光,×200)

Fig. 7 Effect of ECC-JHF II on fluorescence expression of ITG β₁ in mouse lung tissue (IF, ×200)

($P<0.01$),见表14。实验结果表明,与空白组比较,模型组小鼠肺组织中ITG β₁表达显著升高。相对于模型组,ECC-JHF II及吡非尼酮能够显著降低肺组织中ITG β₁的表达。ECM硬度的改变会通过机械转导将细胞表面的物理信号传递至细胞内部,在不同硬度基质上培养A549后,Real-time PCR结果显示,相对于Stiff+TGF-β₁而言,Soft+TGF-β₁组,ITG β₁

表 14 ECC-JHF II 对小鼠肺组织 ITG β_1 相对荧光强度及 mRNA 表达的影响 ($\bar{x}\pm s$)

Table 14 Effect of ECC-JHF II on relative fluorescence intensity and mRNA expression of ITG β_1 in mouse lung tissue ($\bar{x}\pm s$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	ITG β_1 相对荧光强度(n=6)	ITG β_1 (n=3)
空白组		1.11±1.05	1.00±0.00
模型组		3.66±1.82 ²⁾	1.73±0.26 ²⁾
ECC-JHF II 组	6.82	1.02±0.40 ⁴⁾	0.49±0.07 ⁴⁾
吡非尼酮组	156	1.16±0.70	0.97±0.08

表达显著降低($P<0.01$)。并且,在不同硬度基质上,将 ECC-JHF II 作用于 TGF- β_1 诱导 24 h 后的 A549 显示相对于 Stiff+TGF- β_1 +ECC-JHF II 组,Soft+TGF- β_1 +ECC-JHF II 组 ITG β_1 表达显著降低($P<0.01$),见表 15。Western blot 结果显示,各组蛋白表达与 Real-time PCR 结果一致,相对于 Stiff+TGF- β_1 +ECC-JHF II 组,Soft+TGF- β_1 +ECC-JHF II 组 ITG β_1 表达明显降低($P<0.05$),见图 8、表 15。实验数据共同表明,ECC-JHF II 可降低硬基质上培养的肺泡上皮细胞中 ITG β_1 的表达,表明 ECC-JHF II 可能通过抑制 ITG β_1 的生物力学信号传导从而抑制 EMT。

表 15 ECC-JHF II 联合软基质对 A549 细胞 ITG β_1 mRNA 与蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 15 Effect of ECC-JHF II combined with soft matrix on mRNA and protein expressions of ITG β_1 in A549 cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/mg·L ⁻¹	ITG β_1	ITG β_1 /GAPDH
Stiff 组		1.00±0.00	1.00±0.00
Stiff+TGF- β_1 组		1.79±0.09	1.59±0.27
Stiff+TGF- β_1 + ECC-JHF II 组	61.25	1.09±0.08	1.24±0.21
Soft 组		0.85±0.03	0.71±0.16
Soft+TGF- β_1 组		1.06±0.13 ¹⁾	0.81±0.09 ¹⁾
Soft+TGF- β_1 + ECC-JHF II 组	61.25	0.60±0.08 ³⁾	0.68±0.07 ²⁾

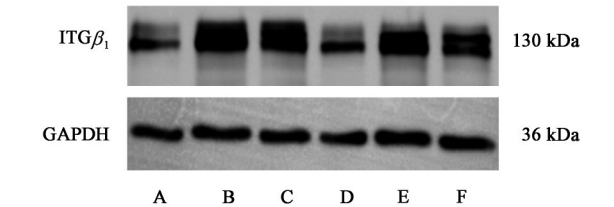


图 8 ECC-JHF II 联合软基质对 A549 细胞 ITG β_1 蛋白表达的影响
Fig. 8 Effect of ECC-JHF II combined with soft matrix on protein expression of ITG β_1 in A549 cells

同时,为了阐明 ITG β_1 在 ECC-JHF II 干预 EMT 中的作用,在硬基质上培养的 A549 细胞中,设计了 siRNA 敲低 ITG β_1 实验,分组为空白组、TGF- β_1 组、

TGF- β_1 +ECC-JHF II 组、TGF- β_1 +si ITG β_1 组、TGF- β_1 +si NC 组、TGF- β_1 +ECC-JHF II +si ITG β_1 组、TGF- β_1 +ECC-JHF II +si NC 组,在排除转染干扰的前提下,实验结果显示,与 si NC 组比较,si ITG β_1 组中各指标表达发生变化,表明敲低 ITG β_1 本身具有一定的生物学效应。在 TGF- β_1 诱导的 EMT 模型中,与 TGF- β_1 联合 siNC 组比较,TGF- β_1 联合 si ITG β_1 组的 EMT 程度变化不显著,提示单纯敲低 ITG β_1 并不能完全抑制 EMT 进程。然而,TGF- β_1 联合 ECC-JHF II 及 si ITG β_1 组与单独 TGF- β_1 组比较,EMT 程度减轻;与 TGF- β_1 联合 ECC-JHF II 组比较,进一步敲低 ITG β_1 仍在一定程度上缓解了 EMT 进程,见表 16。上述结果表明,ECC-JHF II 对 EMT 的抑制作用部分依赖于 ITG β_1 发挥,提示 ITG β_1 可能参与介导该药物发挥作用。进一步在软基质上培养细胞并进行贴壁后分组处理,使用 ITG β_1 特异性激动剂 pyrintegrin 进行干预,分组为空白组、TGF- β_1 组、TGF- β_1 +ECC-JHF II 组、TGF- β_1 +ECC-JHF II +pyrintegrin 组、TGF- β_1 +pyrintegrin 组。实验结果显示,TGF- β_1 +ECC-JHF II +pyrintegrin 组与 TGF- β_1 +ECC-JHF II 组比较,CDH1 的表达显著下调($P<0.01$),而间质细胞标记物 CDH2 和 VIM 则显著上调($P<0.01$)。然而,与 TGF- β_1 组比较,TGF- β_1 +ECC-JHF II +pyrintegrin 组的 EMT 程度减轻,CDH1 的表达明显上调($P<0.05$),CDH2 和 VIM 则显著下调($P<0.01$)。尽管在软基质条件下,pyrintegrin 强行激活 ITG β_1 仍能抵消部分 ECC-JHF II 的药效,但软基质仍提供了额外的保护,抑制了 EMT 的发生,见表 17。上述结果表明,ITG β_1 可能参与 ECC-JHF II 与基质软化的协同作用,发挥抑制 EMT 的作用,同时可能通过其他途径协同作用抑制 EMT。

4 讨论

IPF 病因不明,发病机制复杂,目前有研究表明 TGF- β_1 是诱导 EMT 及 ECM 异常沉积重要的细胞因子,EMT 是肺泡上皮损伤后获得间质表型的关键生物学过程^[30],其通过 Smad 及非 Smad 通路直接启动 EMT。研究发现,ECM 过度沉积导致肺组织硬度增加,肺组织顺应性显著降低^[31],这种力学微环境的异常改变可能会导致 IPF 中 EMT 的持续进展。此外,这种力学微环境的异常与中医“正虚络痹积损”的病机理论具有内在一致性,均强调微环境的病理改变是疾病持续进展的关键基础。课题组前期研究发现,ECC-JHF II 可通过激活核因子 E₂ 相关因子 2(Nrf2) 发挥抗氧化作用^[18]并调控磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激

表16 硬基质上敲低ITG β_1 对ECC-JHF II抑制EMT的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 16 Effect of knocking down ITG β_1 on the inhibition of EMT by ECC-JHF II on hard substrate ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	CDH1	CDH2	VIM	ITG β_1
空白组		1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
TGF- β_1 组		0.30±0.02 ¹⁾	5.83±0.91 ¹⁾	2.39±0.15 ¹⁾	2.94±0.17 ¹⁾
TGF- β_1 +ECC-JHF II组	61.25	0.68±0.06 ²⁾	1.50±0.09 ²⁾	1.24±0.11 ²⁾	1.39±0.17 ²⁾
TGF- β_1 +si ITG β_1 组		0.43±0.18	4.75±0.42	2.21±0.20	0.78±0.10
TGF- β_1 +siNC组		0.32±0.05	4.74±0.23	2.44±0.26	3.38±0.29
TGF- β_1 +ECC-JHF II +siITG β_1 组	61.25	0.28±0.01 ³⁾	1.23±0.05	1.49±0.12	0.42±0.04 ³⁾
TGF- β_1 +ECC-JHF II +siNC组	61.25	0.47±0.09	1.40±0.19	1.24±0.13	1.39±0.14

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.01$;与TGF- β_1 组比较²⁾ $P<0.01$;与TGF- β_1 +ECC-JHF II组比较³⁾ $P<0.01$

表17 软基质上激活ITG β_1 对ECC-JHF II抑制EMT的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 17 Effect of activating ITG β_1 on the inhibition of EMT by ECC-JHF II on soft matrix ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	CDH1	CDH2	VIM	ITG β_1
空白组		1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
TGF- β_1 组		0.51±0.07 ¹⁾	3.39±0.14 ¹⁾	2.33±0.09 ¹⁾	1.51±0.04 ¹⁾
TGF- β_1 +ECC-JHF II组	61.25	1.68±0.15 ³⁾	1.27±0.16 ³⁾	0.81±0.15 ³⁾	0.77±0.05 ³⁾
TGF- β_1 +ECC-JHF II +Pyrintegrin组	61.25	0.78±0.06 ^{2,5)}	2.15±0.32 ^{2,4)}	1.53±0.16 ^{3,5)}	1.31±0.08 ⁵⁾
TGF- β_1 +pyrintegrin组		0.31±0.01	5.37±0.63	3.42±0.09	3.41±0.20

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.01$;与TGF- β_1 组比较²⁾ $P<0.05$,³⁾ $P<0.01$;与TGF- β_1 +ECC-JHF II组比较⁴⁾ $P<0.05$,⁵⁾ $P<0.01$

酶B(P13K/Akt)信号通路抑制成纤维细胞活化,改善肺纤维化^[32]。但其是否通过干预力学信号通路发挥作用尚不明确。本研究借助TGF- β_1 化学因子联合PEG复合水凝胶材料模拟“力-化”耦合在体微环境,采用ECC-JHF II药理学干预与基质软化物理干预两种策略,表征了ECC-JHF II及基质软化对A549细胞模型中CDH1、CDH2、VIM等指标的变化。研究结果显示,与硬基质培养皿比较,软基质PEG复合水凝胶上培养的细胞EMT标志物CDH1表达升高,CDH2和VIM表达降低,表明基质软化可以作为潜在的力治疗发展方向。并且,利用TGF- β_1 诱导的A549细胞EMT模型及博来霉素诱导的动物模型进一步探索ITG β_1 在其中的作用。

生物力学因素^[33]如机械张力升高导致进行性肺纤维化^[34]。在肺纤维化中,ECM的物理特性,尤其是其基质硬度的变化影响重大^[35],基质硬度与TGF- β_1 共同推动EMT进程,二者之间可能存在正反馈。在硬基质上给予TGF- β_1 刺激,免疫荧光结果显示,A549细胞发生典型的EMT改变。而在PEG复合水凝胶构建的软基质上,TGF- β_1 诱导的EMT程度明显减弱,表明基质硬度在TGF- β_1 诱导EMT的过程中发挥重要作用。给予ECC-JHF II与基质软化处理后,EMT表型得到显著逆转。同时,ECC-JHF II或基质软化干预均可降低ITG β_1 的表达和活化水平。在博来霉素诱导的小鼠模型中,ECC-JHF II组小鼠肺组织胶原沉

积减少,肺组织EMT标志物变化趋势与体外一致,同时ITG β_1 表达也相应下调。以上结果表明,ECC-JHF II与基质软化在体内外均可有效逆转TGF- β_1 诱导的EMT,并伴随ITG β_1 表达与活化的抑制。

在肺纤维化过程中,细胞通过机械转导感知并响应ECM硬度的变化,促进EMT和成纤维细胞活化,加速纤维化形成和疾病进展^[36-37]。细胞表面的力学感受器可以将力学微环境的变化进一步转化为生物化学信号,从而调控细胞行为和功能。整合素是由 α 和 β 亚单位组成的异二聚体跨膜蛋白,其介导的机械转导是细胞感知生物力学变化的重要途径。ITG β_1 ^[38]作为纤维化中重要的力敏感蛋白,能够将生物力学信号转化为生物化学信号,进而调控细胞行为。为明确ITG β_1 在EMT进程中的作用,本研究开展了在硬基质上敲低ITG β_1 ,在软基质上激活ITG β_1 等相关实验,结果表明,基质软化与ECC-JHF II通过部分抑制ITG β_1 从而缓解肺泡上皮细胞的EMT进程。

综上,本研究发现,ECC-JHF II不仅能干预经典的生化信号通路,还能重塑纤维化肺组织的病理性力学微环境。其通过降低ECM硬度与胶原过度沉积,减少异常交联,有效逆转了肺组织的基质硬化。这一基质软化效应,本质上是一种针对疾病核心物理特征的力治疗。本研究在体外选用人A549肺泡上皮细胞系作为细胞模型。A549细胞保留了肺泡II型上皮细胞(AT2)的部分关键特征,且具有转染效率高、培养

条件稳定等优势,是EMT及肺纤维化机制研究中广泛认可的经典细胞模型^[29,39-40]。但是,作为永生化细胞系无法完全模拟原代AT2细胞的全部生理特性。因此后续可在其他细胞系或基因敲除小鼠中开展进一步验证,以进一步增强研究结论的普适性与临床相关性。整合素家族作为最主要的力敏感蛋白之一,能介导细胞与硬化ECM间的黏附,并激活下游的黏着斑激酶(FAK)^[41]、Ras同源基因家族蛋白(Rho)/Rho相关卷曲螺旋形成蛋白激酶(ROCK)^[42]等信号通路,促进肌动蛋白骨架重组与细胞收缩,最终通过转录共激活因子Yes相关蛋白(YAP)/具有PDZ结合基序的转录共激活因子(TAZ)的核转位^[43],驱动与EMT、增殖及ECM合成相关基因的持续表达。后续研究仍需要通过体内外模型,进一步研究ITG β_1 下游的具体作用机制。此外,除整合素之外,还有一些机械力敏感蛋白,如Piezo型机械敏感性离子通道组分(Piezo)1/2通道能被机械张力直接激活,其介导的钙内流可迅速触发YAP/TAZ活化与细胞骨架重塑^[44],也有可能在肺纤维化中发挥关键作用。在未来的研究中,可以重点围绕上述局限进行深入探索,以更完整地揭示ECC-JHF II治疗IPF的作用机制,为中医药防治肺纤维化研究提供支撑。

【利益冲突】 本文不存在任何利益冲突。

【参考文献】

- [1] LIU G, PHILP A M, CORTE T, et al. Therapeutic targets in lung tissue remodelling and fibrosis[J]. *Pharmacol Ther*, 2021, 225: 107839.
- [2] MORA A L, ROJAS M, PARDO A, et al. Emerging therapies for idiopathic pulmonary fibrosis, a progressive age-related disease [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2017, 16(11): 755-772.
- [3] SGALLA G, FRANCIOSA C, SIMONETTI J, et al. Pamrevlumab for the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis[J]. *Expert Opin Investig Drugs*, 2020, 29(8): 771-777.
- [4] 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.
- [5] ZHANG C, ZHU X, HUA Y, et al. YY1 mediates TGF- β_1 -induced EMT and pro-fibrogenesis in alveolar epithelial cells[J]. *Respir Res*, 2019, 20(1): 249.
- [6] MARMAI C, SUTHERLAND R E, KIM K K, et al. Alveolar epithelial cells express mesenchymal proteins in patients with idiopathic pulmonary fibrosis[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2011, 301(1): L71-L78.
- [7] LIU T, XU P, KE S, et al. Histone methyltransferase SETDB1 inhibits TGF- β -induced epithelial-mesenchymal transition in pulmonary fibrosis by regulating SNAIL expression and the ferroptosis signaling pathway[J]. *Arch Biochem Biophys*, 2022, 715: 109087.
- [8] GAN C, WANG Y, XIANG Z, et al. Niclosamide-loaded nanoparticles (Ncl-NPs) reverse pulmonary fibrosis in vivo and in vitro[J]. *J Adv Res*, 2023, 51: 109-120.
- [9] CHEN X Y, DONG Y C, YU Y Y, et al. Anthelmintic nitazoxanide protects against experimental pulmonary fibrosis [J]. *Br J Pharmacol*, 2023, 180(23): 3008-3023.
- [10] BURG Y O, LORIOD S, BELTRAMO G, et al. Extracellular lipids in the lung and their role in pulmonary fibrosis[J]. *Cells*, 2022, 11(7): 1209.
- [11] JANOWIAK P, SZYMANOWSKA-NARLOCH A, SIEMIŃSKA A. IPF respiratory symptoms management - current evidence[J]. *Front Med*, 2022, 9: 917973.
- [12] LIU W, HAN X, LI Q, et al. Igaratimod ameliorates bleomycin-induced pulmonary fibrosis by inhibiting the EMT process and NLRP3 inflammasome activation [J]. *Biomed Pharmacother*, 2022, 153: 113460.
- [13] SNIJDER J, PERAZA J, PADILLA M, et al. Pulmonary fibrosis: A disease of alveolar collapse and collagen deposition[J]. *Expert Rev Respir Med*, 2019, 13(7): 615-619.
- [14] BOOTH A J, HADLEY R, CORNETT A M, et al. Acellular normal and fibrotic human lung matrices as a culture system for in vitro investigation[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2012, 186(9): 866-876.
- [15] XIA T, ZHAO R, LIU W, et al. Effect of substrate stiffness on hepatocyte migration and cellular Young's modulus[J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233(9): 6996-7006.
- [16] 李建生, 宋建平. 正虚络痹积损为弥漫性间质性肺疾病的主要病机[J]. *中医杂志*, 2013, 54(1): 23-25.
- [17] LI J S, SONG J P. Zheng Qi deficiency, collateral paralysis and injury accumulation being the main pathogenesis of diffuse interstitial lung disease[J]. *J Tradit Chin Med*, 2013, 54(1): 23-25.
- [18] 李建生. 特发性肺纤维化中医辨证治疗概要[J]. *中医学报*, 2017, 32(6): 929-931.
- [19] LI J S. General situation of idiopathic pulmonary fibrosis treated by Chinese medicine[J]. *Acta Chin Med*, 2017, 32(6): 929-931.
- [20] BAI Y, LI J, ZHAO P, et al. A Chinese herbal formula ameliorates pulmonary fibrosis by inhibiting oxidative stress via upregulating Nrf2[J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9: 628.
- [21] 李建生, 董浩然, 郑万春, 等. 金水缓纤方治疗肺纤维化的组分配伍研究[J]. *中草药*, 2021, 52(13): 3966-3979.
- [22] LI J S, DONG H R, ZHENG W C, et al. Effective component compatibility-based analysis of Jinshui Huanxian formula for treatment of pulmonary fibrosis[J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2021, 52(13): 3966-3979.
- [23] 王晨, 燕苗苗, 邱志广, 等. 金水缓纤方联合针刺对肺纤维化大鼠上皮间质转化及TGF- β_1 /Smad2/3通路的影响[J]. *中医学报*, 2025, 40(8): 1597-1605.
- [24] WANG C, YAN M M, QIU Z G, et al. Effect of Jinshui Huanxian formula with acupuncture on epithelial-mesenchymal transition and TGF- β_1 /Smad2/3 pathway of pulmonary fibrosis rats[J]. *Acta*

- Chin Med, 2025, 40(8): 1597-1605.
- [21] 王唯一. 金水缓纤方调控 AMPK/mTOR 抑制巨噬细胞 M2 极化改善肺纤维化[D]. 郑州: 河南中医药大学, 2024.
- WNAG W Y. Jinshui Huanxian formula improves pulmonary fibrosis by inhibiting M2 polarization of macrophages via modulating AMPK/mTOR signaling. [D]. Zhengzhou: Henan University of Chinese Medicine, 2024.
- [22] 邵文博, 郑佳萍, 赵鹏, 等. 金水缓纤组方 II 抑制脂滴分解抑制巨噬细胞 M2 极化改善肺纤维化[J]. 药学报, 2025, 60(2): 369-378.
- SHAO W B, ZHENG J P, ZHAO P, et al. Effective-compounds of Jinshui Huanxian formula ameliorates pulmonary fibrosis by inhibiting lipid droplet catabolism and thus macrophage M2 polarization[J]. Acta Pharm Sin, 2025, 60(2): 369-378.
- [23] 王搏. 基于调控 VEGF/eNOS 抑制内皮间质转化探讨金水缓纤组方 II 干预肺纤维化机制[D]. 郑州: 河南中医药大学, 2024.
- WANG B. The mechanism of effective-compound compatibility of Jinshui Huanxian formula II inhibit endothelial mesenchymal transition in treatment with pulmonary fibrosis: Via VEGF/eNOS pathway[D]. Zhengzhou: Henan University of Chinese Medicine, 2024.
- [24] 许朋俐, 刘田田. 金水缓纤组方 II 通过调控 SETDB1/Snai1 表观抑制 A549 细胞上皮间质转化[J]. 中医学报, 2022, 37(6): 1269-1277.
- XU P L, LIU T T. ECC-JHF II epigenetic inhibiting A549 cells EMT by regulating SETDB1/Snai1[J]. Acta Chin Med, 2022, 37(6): 1269-1277.
- [25] 李建生, 陈龙飞, 李亚, 等. 扶正通络消积三方分期治疗肺纤维化大鼠疗效评价[J]. 中华中医药杂志, 2021, 36(3): 1671-1676.
- LI J S, CHEN L F, LI Y, et al. Therapeutic evaluation of three formula of Fuzheng Tongluo Xiaoji in rats with pulmonary fibrosis by stages[J]. China J Tradit Chin Med Pharm, 2021, 36(3): 1671-1676.
- [26] 黄继汉, 陈志扬, 郑青山, 等. 药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2004, 9(9): 1069-1072.
- HUANG J H, CHEN Z Y, ZHENG Q S, et al. Dose conversion among different animals and healthy volunteers in pharmacological study[J]. Chin J Clin Pharmacol Ther, 2004, 9(9): 1069-1072.
- [27] XU W, GONG M, HAO M, et al. Quantitative investigation on the Young's modulus of ultrathin amorphous PS films attached to different substrates[J]. J Polym Sci, 2024, 62(10): 2166-2175.
- [28] YUAN R, FAN Q, LIANG X, et al. Cucurbitacin B inhibits TGF- β 1-induced epithelial-mesenchymal transition (EMT) in NSCLC through regulating ROS and PI3K/Akt/mTOR pathways[J]. Chin Med, 2022, 17(1): 24.
- [29] GAUTAM R K, BHARDWAJ S, KUSHWAHA S. Nuciferine inhibits epithelial-mesenchymal transition (EMT) in A549 cells and ameliorates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice via the TGF- β ₁/Smad2/3 signaling pathway[J]. Mol Nutr Food Res, 69(16): e70131.
- [30] INUI N, SAKAI S, KITAGAWA M. Molecular pathogenesis of pulmonary fibrosis, with focus on pathways related to TGF- β and the ubiquitin-proteasome pathway[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(11), 6017.
- [31] RICHELDI L, COLLARD H R, JONES M G. Idiopathic pulmonary fibrosis[J]. Lancet, 2017, 389(10082): 1941-1952.
- [32] 霍静, 李建生, 刘海军, 等. 金水缓纤组方 II 调控 PI3K/Akt 通路抑制 TGF- β ₁ 诱导的人胚肺成纤维细胞活化[J]. 中药材, 2023, 46(10): 2558-2565.
- HUO J, LI J S, LIU H J, et al. Inhibition of Jinshui Huanxian formula II on TGF- β ₁-induced activation of human embryonic lung fibroblasts by PI3K/Akt pathway[J]. J Chin Med Mater, 2023, 46(10): 2558-2565.
- [33] MARCHIONI A, TONELLI R, CERRI S, et al. Pulmonary stretch and lung mechanotransduction: Implications for progression in the fibrotic lung[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(12): 6443.
- [34] WU H, YU Y, HUANG H, et al. Progressive pulmonary fibrosis is caused by elevated mechanical tension on alveolar stem cells[J]. Cell, 2020, 180(1): 107-121.
- [35] LI X N, LIN Y P, HAN M M, et al. Modulating fibrotic mechanical microenvironment for idiopathic pulmonary fibrosis therapy[J]. Adv Mater, 2024, 36(50): e2407661.
- [36] HILL C, JONES M G, DAVIES D E, et al. Epithelial-mesenchymal transition contributes to pulmonary fibrosis via aberrant epithelial/fibroblastic cross-talk[J]. J Lung Health Dis, 2019, 3(2): 31-35.
- [37] ZHOU Y, HOROWITZ J C, NABA A, et al. Extracellular matrix in lung development, homeostasis and disease[J]. Matrix Biol, 2018, 73: 77-104.
- [38] ZHAO X K, CHENG Y, LIANG CHENG M, et al. Focal adhesion kinase regulates fibroblast migration via integrin beta-1 and plays a central role in fibrosis[J]. Sci Rep, 2016, 6: 19276.
- [39] LIU Y, SU C Y, YAN Y Y, et al. Exosomes of A549 cells induced migration, invasion, and EMT of BEAS-2B cells related to let-7c-5p and miR-181b-5p[J]. Front Endocrinol, 2022, 13: 926769.
- [40] NURMAGAMBETOVA A, MUSTYATSA V, SAIDOVA A, et al. Morphological and cytoskeleton changes in cells after EMT[J]. Sci Rep, 2023, 13(1): 22164.
- [41] SUN H, CALLE E, CHEN X, et al. Fibroblast engraftment in the decellularized mouse lung occurs via a β ₁-integrin-dependent, FAK-dependent pathway that is mediated by ERK and opposed by Akt[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2014, 306(6): L463-L475.
- [42] HTWE S S, CHA B H, YUE K, et al. Role of Rho-associated coiled-coil forming kinase isoforms in regulation of stiffness-induced myofibroblast differentiation in lung fibrosis[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2017, 56(6): 772-783.
- [43] DUPONT S, MORSUT L, ARAGONA M, et al. Role of YAP/TAZ in mechanotransduction[J]. Nature, 2011, 474(7350): 179-183.
- [44] ZHENG M, YAO Y, BORKAR N A, et al. Piezo channels modulate human lung fibroblast function[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2024, 327(4): L547-L556.

[责任编辑 周冰冰]