DOI:10.13210/j.cnki.jhmu.20240911.002
网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/46.1049.R.20240911.1834.004

金水缓纤方调控CD38/NAD$^+$-SIRT1轴延缓AEC2s细胞衰老抗肺纤维化的机制研究

蔡 宇[1],王 宇[1],沈俊岭[2],游梦月[1],韩瑞婷[2],余海滨[1,2]✉
(1.河南中医药大学,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,河南 郑州 450046;2.河南中医药大学第一附属医院呼吸科,河南 郑州 450000)

[**摘要**] **目的**:探讨金水缓纤方通过CD38/NAD$^+$-SIRT1轴调控AEC2s细胞衰老抗肺纤维化的作用机制。**方法**:将SD大鼠随机分为空白对照组、模型组、金水缓纤方组、阳性对照组和CD38抑制剂组,每组10只。采用气管滴注博来霉素诱导大鼠肺纤维化模型;造模后28 d开始灌胃给药,每日1次,连续给药14 d后取材;采用H&E、Masson染色法观察、评估肺组织炎症和纤维化程度;免疫组化法评估肺组织中αSMA、COLⅢ的蛋白表达情况。免疫荧光法检测大鼠肺组织中p21及SPC的表达;β-半乳糖苷酶(SA-β-gal)染色法测定肺组织细胞衰老情况;QPCR检测*IL-1α*、*IL-8*、*P53*、*P21*、*CD38*、*SIRT1*基因水平变化。Western blot法测定肺组织中E-cad、N-cad、p21、p53、CD38、SIRT1的蛋白表达。采用WST-8法检测肺组织中NAD$^+$的表达水平。**结果**:与空白组比较,模型组的肺组织中炎症及纤维化评分均显著升高;αSMA、COLⅢ蛋白表达显著增加,提示大鼠肺组织纤维化的发生。肺组织N-cad蛋白表达显著上调,E-cad蛋白表达下降,提示肺组织发生了上皮间质转化;肺组织呈现显著SA-β-gal蓝染增多,p53、p21 mRNA水平及蛋白表达显著增加,*IL-1α*、*IL-8* mRNA水平显著上调,肺组织中衰老细胞积累并高表达衰老蛋白及衰老相关分泌表型;同时,免疫荧光结果显示,p21与SPC共表达,p21高表达于AEC2s中。组织CD38 mRNA水平及蛋白表达显著增加,SIRT1 mRNA水平及蛋白表达显著下调,NAD$^+$表达水平显著下降,提示肺纤维化的中可能伴随着NAD$^+$的消耗。与模型组相比,各给药组肺组织中炎症及纤维化评分均明显降低,αSMA、COLⅢ蛋白表达显著下降;N-cad蛋白表达显著下调,E-cad蛋白增加;肺组织SA-β-gal蓝染明显减轻,细胞衰老程度得到明显改善,p53、p21、IL-1α、IL-8衰老相关基因及蛋白水平明显下调;CD38 mRNA水平及蛋白表达下降,SIRT1表达水平及组织NAD$^+$表达水平上升。**结论**:金水缓纤方能够减轻博来霉素诱导的大鼠肺纤维化及肺组织炎症反应,改善胶原沉积,可能与调控CD38表达,提高组织细胞NAD$^+$水平,激活SIRT1蛋白,延缓组织AEC2s细胞衰老有关。

[**关键词**] 金水缓纤方;肺纤维化;细胞衰老;CD38/NAD$^+$-SIRT1;Ⅱ型肺泡上皮细胞
[**中图分类号**] R285.5 [**文献标志码**] A [**文章编号**] 2097-5953(2025)15-1153-10

Mechanism of Jinshui Huanxian Formula in regulating CD38/NAD$^+$-SIRT1 axis to delay AEC2s cell senescence and alleviate-pulmonary fibrosis

CAI Yu[1], WANG Yu[1], SHEN Junling[2], YOU Mengyue[1], HAN Ruiting[2], YU Haibin[1,2]✉
(1. *Henan University of Chinese Medicine, Co-construction Collaborative Innovation Center for Chinese Medicine and Respiratory Diseases by Henan & Education Ministry of China, Henan Key Laboratory of Chinese Medicine for Respiratory Diseases, Zhengzhou* 450046, *China*; 2. *Department of Pulmonology, the First Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou* 450000, *China*)
[*Foundation Project*]: *This study was supported by the Major Special Project of Traditional Chinese Medicine Research in Henan Province* (2022*ZYZD*04), *Special Project of Collaborative Innovation Center of Zhengzhou* (2023*XTCX*043); *Natural Science Foundation of Henan Province* (222300420221)*and Scientific Research Program of Traditional Chinese Medicine in Henan Province* (2021*JDZY*102)
[*Author*]: *CAI Yu, E-mail: Caiyu*67328@163.*com.*
[*Correspondence to*]: *YU Haibin, Chief Physician, Master's Supervisor, E-mail: yhbzzz*@163.*com.*
Received: 2024-04-18 *Revised*: 2024-08-27 *JHMU*, 2025;31(15):1153-1162

[基金项目]河南省中医药研究重大专项资助项目(2022ZYZD04);郑州市协同创新中心专项资助项目(2023XTCX043);河南省自然科学基金资助项目(222300420221);河南省中医药科学研究专项资助项目(2021JDZY102)
[作者简介]蔡宇,E-mail: Caiyu67328@163.com。
[通讯作者]余海滨,主任医师,硕士生导师,E-mail:yhbzzz@163.com。
[收稿日期]2024-04-18 [修回日期]2024-08-27 网络出版时间:2024-09-12 11:39:49

View from specialist: It is creative, and of certain scientific and educational value.

[Abstract] **Objective**: To investigate the mechanism of Jinshui Huanxian Formula (JHF) regulating AEC2s cell senescence and alleviating-pulmonary fibrosis through CD38/NAD^+-SIRT1 axis. **Methods**: SD rats were randomly divided into a blank control group, a model group, a JHF group, a positive control group, and a CD38 inhibitor group, with 10 rats in each group. A rat model of pulmonary fibrosis was induced by intratracheal instillation of bleomycin. On the 28th day after modeling, the rats were treated with intragastric administration of drugs, once a day for 14 consecutive days. H&E and Masson staining were used to observe and evaluate the degree of inflammation and fibrosis in lung tissue. The protein expression of αSMA and COLⅢ in lung tissue was evaluated by immunohistochemistry. Immunofluorescence was used to detect the expression of p21 and SPC in lung tissue. Cell senescence in lung tissue was determined by β-galactosidase (SA-β-gal) staining. The mRNA levels of *IL-1α*, *IL-8*, *P53*, *P21*, *CD38*, and *SIRT1* were detected by QPCR. Western Blot was used to measure the protein expression of E-cad, N-cad, p21, p53, CD38, and SIRT1 in lung tissue. The expression of NAD^+ in lung tissue was detected by WST-8 method. **Results**: Compared to the blank group, the inflammation and fibrosis scores in the lung tissue of the model group were significantly increased. The protein expressions of αSMA and COLⅢ were significantly increased, suggesting the occurrence of lung fibrosis in rats. The expression of N-cad protein in lung tissue was significantly up-regulated, and the expression of E-cad protein was decreased, suggesting that epithelial-mesenchymal transition occurred in lung tissue. SA-β-gal blue staining, p53 and p21 mRNA and protein expression, and *IL-1α* and *IL-8* mRNA expression were significantly increased in lung tissue. Senescent cells accumulated and highly expressed senescence-associated secretory phenotype in lung tissue. Immunofluorescence results showed that p21 was co-expressed with SPC, and p21 was highly expressed in AEC2s. The expression of CD38 mRNA and protein was significantly increased, the expression of SIRT1 mRNA and protein was significantly decreased, and the expression of NAD^+ was significantly decreased, suggesting that the consumption of NAD^+ may be accompanied by pulmonary fibrosis. Compared to the model group, the inflammation and fibrosis scores in the lung tissue of the treatment groups were significantly decreased, and the expression of αSMA and COLⅢ protein was significantly decreased. The expression of N-cad protein was significantly down-regulated and E-cad protein was increased. SA-β-gal blue staining in lung tissue was significantly reduced, the degree of cell senescence was significantly improved, and the expression levels of senescence-related genes and proteins of p53, p21, IL-1α, and IL-8 were significantly down-regulated. The expression of CD38 mRNA and protein decreased, while the expression of SIRT1 and tissue NAD^+ increased. **Conclusion**: Jinshui Huanxian Formula can reduce bleomycin-induced pulmonary fibrosis and inflammatory response in lung tissue of rats, improve collagen deposition, which may be related to regulating CD38 expression, increasing NAD^+ level, activating SIRT1 protein, and delaying AEC2s cell senescence.

[Key words] Jinshui Huanxian Formula; Pulmonary fibrosis; Cellular senescence; CD38/NAD^+-SIRT1; Type Ⅱ alveolar epithelial cells

肺纤维化(Pulmonary fibrosis,PF)是一种病因不明的破坏性间质性肺病,由多种肺部损伤引起,其特征是肺部不同程度的炎症和纤维化[1]。PF的发生发展机制与多种细胞的损伤及相互作用,引起肺组织微环境中慢性炎症的持续存在及组织异常修复相关。其中细胞衰老的发生,尤其是Ⅱ型肺泡上皮细胞(AEC2s)衰老是PF发展的关键机制[2]。PF中存在多种衰老细胞及衰老相关标志物的积累,它们不断驱动着PF的发生和加重,衰老生物标志物的变化水平在一定程度上体现了患者的疾病状态及生活质量,而清除组织衰老细胞能够抑制肺损伤的进一步加重[3,4]。

肺泡上皮细胞分为Ⅰ型肺泡上皮细胞(AEC1s)和AEC2s,AEC2s能够分化为AEC1s,承担肺组织的再生和修复功能,并通过分泌表面活性物质、招募效应免疫细胞等维持组织微环境稳态[5]。AEC2s再生失败是PF的主要特征。研究发现,BLM会引起细胞DNA损伤并激活AEC2s中p53信号传导,导致AEC2s分化到AEC1s过渡状态的持续[6]。从PF患者肺组织中分离的AEC2s表现出了衰老的转录组学特征[7]。烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD)是一种能量代谢的必需辅酶,在组织细胞衰老的过程中伴随着氧化形式的NAD(NAD^+)水平的下降[8]。目前的研究表明NAD的代谢水平受其水解酶CD38及依赖于NAD的沉默信息调节因子(SIRTs)调节。CD38作为主要的NAD水解酶,它能够通过调控组织NAD^+水平调控细胞衰老。CD38在PF肺组织中的表达增加,其表达水平与年龄及PF程度呈正相关,它能够通过降低NAD^+水平和sirtuin蛋白(SIRTs)活性以增强细胞纤维化反应[9,10]。SIRTs是一组NAD依赖的去乙酰化酶,决定着细胞组蛋白、关键转录因子和代谢酶的乙酰化状态,能够调节细胞衰老、增殖、分化、能量代谢和其他功能[11]。SIRT1是一种有效的内源性抗纤维化蛋白,可以去乙酰化组蛋白、p53等多个靶点,提高NAD^+水平,在博来霉素诱导的PF中表达降低[12]。PF中AEC2s的损伤衰老可能与CD38高表达,损耗NAD^+,抑制SIRT1活性相关。

PF在中医理论中被归属为“肺痿”“肺痹”等范畴,病因病机是由于肺气虚损、痰瘀积聚从而导致

肺失濡养的过程，主要病位在肺脏[13]。金水缓纤方（JHF）是李建生教授根据“正虚络痹积损”的主要病机拟定的，具有补益肺肾、止咳平喘的功效，对疾病晚期疗效较为显著[14]。它被证明能有效改善患者PF，提高患者生存质量，能抑制肺成纤维细胞的异常激活、减少组织胶原沉积，对TGF-β1诱导的成纤维细胞α-平滑肌肌动蛋白（α-SMA）和纤连蛋白1表达具有明显的抑制作用，减少组织上皮间质转化，并可降低组织细胞内的氧化应激反应[15,16]。前期研究已经表明JHF及其组分方能够通过多机制多靶点减轻PF程度，但是对改善PF中AEC2s细胞损伤的作用及机制尚不清楚。因此，基于以上研究，本课题组探讨了PF中AEC2s细胞衰老的机制及JHF的保护作用。

1 材料与方法

1.1 动物

SD大鼠50只；雄性；SPF级；6～8周龄，180～230 g。购自北京维通利华实验动物技术有限公司，生产许可证号：SCXK（浙）2019-0001。本实验经河南中医药大学第一临床医学院实验动物伦理委员会批准，伦理批文号：YFYDW2022016。

1.2 药物及试剂

JHF由陈皮、麦冬、瓜蒌皮、浙贝母、炒白果仁、牡丹皮、炙甘草各9 g；熟地黄12 g；炙淫羊藿、人参各6 g组成，每副共87 g。所有中药饮片购自河南中医药大学大一附属医院；采用水提醇沉法制备为JHF药粉，每g含2.81 g生药量。盐酸博来霉素（HJ20171103）购自日本化药株式会社，15 mg/支；吡非尼酮（H20133376）购自北京康蒂尼药业有限公司，100 mg/粒，54粒/盒；β-半乳糖苷酶染色试剂盒（G1073）、免疫组化及免疫荧光相关试剂购自武汉塞维尔公司；E-cad antibody（GTX10443）、N-cad antibody（GTX127345）购自GenTeX公司；p21 antibody（10355-1-AP）、GAPDH antibody（10355-1-AP）、Anti-Rabbit Recombinant Secondary Antibody（RGAR001）由武汉三鹰生物有限公司提供；p53 antibody（WL01919）购自万类生物；CD38 antibody（ER1905-91）由华安生物提供；MonScriptTM RT Ⅲ All-in-One Mix（MR05401）、MonAmpTM miRNA Universal Super Specificity qPCR Mix（MQ00901）购自莫纳生物科技有限公司。

1.3 主要仪器

高速低温组织研磨仪（Servicebio，武汉）；电子秤（METTLER TOLEDO，德国）；Hiclave HVE-50高压灭菌锅（Hirayama，日本）；精密恒温培养箱（一恒，上海）；BioTek多功能酶标仪（BioTek，美国）；CJ-2F型超净工作台（Thermo，MA，USA）；Quant-Studio 6型实时荧光定量聚合酶链式反应（Real-time PCR）仪（ABI公司，美国）；WIX-EP600通用电泳仪电源（韦克斯，北京）；ChemiDoc MP全能成像系统（BIO-RAD，NC，USA）；Pannoramic DESK组织切片数字扫描仪（3D HISTECH，匈牙利）。

1.4 分组、模型复制及给药

采用Excel软件中“RAND（ ）”函数，将大鼠随机分为空白组（Control组）、博来霉素组（BLM组）、JHF组、吡非尼酮组（PFD组）、78c抑制剂组（78c组），10只/组。以一次性气管滴注博来霉素造模（3 mg/kg）的方式对40只造模组进行造模；空白组予生理盐水滴注；造模28 d后开始灌胃给药，根据Meeh-Rubner体表面积计算公式换算实验动物给药剂量，JHF组7.83 g·kg^{-1}·d^{-1}生药量进行灌胃给药；阳性对照组给予吡非尼酮108 mg·kg^{-1}·d^{-1}灌胃给药，78c组给予抑制剂15 mg·kg^{-1}·d^{-1}灌胃给药；Control组及BLM组予生理盐水灌胃；连续给药14 d，每日1次，见图1

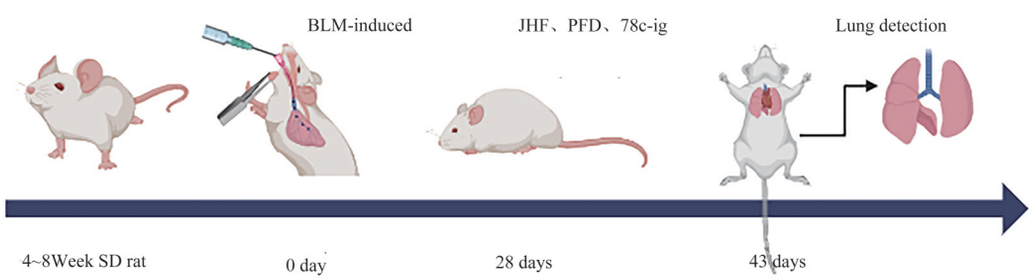


图1 实验流程图

Fig 1 Experimental flowchart

1.5 肺组织取材及处理

末次给药后次日处死大鼠，取新鲜肺组织，将右肺分离并分装于冻存管内，－80 ℃冻存。左肺用4% 多聚甲醛灌注后，固定48 h。常规石蜡包埋切片处理后，分别进行H&E、Masson染色，观察并采集图像；按照Szapiel和Ashcroft评分评估肺泡炎症及纤维化程度。

1.6 免疫组织化学法检测肺组织中α-SMA、COLⅢ表达水平

将大鼠肺组织石蜡切片常规脱蜡至水，进行抗原修复后，切片放入3% 双氧水溶液，室温避光孵育25 min以阻断内源性过氧化物酶。3% BSA封闭1 h，一抗孵育过夜；次日二抗孵育50 min，滴加显色液显色，苏木素复染3 min，分化液分化后，封片液封片；观察并采集图像。根据阳性面积/组织面积×100% 的计算公式，使用Image pro plus分析计算组织阳性面积比。

1.7 免疫荧光法检测大鼠肺组织中p21与SPC的表达

将切片浸入1%Triton-X100溶液中孵育30 min破膜；PBS清洗后滴加10% 山羊血清，37 ℃，封闭30 min；弃去封闭液，滴加不同种属来源的一抗（p21及SPC），4 ℃过夜；次日取出，室温放置45 min使得一抗结合更紧密，PBS洗涤3次；滴加与一抗相对应的荧光二抗孵育1 h进行；DAPI染液复染细胞核5 min；PBS清洗；封片液封片，观察并采集图像。使用ImageJ计算阳性表达荧光强度及共定位分析。

1.8 β-半乳糖苷酶（SA-β-gal）染色法测定肺组织细胞衰老情况

在组织切片中肺组织区域加入50 μL的SA-β-gal染色固定液，充分覆盖住肺组织；室温下固定15 min；按说明书比例配制相应量的染色工作液，每个切片滴加30 μL，用保鲜膜封闭后于37 ℃孵育过夜；次日弃去工作液，封片。观察并采集图像，阳性表达为深蓝色。使用Image pro plus图像数据分析系统分析并计算阳性表达面积。

1.9 WST-8法检测肺组织中NAD^+水平

NAD^+/NADH比值测定试剂盒（S0175）由碧云天生物技术有限公司提供。根据说明书对大鼠肺组织进行处理及检测。

1.10 Western blot法测定肺组织中蛋白表达

研磨管中加入大鼠肺组织与高效RIPA蛋白裂解液混合，在高速低温组织研磨仪中研磨匀浆；4 ℃、12 000 r/min离心15 min，取上清液待检。BCA蛋白定量法检测蛋白浓度并进行蛋白定量。蛋白变性后，行SDS-PAGE凝胶电泳，再转膜至PVDF膜。室温下5% 脱脂奶粉封闭2 h；加入一抗兔单克隆抗体，4 ℃孵育过夜。次日回收一抗，TBST洗膜；加入二抗，室温孵育1 h；回收二抗，常规洗膜，配制ECL显色液进行显色并扫描。ImageJ软件统计各蛋白条带灰度值，以GAPDH为内参进行半定量分析。

1.11 QPCR检测肺组织基因表达

使用RNAiso Plus RNA分离程序提取大鼠肺组织的总RNA。使用MonScriptTM RT Ⅲ All-in-One Mix按照说明书合成cDNA第一链。使用MonAmpTM miRNA Universal Super Specificity qPCR Mix和特异性基因引物对每个cDNA样本进行三份的实时PCR反应。使用QuantStudio 6实时系统（新加坡Life Technologies公司）进行PCR扩增，如下：酶在94 ℃活化510 min，然后40个循环，每个循环包括在94 ℃活化10 s，60℃活化30 s。所有值均以内源性GAPDH的转录为标准，并使用$2^{-\Delta\Delta Ct}$方法计算每个目的基因表达的平均倍数变化。实验所需引物由点睛科技设计合成，见表1。

表1 引物序列

Tab 1 Primer sequences

Primer name	Primer species	Primer sequence (5′-3′)
IL-1α	Rat	F:ATCAGCACCTCACAGCTTCC
		R:TCTCCTCCCGATGAGTAGGC
IL-8	Rat	F:CCACACTCAAGAATGGTCGC
		R:ACTTGGGGACACCCTTTAGC
p21	Rat	F:ACGAAACAGGCTCAGGAGTTAG
		R:AAGGCATCGTCAACACCCTGT
p53	Rat	F:CGCTTCGAGATGTTCCGAGA
		R:TCTGAGTCAGGCCCCACTTT
CD38	Rat	F:AGCACCTTTGGAAGTGTGGA
		R:AGGGGCTCGAACATGCATTA
SIRT1	Rat	F:AGGGAACCTCTGCCTCATCT
		R:TGGCATACTCGCCACCTAAC

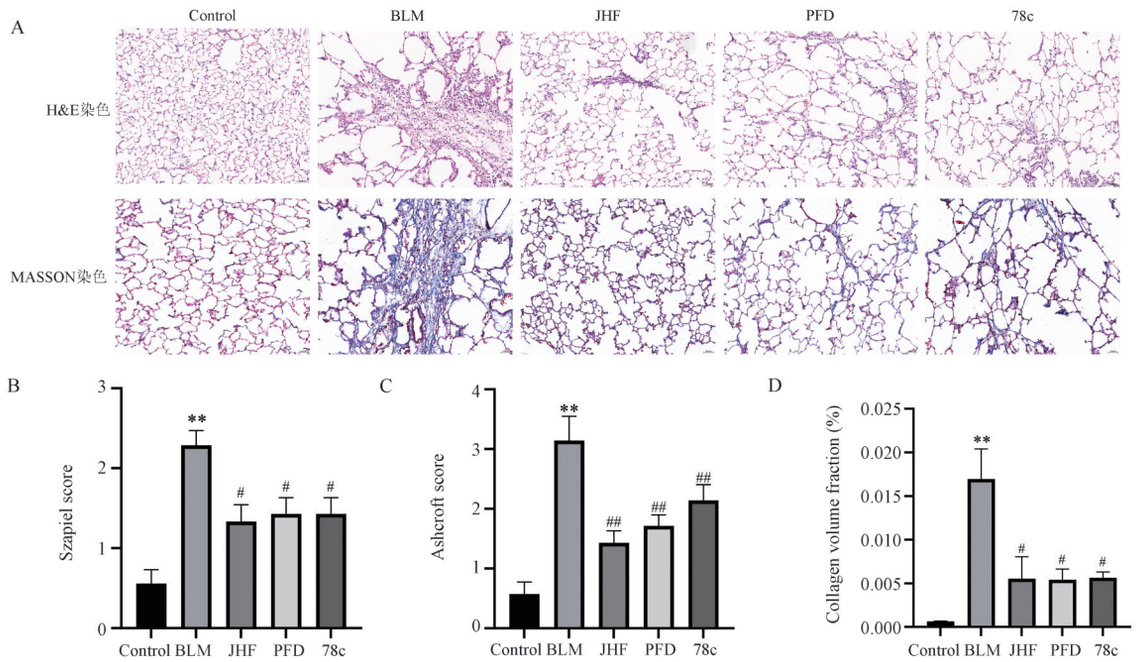
1.12 统计学处理

采用GraphPadPrism8.0.1统计软件进行数据分析；计量资料以均数±标准差（$\bar{x}\pm s$）表示；多组间比较采用单因素方差分析，两两比较采用*LSD-t*检验；$P<0.05$为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 金水缓纤方显著改善了大鼠肺组织的炎症及纤维化水平

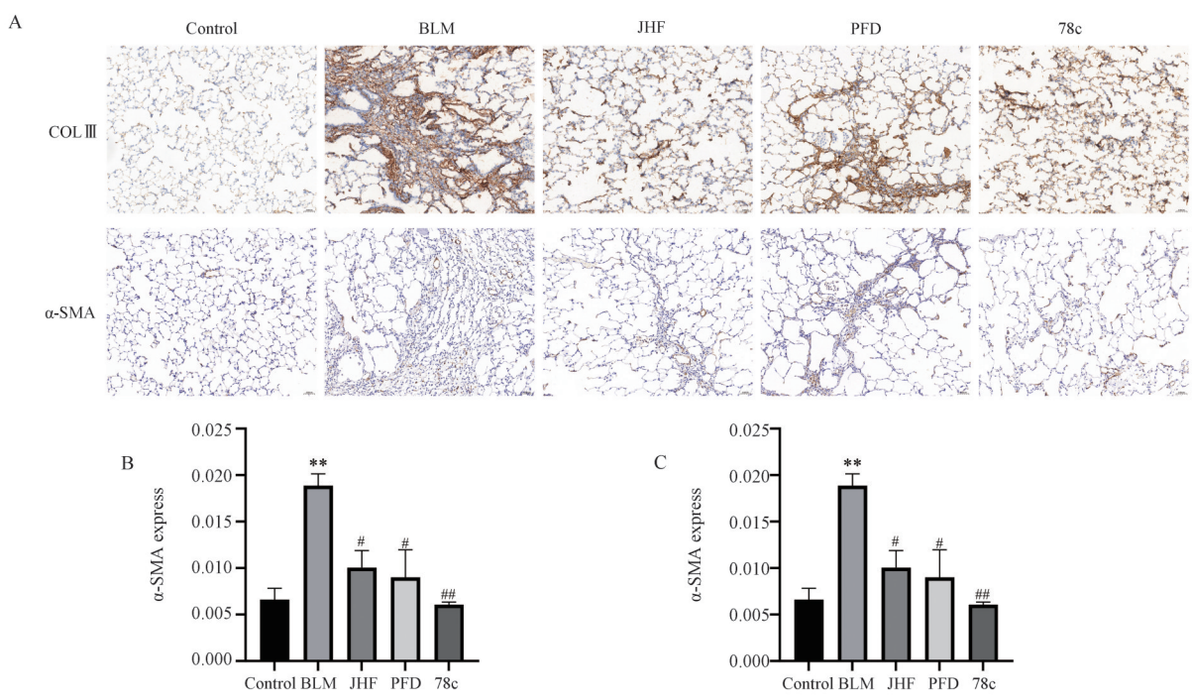
H&E及Masson结果显示，与Control组相比，



A:各组大鼠肺组织H&E、Masson染色病理图片(200×);B:各组大鼠肺组织Szapiel评分(F=10.96,P<0.01);C:各组大鼠肺组织Ashcroft评分(F=12.88,P<0.01);D:各组大鼠肺组织胶原容积分数(F=8.967,P<0.01)。n=3,与Control组比,$^{**}P$<0.01;与BLM组比,$^{\#}P$<0.05,$^{\#\#}P$<0.01

图2 大鼠肺组织H&E、Masson染色病理图片及评分

Fig 2 Pathological images and scores of H&E and Masson staining in lung tissues of rats



A:αSMA、COLⅢ免疫组化200×;B:各组大鼠肺组织中αSMA相对表达量(F=8.665,P<0.01);C:各组大鼠肺组织中COLⅢ相对表达量(F=8.278,P<0.01)。n=3,与Control组比,$^{**}P$<0.01;与BLM组比,$^{\#}P$<0.05,$^{\#\#}P$<0.01

图3 大鼠肺组织免疫组化病理图片(200×)及αSMA、COLⅢ相对蛋白表达

Fig 3 Immunohistochemistry images (200×) and relative protein expression of αSMA and COLⅢ in lung tissues of rats

BLM组大鼠肺组织中肺泡结构被破坏,有明显的纤维组织增生,并可见大量炎性细胞浸润。肺组织中出现大量胶原沉积,组织纹理紊乱,肺泡壁增厚,炎性及纤维化评分显著升高,肺组织胶原容积分数

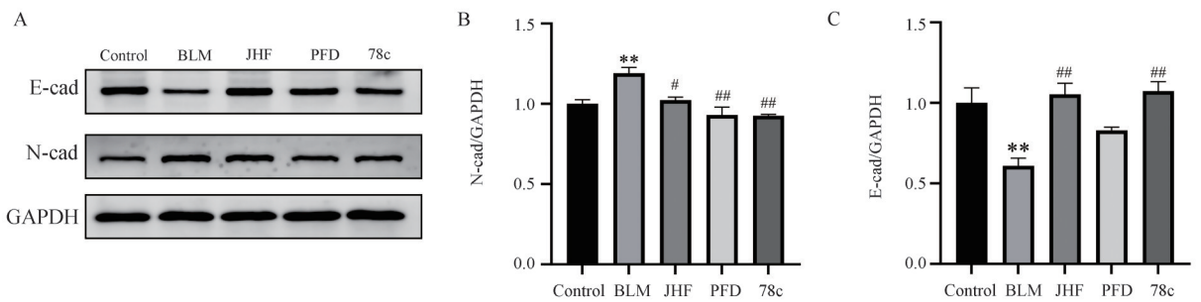
（CVF）显著增加（$P<0.05$）。与BLM组相比较，JHF组及78c抑制剂组大鼠肺组织炎症及纤维化程度均得到一定程度缓解，大鼠肺组织结构逐渐恢复，炎性及纤维化评分、CVF均显著降低（$P<0.05$），见图2。

2.2　JHF显著改善肺组织胶原沉积

免疫组化结果显示，与Control组比较，BLM组大鼠肺组织中α-SMA、COLⅢ的积累，相对阳性表达水平均显著升高（$P<0.01$）。与BLM组比较，JHF组和78c组大鼠肺组织中二者阳性表达水平均显著降低（$P<0.05$）。说明JHF干预及抑制CD38表达均能显著改善组织胶原沉积，见图3。

2.3　JHF显著改善了PF中的上皮细胞损伤

通过Western blot进一步评估JHF对AECs的保护作用。结果显示，与Control组相比，BLM组大鼠肺组织中E-cad蛋白表达显著降低，N-cad水平显著升高（$P<0.05$）。而与BLM组相比，JHF组和78c组均显著抑制了N-cad的表达同时提高了E-cad的表达水平（$P<0.05$），见图4。



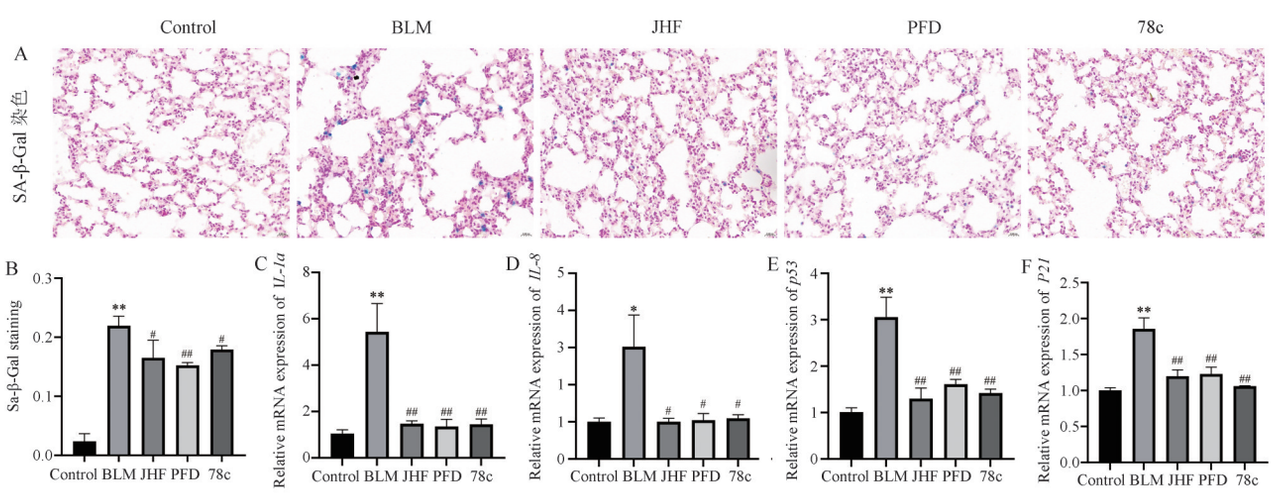
A：各组大鼠肺组织中E-cad、N-cad蛋白表达情况；B：N-cad相对蛋白表达量（$F=12.09$，$P<0.01$）；C：E-cad相对蛋白表达量（$F=9.765$，$P<0.01$）。$n=3$，与Control组比，$^{**}P<0.01$；与BLM组比，$^{\#}P<0.05$，$^{\#\#}P<0.01$

图4　大鼠肺组织中E-cad、N-cad蛋白的表达水平

Fig 4　Expression levels of E-cad and N-cad proteins in rat lung tissues

2.4　JHF显著改善肺组织中AEC2s细胞衰老

SA-β-Gal染色结果显示，Control组大鼠肺组织中未见衰老细胞积累，与Control组相比，BLM组细胞可见多处细胞蓝染，衰老细胞积累；*IL1α*、*IL-8* mRNA水平、*p21*、*p53* mRNA水平显著增加；与BLM组相比，JHF组及78c组中组织细胞蓝染显著减少；*IL1α*、*IL-8* mRNA水平、*p21*、*p53* mRNA水平显著下调（$P<0.05$），见图5。p21、p53蛋白表达水

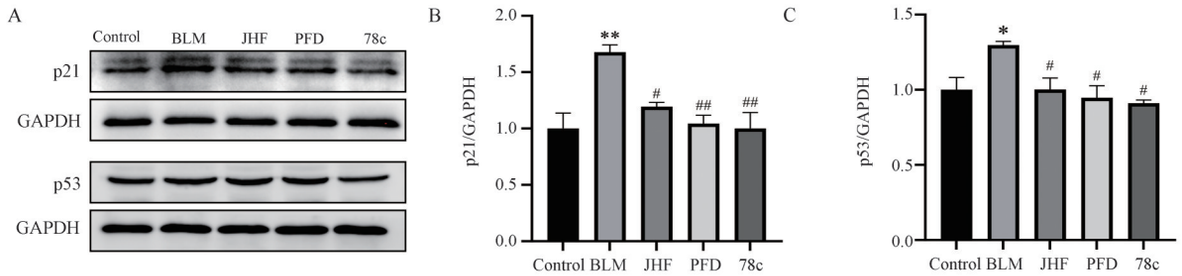


A：SA-β-Gal染色病理图片400×，衰老细胞呈蓝色；B：SA-β-Gal相对表达量（$F=59.4$，$P<0.01$）；C：*IL-1α* mRNA表达（$F=10.14$，$P<0.01$，$n=4$）；D：*IL-8* mRNA表达（$F=4.977$，$P<0.01$，$n=4$）；E：*p53* mRNA表达水平（$F=13.63$，$P<0.01$，$n=3$）；F：*p21* mRNA表达（$F=12.15$，$P<0.01$，$n=3$）。与Control组比，$^{**}P<0.01$；与BLM组比，$^{\#}P<0.05$，$^{\#\#}P<0.01$

图5　SA-β-Gal染色（400×）及衰老相关mRNA表达

Fig 5　SA-β-Gal staining（400×）and senescence-related mRNA expression

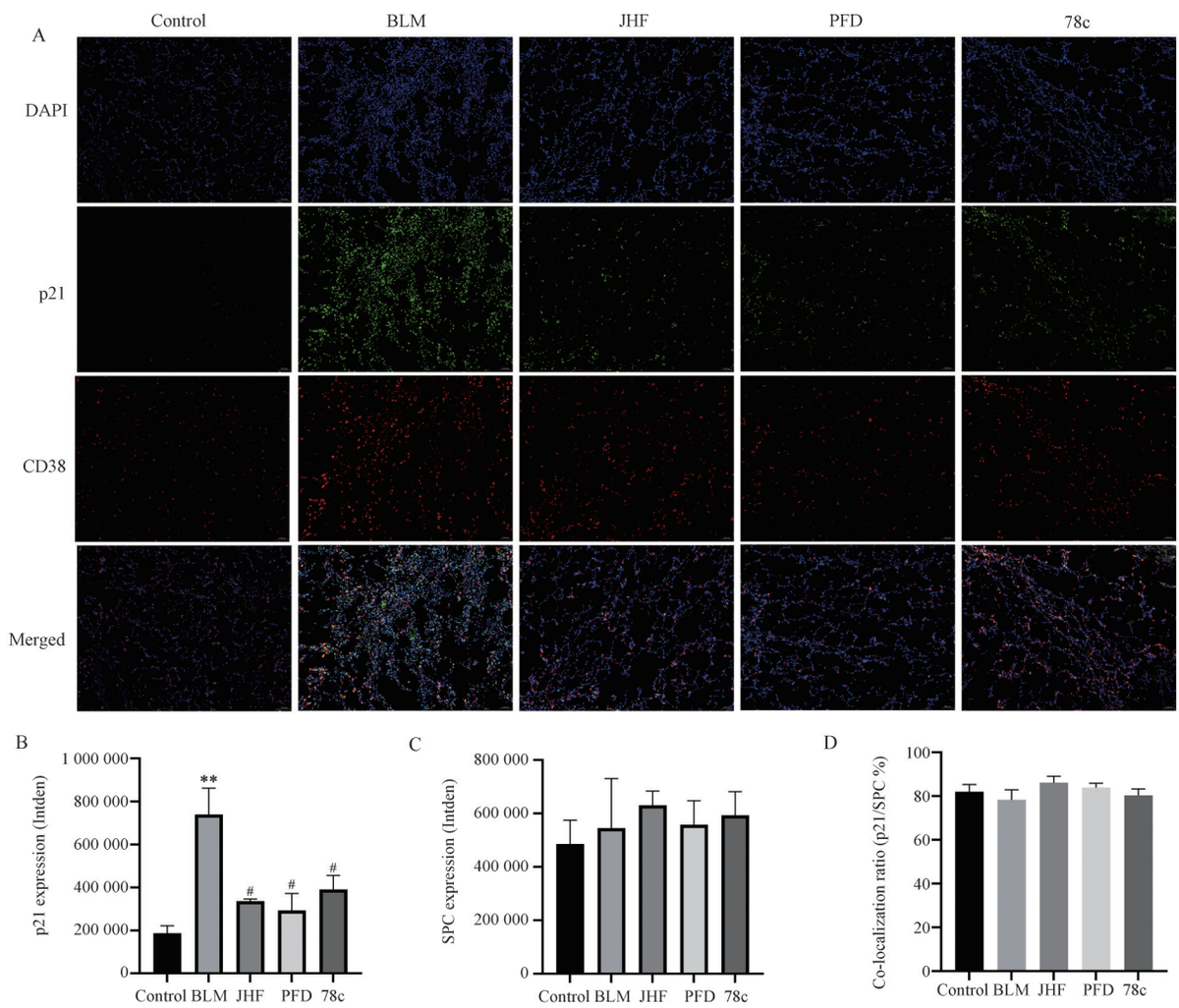
平在BLM组中显著升高，在JHF及78c干预组中显著降低，见图6。同时免疫荧光结果显示，p21与SPC共表达，p21主要表达在AEC2s中，见图7。



A：各组肺组织中p21、p53蛋白表达情况；B：各组肺组织中p21相对蛋白表达水平（$F=8.185$，$P<0.01$）；C：各组肺组织中p53相对蛋白表达水平（$F=5.895$，$P<0.01$）。$n=3$，与Control组比，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$；与BLM组比，$^{\#}P<0.05$，$^{\#\#}P<0.01$

图6　大鼠肺组织中p21、p53蛋白表达水平

Fig 6　Expression levels of p21 and p53 proteins in rat lung tissues



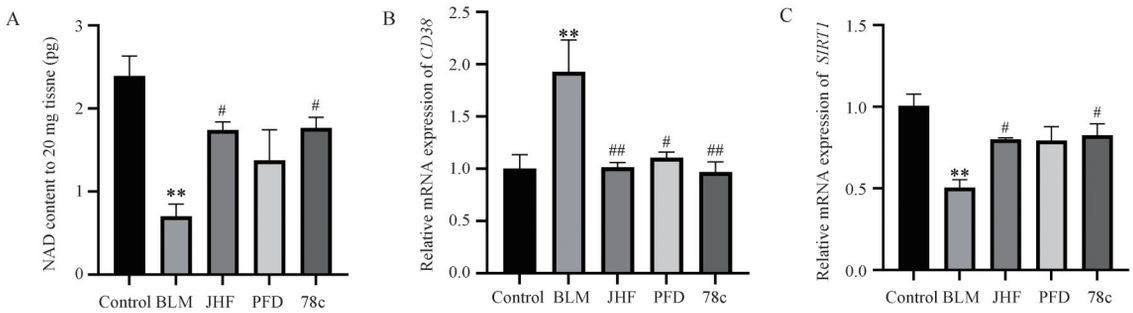
A：各组大鼠肺组织免疫荧光，绿色：p21，红色：SPC；B：p21相对蛋白表达量（$F=8.185$，$P<0.01$）；C：SPC相对蛋白表达量；D：p21与SPC共定位分析；$n=3$，与Control组比，$^{**}P<0.01$；与BLM组比，$^{\#}P<0.05$

图7　组织免疫荧光（200×）及p21、SPC共定位分析

Fig 7　Tissue immunofluorescence (200×) and colocalization analysis of p21 and SPC

2.5 JHF调控CD38/NAD$^+$-SIRT1轴延缓AEC2s衰老

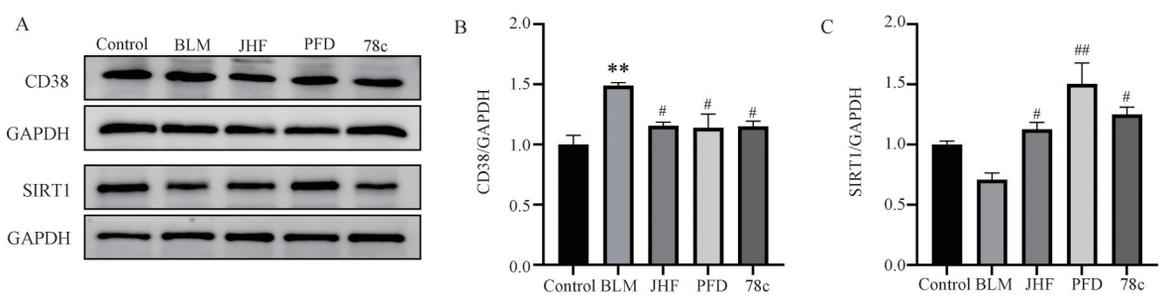
PCR结果显示，与Control组相比较，BLM组组织*CD38* mRNA水平显著增加；*SIRT1* mRNA水平及NAD$^+$水平显著下降，与BLM组相比，JHF组及78c组中组织*CD38* mRNA水平显著下降，*SIRT1* mRNA水平及NAD$^+$水平显著上调（$P<0.05$），见图8。Western blot结果也显示，与Control组相比较，BLM组中CD38蛋白表达显著上调，SIRT1蛋白表达抑制。与BLM组相比，JHF组及78c组中组织CD38蛋白水平显著下降；SIRT1蛋白水平显著上调（$P<0.05$），见图9。



A：组织NAD$^+$水平（$F=7.962$，$P<0.01$，$n=3$）；B：组织*CD38* mRNA水平（$F=6.691$，$P<0.01$，$n=4$）；C：组织*SIRT1* mRNA水平（$F=8.144$，$P<0.01$，$n=3$）；与Control组比，$^{**}P<0.01$；与BLM组比，$^{\#}P<0.05$，$^{\#\#}P<0.01$

图8 大鼠肺组织中*CD38*、*SIRT1* mRNA水平及NAD$^+$水平

Fig 8 *CD38*, *SIRT1* mRNA levels and NAD$^+$ levels in rat lung tissues



A：各组肺组织中CD38、SIRT1蛋白表达情况；B：各组肺组织中CD38相对蛋白表达水平（$F=7.531$，$P<0.01$）；C：各组肺组织中SIRT1相对蛋白表达水平（$F=10.75$，$P<0.01$）。与Control组比，$^{**}P<0.01$；与BLM组比，$^{\#}P<0.05$，$^{\#\#}P<0.01$

图9 大鼠肺组织中CD38、SIRT1蛋白表达水平（$\bar{x}\pm s$）

Fig 9 Expression levels of CD38 and SIRT1 proteins in rat lung tissues（$\bar{x}\pm s$）

3 讨论

细胞衰老是PF发生的重要机制之一。包括成纤维细胞在内的多种细胞在PF中均表现出功能障碍及衰老倾向，衰老相关分泌表型导致异常上皮再生及功能失常，驱动进行性PF的发生发展过程[17]。BLM能够通过诱导细胞内质网应激、自噬障碍等诱导PF中细胞衰老的发生[18]。NAD水平下降是细胞衰老的特征，它能够调节细胞自噬和线粒体功能[19]。CD38作为一种参与调节细胞和组织中NAD代谢的多功能蛋白，通过多途径介导细胞的损伤衰老，在肺组织内主要表达于AECs中[20,21]。靶向高表达CD38的衰老AEC2s能够有效恢复组织NAD$^+$水平，逆转肺组织中上皮-间质转化表型[22]。损伤AEC2s细胞中SIRT1及SIRT3缺乏，并高表达细胞衰老相关的蛋白[23,24]。

PF中AEC2s的损伤及再生功能障碍介导着PF的发生发展。BLM诱导的AEC2s细胞中p53/p21通路被显著激活[25]。衰老AEC2s通过旁分泌或自分泌等方式作用于组织微环境。在共培养体系中，使用从衰老AECs收集的培养基上清培养成纤维细胞使其胶原沉积增加，衰老的成纤维细胞也会能够减少AEC2s细胞增殖，引起AEC2s的衰老[17,26]。另一方面，衰老AEC2s诱导的SASP的积累也促进了炎症细胞在组织的聚集和异常，促进巨噬细胞向促纤维化的M2型极化并分泌趋化因子CCL2募集单核巨噬细胞[27]。靶向AEC2s衰老减

轻组织细胞损伤能够有效延缓PF进程。

在本研究中，BLM诱导的大鼠PF组织中表现出了衰老细胞的积累、衰老相关分泌表型及衰老相关蛋白p21、p53表达水平的增加。提示在纤维化的发生中，伴随着细胞衰老的发生。同时，免疫荧光共定位明确了p21高表达于AEC2s细胞中，并伴随CD38的高表达及SIRT1表达抑制和NAD$^+$水平的下降。CD38抑制剂(78c)可以延长自然衰老小鼠的寿命，延长小鼠的中位生存期并改善了小鼠的运动表现、耐力和代谢功能[28]。采用78c干预后，大鼠肺组织纤维化水平及上皮损伤得到了显著改善，组织NAD$^+$水平提高，并激活SIRT1蛋白活性，提示CD38过表达引起NAD$^+$损耗及SIRT1的抑制可能是PF中AEC2s细胞衰老的关键机制。

“肺为气之主，肾为气之根”，二者共同维持着正常的呼吸活动，并在疾病过程中相互影响。衰老是人体生长的自然现象，随着年龄的增长，人体气血虚衰，五脏的机能下降。其中，肾为先天之本，是元阴元阳之所藏，衰老与肾气的虚衰息息相关，过度气衰则会形成病理变化[29]。肺肾气虚，致血脉瘀滞，痰浊闭阻是衰老的关键特征，而虚和瘀则是PF中贯穿疾病始终的关键病理因素[30,31]。这与PF发展中的肺肾气虚，痰瘀痹阻的关键病机相契合。JHF以补益肺肾，理气化痰为主要治法。它首先以人参为君药补益肺气；麦冬养阴润肺、熟地黄滋阴润燥、淫羊藿补肾益精，三种共为臣；瓜蒌、浙贝母、牡丹皮用以化痰理气散结、活血化瘀；佐以白果敛肺止咳，陈皮畅达中焦气机为使药。在本研究中，它显著改善了大鼠肺组织纤维化及炎症水平，减轻组织胶原沉积，能够明显改善组织上皮间质转化，减轻上皮损伤，与前期研究结果一致。此外，JHF能够显著降低组织CD38的表达，提高NAD$^+$代谢水平，激活SIRT1蛋白，显著抑制衰老相关分泌表型及衰老相关蛋白p21、p53的表达水平，延缓组织AEC2s细胞衰老，减少组织中衰老细胞积累。

综上所述，JHF治疗PF疗效明确，并能够延缓PF中AEC2s损伤衰老，显著抑制CD38表达，激活SIRT1蛋白，上调NAD$^+$代谢水平。这说明JHF对PF大鼠的保护作用可能与调控CD38/NAD$^+$-SIRT1通路轴，延缓AEC2s细胞衰老相关。

作者贡献度说明：

蔡宇：负责文章撰写，实验操作、指标检测和数据统计；余海滨：负责实验规划与实验指导，文章修改；韩瑞婷、沈俊岭：实验操作和文章撰写指导；王宇、游梦月：协助完成指标检测与文献查阅。

所有作者声明不存在利益冲突关系。

参考文献

1 Wolters PJ, Blackwell TS, Eickelberg O, et al. Time for a change: Is idiopathic pulmonary fibrosis still idiopathic and only fibrotic?[J]. Lancet Respir Med, 2018, 6(2): 154-160.

2 Hong X, Wang L, Zhang K, et al. Molecular mechanisms of alveolar epithelial stem cell senescence and senescence-associated differentiation disorders in pulmonary fibrosis[J]. Cells, 2022, 11(5): 877.

3 Schafer MJ, White TA, Iijima K, et al. Cellular senescence mediates fibrotic pulmonary disease[J]. Nat Commun, 2017, 8: 14532.

4 Aversa Z, Atkinson EJ, Carmona EM, et al. Biomarkers of cellular senescence in idiopathic pulmonary fibrosis [J]. Respir Res, 2023, 24(1): 101.

5 Hiemstra PS, McCray PB, Bals R. The innate immune function of airway epithelial cells in inflammatory lung disease[J]. Eur Respir J, 2015, 45(4): 1150-1162.

6 Enomoto Y, Katsura H, Fujimura T, et al. Autocrine TGF-β-positive feedback in profibrotic AT2-lineage cells plays a crucial role in non-inflammatory lung fibrogenesis [J]. Nat Commun, 2023, 14(1): 4956.

7 Yamada Z, Nishio J, Motomura K, et al. Senescence of alveolar epithelial cells impacts initiation and chronic phases of murine fibrosing interstitial lung disease [J]. Front Immunol, 2022, 13: 935114.

8 Covarrubias AJ, Perrone R, Grozio A, et al. NAD$^+$ metabolism and its roles in cellular processes during ageing [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2021, 22(2): 119-141.

9 Cui H, Xie N, Banerjee S, et al. CD38 mediates lung fibrosis by promoting alveolar epithelial cell aging[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2022, 206(4): 459-475.

10 Shi B, Wang W, Korman B, et al. Targeting CD38-dependent NAD$^+$ metabolism to mitigate multiple organ fibrosis[J]. iScience, 2021, 24(1): 101902.

11 Chang HC, Guarente L. SIRT1 and other sirtuins in metabolism[J]. Trends Endocrinol Metab, 2014, 25(3): 138-145.

12 D′Agnano V, Mariniello DF, Pagliaro R, et al. Sirtuins and cellular senescence in patients with idiopathic pulmonary fibrosis and systemic autoimmune disorders [J]. Drugs, 2024, 84(5): 491-501.

13 柯诗文，朱国双，莫丽莎，等.国医大师洪广祥“气阳学说”在肺间质纤维化诊治中的微观体现[J].中华中医药杂志，2023，38(4)：1572-1575.
Ke S, Zhu G, Mo L, et al. Microscopic manifestation of “qi-yang theory” in interstitial pulmonary fibrosis

proposed by TCM master HONG Guang-xiang[J]. Chin J Tradit Chin Med Pharm, 2023, 38(4): 1572-1575.

14 丁大力, 沈学彬, 姚佳慧, 等. 中药治疗肺纤维化的研究进展[J]. 中草药, 2021, 52(22): 7006-7024.
Ding D, Shen X, Yao J, et al. Research progress on traditional Chinese medicine against treating pulmonary fibrosis[J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2021, 52(22): 7006-7024.

15 Liu T, Xu P, Qi S, et al. Network pharmacology-based mechanistic investigation of Jinshui Huanxian Formula acting on idiopathic pulmonary fibrosis[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2021, 2021: 8634705.

16 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.

17 Blokland KE, Waters DW, Schuliga M, et al. Senescence of IPF lung fibroblasts disrupt alveolar epithelial cell proliferation and promote migration in wound healing [J]. Pharmaceutics, 2020, 12(4): 389.

18 Baek AR, Hong J, Song KS, et al. Spermidine attenuates bleomycin-induced lung fibrosis by inducing autophagy and inhibiting endoplasmic reticulum stress (ERS)-induced cell death in mice [J]. Exp Mol Med, 2020, 52: 2034-2045.

19 Wilson N, Kataura T, Korsgen ME, et al. The autophagy-NAD axis in longevity and disease[J]. Trends Cell Biol, 2023, 33(9): 788-802.

20 Mendelsohn AR, Larrick JW. Interacting NAD^+ and cell senescence pathways complicate antiaging therapies [J]. Rejuvenation Res, 2019, 22(3): 261-266.

21 Wang LF, Cao Q, Wen K, et al. CD38 deficiency alleviates D-galactose-induced myocardial cell senescence through NAD^+/Sirt1 signaling pathway[J]. Front Physiol, 2019, 10: 1125.

22 Long Y, Yang B, Lei Q, et al. Targeting senescent alveolar epithelial cells using engineered mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles to treat pulmonary fibrosis[J]. ACS Nano, 2024, 18(9): 7046-7063.

23 Li N, Xiong R, Li G, et al. PM2.5 contributed to pulmonary epithelial senescence and ferroptosis by regulating USP3-SIRT3-P53 axis[J]. Free Radic Biol Med, 2023, 205: 291-304.

24 Liang J, Huang G, Liu X, et al. The ZIP8/SIRT1 axis regulates alveolar progenitor cell renewal in aging and idiopathic pulmonary fibrosis[J]. J Clin Invest, 2022, 132(11): e157338.

25 Xiong D, Gao F, Shao J, et al. Arctiin-encapsulated DSPE-PEG bubble-like nanoparticles inhibit alveolar epithelial type 2 cell senescence to alleviate pulmonary fibrosis *via* the p38/p53/p21 pathway[J]. Front Pharmacol, 2023, 14: 1141800.

26 Tian Y, Li H, Qiu T, et al. Loss of PTEN induces lung fibrosis *via* alveolar epithelial cell senescence depending on NF-κB activation[J]. Aging Cell, 2019, 18(1): e12858.

27 Chung EJ, Kwon S, Reedy JL, et al. IGF-1 receptor signaling regulates type Ⅱ pneumocyte senescence and resulting macrophage polarization in lung fibrosis[J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2021, 110(2): 526-538.

28 Peclat TR, Thompson KL, Warner GM, et al. CD38 inhibitor 78c increases mice lifespan and healthspan in a model of chronological aging[J]. Aging Cell, 2022, 21(4): e13589.

29 鲍晓敏, 史晓, 沈雁, 等. 基于"肾虚致衰"理论的"杞鹿健肾颗粒"对老年衰弱综合征肾气虚证的二阶段交叉对照研究[J]. 现代中西医结合杂志, 2023, 32(17): 2388-2392.
Bao X, Shi X, Shen Y, et al. "Qilu Jianshen granules" based on the theory of "kidney-qi deficiency causing weakness" on senile debilitating syndrome of kidney-qi deficiency type: A two-stage cross-over controlled study [J]. Modern J Integr Tradit Chin West Med, 2023, 32(17): 2388-2392.

30 刘创, 庞立健, 吕晓东. 特发性肺纤维化"肺虚络瘀"病机发微[J]. 上海中医药杂志, 2014, 48(3): 22-24.
Liu C, Pang L, Lv X. Discussion on pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis: "Lung deficiency and collaterals stasis" [J]. Shanghai J Traditi Chin Med, 2014, 48(3): 22-24.

31 胡君霞, 许越淇, 王军, 等. 基于NAMPT/SIRT1的温肺化纤汤含药血清延缓肺间充质干细胞炎性衰老的作用机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2024, 30(12): 45-53.
Hu J, Xu Y, Wang J, et al. Mechanism of Wenfei Huaxian Decoction-containing serum in delaying inflammatory senescence of lung m esenchymal stem cells based on NAMPT/SIRT1[J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2024, 30(12): 45-53.

[**本文编辑**] 雷 燕 宋睿璞 陈思润