·论著·

H_2S代谢基因*3-MPST*和*SQOR*在肺纤维化中的作用及其机制

李聪[1,2],付明霞[3],王楠[2],柏雪莲[2],刘乃国[1,2]
(1. 滨州医学院附属医院检验科,山东 滨州 256600; 2. 滨州医学院附属医院医学研究中心,山东 滨州 256600; 3. 滨州市人民医院病理科,山东 滨州 256600)

摘要 目的 探讨硫化氢(H_2S)代谢基因3-巯基丙酮酸硫转移酶(*3-MPST*)和硫化物醌氧化还原酶(*SQOR*)在肺纤维化中的作用及其机制。**方法** 将40只SD大鼠随机分为对照组和模型组,分别在博来霉素处理后14和21 d取材,采用实时定量PCR和免疫组织化学法分析*3-MPST*和*SQOR* mRNA和蛋白在肺纤维化中表达的变化。将A549细胞随机分为对照组、TGF-β1组、TGF-β1+NaHS组、siRNA-*3-MPST*组、siRNA-*3-MPST*+TGF-β1组、siRNA-*SQOR*组和siRNA-*SQOR*+TGF-β1组。采用RNA干扰、实时定量PCR和Western blotting检测*3-MPST*、*SQOR*、α平滑肌肌动蛋白(*α-SMA*)、E-钙黏蛋白(*E-cadherin*)表达的变化,检测各组A549细胞中H_2S和活性氧(ROS)水平的变化。**结果** 与对照组比较,模型组大鼠肺组织中*3-MPST* mRNA和蛋白表达水平降低,*SQOR* mRNA和蛋白表达水平升高($P < 0.05$)。与对照组比较,TGF-β1组A549细胞中*E-cadherin*和*3-MPST* mRNA和蛋白表达水平以及H_2S含量显著降低($P < 0.05$),*α-SMA*和*SQOR* mRNA和蛋白表达水平以及ROS水平显著升高($P < 0.05$)。与TGF-β1组比较,TGF-β1+NaHS组上述变化减弱。与TGF-β1组比较,siRNA-*3-MPST*+TGF-β1组*E-cadherin*和*SQOR* mRNA和蛋白表达水平以及H_2S含量显著降低($P < 0.05$),*α-SMA* mRNA和蛋白表达水平和ROS水平显著升高($P < 0.05$);siRNA-*SQOR*+TGF-β1组*α-SMA*、*3-MPST* mRNA和蛋白表达水平以及ROS水平显著降低($P < 0.05$),*E-cadherin* mRNA和蛋白表达水平和H_2S含量显著升高($P < 0.05$)。**结论** 3-MPST可能通过增加H_2S含量、降低ROS水平发挥抑制上皮-间质转化和肺纤维化的作用,而SQOR可能通过减少H_2S含量、提高ROS水平促进上皮-间质转化和肺纤维化。NaHS具有抑制上皮-间质转化和肺纤维化的作用。

关键词 肺纤维化; 上皮-间质转化; 3-巯基丙酮酸硫转移酶; 硫化物醌氧化还原酶; 硫化氢代谢
中图分类号 R563 **文献标志码** A **文章编号** 0258-4646(2026)02-0139-07
网络出版地址 https://link.cnki.net/urlid/21.1227.R.20260108.1447.030
DOI: 10.12007/j.issn.0258-4646.2026.02.008

Roles and mechanisms of the H_2S metabolism genes 3-*MPST* and SQOR in pulmonary fibrosis

LI Cong[1,2], FU Mingxia[3], WANG Nan[2], BAI Xuelian[2], LIU Naiguo[1,2]
(1. Department of Clinical Laboratory, Binzhou Medical University Hospital, Binzhou 256600, China; 2. Medical Research Center, Binzhou Medical University Hospital, Binzhou 256600, China; 3. Department of Pathology, The People's Hospital of Binzhou, Binzhou 256600, China)

Abstract Objective To explore the roles and underlying mechanisms of hydrogen sulfide (H_2S)-metabolizing genes 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase (*3-MPST*) and sulfide quinone oxidoreductase (*SQOR*) in pulmonary fibrosis. **Methods** Forty Sprague-Dawley rats were randomly divided into the control and bleomycin-induced pulmonary fibrosis model groups, and lung tissues were sampled at 14 and 21 days post-treatment. The expression levels of 3-MPST and SQOR in the rat lungs were assessed via immunohistochemistry and quantitative real-time PCR. In vitro, A549 cells were divided into the control, TGF-β1, TGF-β1+NaHS, siRNA-*3-MPST*, siRNA-*3-MPST*+TGF-β1, siRNA-*SQOR*, and siRNA-*SQOR*+TGF-β1 groups. The expression levels of 3-MPST, SQOR, α-SMA, and E-cadherin were assessed via Western blotting and quantitative real-time PCR. The content of H_2S and the level of reactive oxygen species (ROS) were also determined. **Results** The expression level of *3-MPST* was significantly downregulated, whereas the expression level of *SQOR* was upregulated in the fibrotic lungs of rats in the model group compared with those in the control group ($P < 0.05$). Compared with A549 cells in the control group, the A549 cells in the TGF-β1 group displayed decreased levels of *3-MPST*, *E-cadherin*, and H_2S, and increased levels of *SQOR*, *α-SMA*, and ROS ($P < 0.05$). These effects were attenuated by NaHS in the TGF-β1+NaHS group compared with those in the TGF-β1 group. Compared with the TGF-β1 group, the levels of *E-cadherin*, *SQOR*, and H_2S in the siRNA-*3-MPST* + TGF-β1 group were significantly decreased ($P < 0.05$), while the levels of *α-SMA* and ROS were significantly increased ($P < 0.05$). In the siRNA-*SQOR* + TGF-β1 group, the levels of *α-SMA*, *3-MPST*, and ROS were significantly decreased ($P < 0.05$), while the level of *E-cadherin* and H_2S

基金项目: 山东省自然科学基金(ZR2019MC019)
作者简介: 李聪(1997-),女,硕士研究生.
通信作者: 刘乃国,E-mail:liunaiguo@bzmc.edu.cn
收稿日期: 2025-01-24
网络出版时间: 2026-01-08 17:04:03

were significantly increased ($P < 0.05$). **Conclusion** 3-MPST appears to inhibit EMT and pulmonary fibrosis by increasing H_2S content and reducing ROS level, whereas SQOR may promote fibrosis by decreasing H_2S content and increasing ROS level. NaHS can also inhibit EMT and pulmonary fibrosis.

Keywords pulmonary fibrosis; epithelial-mesenchymal transition; 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase; sulfide quinone oxidoreductase; hydrogen sulfide metabolism

肺纤维化是一种进行性、致死性的肺间质疾病，目前尚无有效治疗方法，确诊后患者的平均寿命为3~5年[1]。因此，研究肺纤维化的发病机制、寻找新的治疗策略具有十分重要的意义。A549细胞经转化生长因子β1（transforming growth factor-β1，TGF-β1）处理后可以引起上皮–间质转化（epithelial-mesenchymal transition，EMT），EMT是驱动肺纤维化发生的关键步骤，常被用作肺纤维化研究的体外模型[2]。硫化氢（hydrogen sulfide，H_2S）是一种气体信号分子，具有抗炎、抗病毒、改善细胞代谢和保护机体免受氧化应激等作用，在肺部疾病中发挥重要作用。在细胞和小鼠肺纤维化模型中，细胞内H_2S水平降低。然而，加入NaHS（H_2S供体）后，氧化损伤和肺纤维化的程度减轻[3]。NaHS可通过调节TGF-β1/Smad 2/3信号通路和MAPK信号通路抑制甲醛诱导的人肺上皮细胞EMT和肺损伤[4]。H_2S主要通过3种酶的酶促作用产生，即胱硫醚β–合酶（cystathionine β-synthase，CBS）、胱硫醚γ–裂解酶（cystathionine γ-lyase，CSE）和3–巯基丙酮酸硫转移酶（3-mercaptopyruvate sulfurtransferase，3-MPST）[5]。CBS、CSE在肺纤维化中的作用已有研究报道，但是3-MPST在肺纤维化中的作用及其机制尚未见报道。哺乳动物中H_2S分解代谢的第一步由硫化物醌氧化还原酶（sulfide quinone oxidoreductase，SQOR）催化，该酶在调节H_2S介导的信号传导中起关键作用。SQOR以辅酶Q为电子受体，催化线粒体H_2S氧化，并在复合物Ⅲ水平连接电子传递链[6]。SQOR在肺纤维化中的作用尚未见报道。本研究通过气管内灌注博来霉素制备大鼠肺纤维化模型，应用TGF-β1诱导A549细胞发生EMT，建立肺纤维化体外模型，采用RNA干扰等技术探讨3-MPST和SQOR在肺纤维化中的作用及其氧化应激相关机制，为完善肺纤维化的发病机制、寻找新的治疗策略提供科学依据。

1　材料与方法

1.1　药物和主要试剂

博来霉素和TGF-β1购自德国Sigma公司；NaHS购自阿拉丁试剂（上海）有限公司；3-MPST/SQOR的小干扰RNA由上海吉玛制药技术有限公司合成；TRIzol试剂和反转录试剂盒购自美国ThermoFisher Scientific公司；SYBR Green实时定量PCR预混试剂（Master Mix）购自日本TOYOBO公司；实验所用各类一抗和二抗购自美国Santa Cruz Biotechnology公司；DAB显色试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.2　动物和分组

将40只健康雄性SD大鼠（山东鲁抗医药股份有限公司）随机分为对照组和模型组。模型组大鼠气管灌注博来霉素（5 mg/kg），制备肺纤维化模型。对照组大鼠给予等量生理盐水。分别于给药后第14和21天处死大鼠，每个时间点每组10只，通过苏木素–伊红染色和Masson染色鉴定模型是否构建成功。本研究经滨州医学院附属医院实验动物伦理委员会审核批准（20220929）。

1.3　细胞和分组

将A549细胞（武汉普诺赛生命科技有限公司）置于含10%胎牛血清和1%青霉素–链霉素双抗的Ham's F-12 K培养基中，在37 ℃、5 % CO_2培养箱中培养。培养24 h后，将A549细胞随机分为7组，分别为对照组、TGF-β1组、TGF-β1+NaHS组、siRNA-*3-MPST*组、siRNA-*3-MPST*+TGF-β1组、siRNA-*SQOR*组、siRNA-*SQOR*+TGF-β1组。分组处理所用的药物浓度：TGF-β1 6 ng/mL，NaHS 450 μmol/L，siRNA-*3-MPST* 4 μmol/L，siRNA-*SQOR* 4 μmol/L，分别在处理后12、24、36 h收集各组细胞，用于后续实验。

1.4　方法

1.4.1　免疫组织化学染色：采用免疫组织化学染色检测大鼠肺组织中3-MPST和SQOR的表达。组织固定、包埋、切片后，一抗（3-MPST，1 ∶ 50；SQOR，1 ∶ 400）孵育，DAB显色，苏木素复染，光镜下棕黄色颗粒判定为阳性信号。

1.4.2　实时定量PCR：使用TRIzol试剂提取细胞和肺组织中总RNA，反转录成cDNA。分别以大鼠和

人的*GAPDH*为内参，检测各基因表达情况。实时定量PCR条件：95℃ 5 min，95℃ 15 s，59℃ 30 s，72℃ 30 s，共40个循环。引物序列：*GAPDH*（大鼠），正向5'-CACCATCTTCCAGGAGCGAG-3'，反向5'-GGCGGAGATGATGACCCTTT-3'；*3-MPST*（大鼠），正向5'-GCCGCAGCCCTGCAA-3'，反向5'-CCACCCACTGAGCAGATACC-3'；*SQOR*（大鼠），正向5'-CCATGGCACAACAGCCTGA-3'，反向5'-ATGCAATTGGAGGGGTCCAG-3'；*GAPDH*（人），正向5'-GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT-3'，反向5'-GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG-3'；*E-cadherin*（人），正向5'-CTGAGAACGAGGCTAACG-3'，反向5'- GTCCACCATCATCATTCAA-3'；*α-SMA*（人），正向5'-TTACGAGTTGCCTGATGG-3'，反向5'-TGCTGTTGTAGGTGGTTTC-3'；*SQOR*（人），正向5'-AGACCAGTCCTGTGGCTGAT-3'，反向5'-TTCCTGACTGGGCAGCTACT-3'；*3-MPST*（人），正向5'-CCCGCCTTCATCAAGACCTA-3'，反向5'-AGGTTCAATGCCGTCTCGG-3'。用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算各基因的相对表达量。

1.4.3　Western blotting：蛋白样品经RIPA裂解、BCA定量后，依次进行封闭、一抗（3-MPST，1∶100；SQOR，1∶2 000）和二抗孵育，最终通过化学发光法显影，以β-actin或GAPDH为内参进行标准化。

1.4.4　RNA干扰：用电转仪（560 V）将3-MPST、SQOR的siRNA及对照siNC分别导入细胞。转染后，将细胞以2×10^5/孔的密度接种于6孔板，培养36 h后收集细胞，采用实时定量PCR验证转染效率。选取敲低效果最好的小干扰RNA序列（siRNA-*3-MPST*，5'-GAAGAAAGUGGACCUGUCUTT-3'；siRNA-*SQOR*，5'-CCCAAGUGAUUUCAUAUGATT-3'）进行后续实验。

1.4.5　活性氧（reactive oxygen species，ROS）测定：将A549细胞接种于96孔板（1×10^4/孔），更换为含10 μmol/L DCFH-DA的无血清培养基，37℃避光孵育20 min后，于荧光酶标仪（Ex/Em = 488/525 nm）下检测荧光强度。

1.4.6　H_2S含量测定：将各组A549细胞收集于离心管计数，离心弃上清，将细胞沉淀破碎后，按照试剂盒说明书进行检测。

1.5　统计学分析

采用GraphPad Prism 8.0软件进行数据分析并绘图。计量资料以$\bar{x}\pm s$表示，多组间比较采用重复测量方差分析，2组间比较采用*t*检验。$P<0.05$为差异有统计学意义。

2　结果

2.1　大鼠肺组织中*3-MPST*、*SQOR* mRNA和蛋白表达

与对照组比较，14和21 d时模型组大鼠肺组织中3-MPST蛋白表达显著减少，mRNA表达水平显著降低（$P<0.05$），而SQOR蛋白表达显著增多，mRNA表达水平显著升高（$P<0.05$）。见图1、表1。

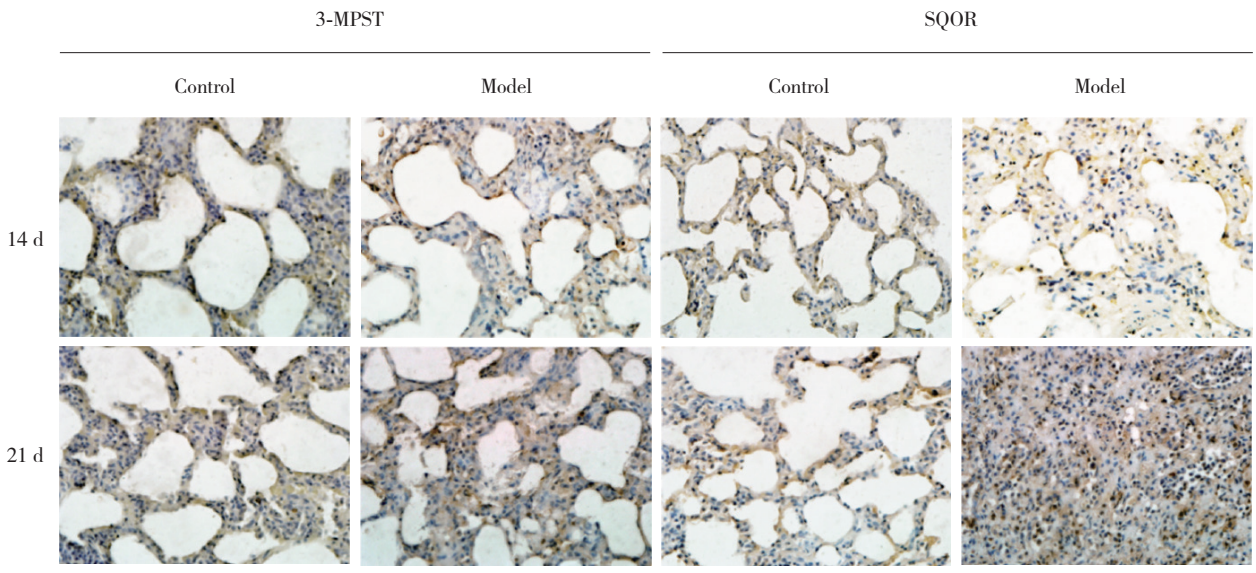


图1　免疫组织化学染色检测大鼠肺组织中3-MPST和SQOR蛋白的表达　×200

Fig.1　Immunohistochemical staining of 3-MPST and SQOR proteins in the lungs of rats　×200

表1　大鼠肺组织中*3-MPST*和*SQOR* mRNA表达水平的比较

Tab.1　Comparison of *3-MPST* and *SQOR* mRNA levels in the lungs of rats

Time point	*3-MPST* mRNA		*SQOR* mRNA	
	Control group (n = 10)	Model group (n = 10)	Control group (n = 10)	Model group (n = 10)
14 d	1.029 ± 0.063	0.698 ± 0.042[1)]	0.993 ± 0.038	1.714 ± 0.031[1)]
21 d	1.005 ± 0.068	0.570 ± 0.047[1)]	1.025 ± 0.057	1.896 ± 0.031[1)]

1) $P < 0.05$ vs. control group.

2.2　各组A549细胞中*α-SMA*和*E-cadherin* mRNA表达

与对照组比较，TGF-β1组、siRNA-*3-MPST*组和siRNA-*3-MPST*+TGF-β1组*α-SMA* mRNA表达水平显著升高，*E-cadherin* mRNA表达水平显著降低（$P < 0.05$），而TGF-β1+NaHS组和siRNA-*SQOR*组*α-SMA* mRNA表达水平显著降低，*E-cadherin* mRNA表达水平显著升高（$P < 0.05$）。TGF-β1+NaHS组和siRNA-*SQOR*+TGF-β1组中*α-SMA* mRNA表达水平显著低于TGF-β1组，*E-cadherin* mRNA表达水平显著高于TGF-β1组（$P < 0.05$）。结果提示，*3-MPST*抑制*α-SMA*表达，促进*E-cadherin*表达，*SQOR*和TGF-β1促进*α-SMA*表达，抑制*E-cadherin*表达，而NaHS能降低*α-SMA*表达水平，提高*E-cadherin*表达水平。见表2。

表2　各组A549细胞中*α-SMA*和*E-cadherin* mRNA表达水平的比较

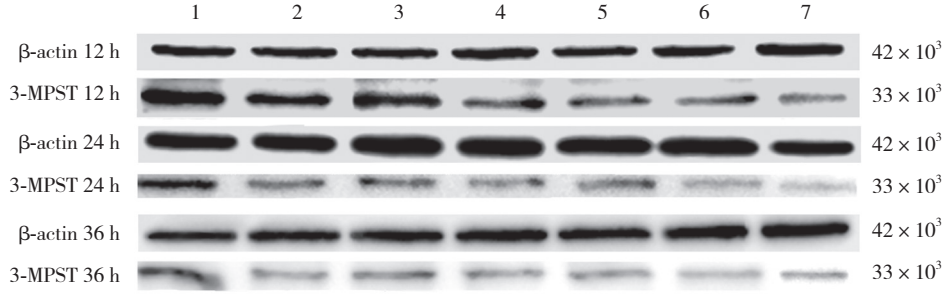
Tab.2　Comparison of *α-SMA* and *E-cadherin* mRNA levels in A549 cells in each group

Group	*α-SMA* mRNA			*E-cadherin* mRNA		
	12 h	24 h	36 h	12 h	24 h	36 h
Control	1.001 ± 0.042	1.003 ± 0.089	1.006 ± 0.137	1.001 ± 0.049	1.001 ± 0.053	1.001 ± 0.61
TGF-β1	1.278 ± 0.007[1)]	1.323 ± 0.009[1)]	1.399 ± 0.002[1)]	0.728 ± 0.046[1)]	0.667 ± 0.010[1)]	0.424 ± 0.032[1)]
TGF-β1+NaHS	0.810 ± 0.054[1),2)]	0.763 ± 0.037[1),2)]	0.778 ± 0.014[1),2)]	1.188 ± 0.069[1),2)]	1.118 ± 0.012[1),2)]	0.811 ± 0.059[1),2)]
siRNA-*3-MPST*	1.244 ± 0.079[1)]	1.290 ± 0.055[1)]	1.621 ± 0.040[1)]	0.809 ± 0.023[1)]	0.617 ± 0.076[1)]	0.539 ± 0.044[1)]
siRNA-*3-MPST*+TGF-β1	1.630 ± 0.018[1),2)]	1.761 ± 0.049[1),2)]	1.909 ± 0.040[1),2)]	0.473 ± 0.038[1),2)]	0.298 ± 0.014[1),2)]	0.313 ± 0.012[1),2)]
siRNA-*SQOR*	0.798 ± 0.004[1)]	0.852 ± 0.012[1)]	0.759 ± 0.020[1)]	1.442 ± 0.051[1)]	1.516 ± 0.024[1)]	1.668 ± 0.011[1)]
siRNA-*SQOR*+TGF-β1	1.150 ± 0.036[1),2)]	1.160 ± 0.011[1),2)]	1.214 ± 0.015[1),2)]	1.264 ± 0.009[1),2)]	0.828 ± 0.010[1),2)]	0.639 ± 0.007[1),2)]

1) $P < 0.05$ vs. control group; 2) $P < 0.05$ vs. TGF-β1 group.

2.3　各组A549细胞中*3-MPST* mRNA和蛋白表达

与对照组比较，TGF-β1组、siRNA-*3-MPST*组、siRNA-*SQOR*组*3-MPST* mRNA和蛋白表达水平显著降低（$P < 0.05$）。TGF-β1+NaHS组*3-MPST* mRNA和蛋白表达水平显著高于TGF-β1组（$P < 0.05$）。siRNA-*3-MPST*+TGF-β1组、siRNA-*SQOR*+TGF-β1组*3-MPST* mRNA和蛋白表达水平显著低于TGF-β1组（$P < 0.05$）。结果提示，TGF-β1抑制*3-MPST*基因的表达，NaHS和*SQOR*对*3-MPST*表达可能有促进作用。见图2、表3。



1, control group; 2, TGF-β1 goup; 3, TGF-β1+NaHS group; 4, siRNA-*3-MPST* group; 5, siRNA-*3-MPST*+TGF-β1 group; 6, siRNA-*SQOR* group; 7, siRNA-*SQOR*+TGF-β1 group.

图2　各组A549细胞中3-MPST蛋白的表达

Fig.2　Expression of 3-MPST protein in A549 cells in each group

表3　各组A549细胞中*3-MPST* mRNA和蛋白表达水平的比较

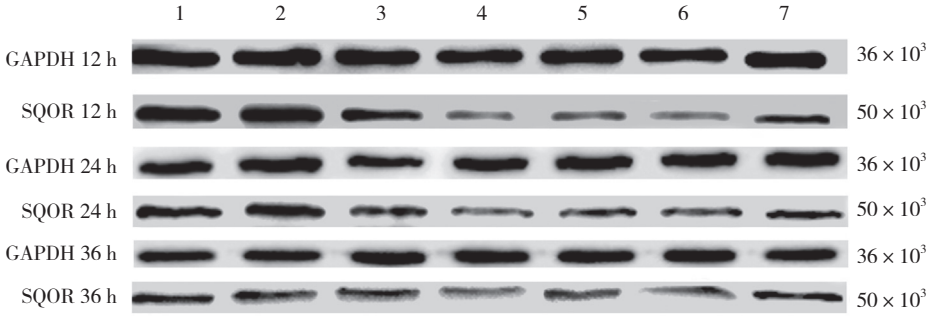
Tab.3　Comparison of *3-MPST* mRNA and protein levels in A549 cells in each group

Group	*3-MPST* mRNA			3-MPST protein		
	12 h	24 h	36 h	12 h	24 h	36 h
Control	1.006 ± 0.126	1.000 ± 0.17	1.002 ± 0.126	0.988 ± 0.046	0.980 ± 0.050	0.983 ± 0.071
TGF-β1	0.782 ± 0.033[1)]	0.665 ± 0.012[1)]	0.543 ± 0.005[1)]	0.852 ± 0.037[1)]	0.635 ± 0.047[1)]	0.552 ± 0.022[1)]
TGF-β1+NaHS	1.171 ± 0.026[1),2)]	0.855 ± 0.039[1),2)]	0.811 ± 0.058[1),2)]	1.124 ± 0.067[1),2)]	0.777 ± 0.013[1),2)]	0.719 ± 0.023[1),2)]
siRNA-*3-MPST*	0.531 ± 0.008[1)]	0.460 ± 0.033[1)]	0.416 ± 0.004[1)]	0.742 ± 0.039[1)]	0.642 ± 0.031[1)]	0.550 ± 0.026[1)]
siRNA-*3-MPST*+TGF-β1	0.430 ± 0.012[1),2)]	0.407 ± 0.014[1),2)]	0.365 ± 0.029[1),2)]	0.608 ± 0.010[1),2)]	0.470 ± 0.009[1),2)]	0.418 ± 0.015[1),2)]
siRNA-*SQOR*	0.756 ± 0.012[1)]	0.630 ± 0.028[1)]	0.495 ± 0.010[1)]	0.646 ± 0.008[1)]	0.557 ± 0.029[1)]	0.560 ± 0.010[1)]
siRNA-*SQOR*+TGF-β1	0.597 ± 0.006[1),2)]	0.522 ± 0.006[1),2)]	0.439 ± 0.007[1),2)]	0.564 ± 0.009[1),2)]	0.458 ± 0.020[1),2)]	0.426 ± 0.007[1),2)]

1) $P < 0.05$ vs. control group; 2) $P < 0.05$ vs. TGF-β1 group.

2.4　各组A549细胞中*SQOR* mRNA和蛋白表达

与对照组比较，TGF-β1组*SQOR* mRNA和蛋白表达水平显著升高（$P < 0.05$），siRNA-*3-MPST*组和siRNA-SQOR组*SQOR* mRNA和蛋白表达水平显著降低（$P < 0.05$）。与TGF-β1组比较，TGF-β1+NaHS组、siRNA-*3-MPST*+TGF-β1组、siRNA-*SQOR*+TGF-β1组*SQOR* mRNA和蛋白表达水平显著降低（$P < 0.05$）。结果提示，TGF-β1促进*SQOR*表达，NaHS抑制SQOR表达，而*3-MPST*可能对SQOR表达有促进作用。见图3、表4。



1, control group; 2, TGF-β1 goup; 3, TGF-β1+NaHS group; 4, siRNA-*3-MPST* group; 5, siRNA-*3-MPST*+TGF-β1 group; 6, siRNA-*SQOR* group; 7, siRNA-*SQOR*+TGF-β1 group.

图3　各组A549细胞中SQOR蛋白的表达

Fig.3　Expression of SQOR protein in A549 cells in each group

表4　各组A549细胞中*SQOR* mRNA和蛋白表达水平的比较

Tab.4　Comparison of *SQOR* mRNA and protein levels in A549 cells in each group

Group	*SQOR* mRNA			SQOR protein		
	12 h	24 h	36 h	12 h	24 h	36 h
Control	1.002 ± 0.067	1.001 ± 0.051	1.001 ± 0.048	1.000 ± 0.013	1.017 ± 0.032	1.010 ± 0.018
TGF-β1	1.311 ± 0.026[1)]	1.333 ± 0.017[1)]	1.438 ± 0.033[1)]	1.425 ± 0.024[1)]	1.415 ± 0.014[1)]	1.393 ± 0.025[1)]
TGF-β1+NaHS	1.175 ± 0.040[1),2)]	1.171 ± 0.012[1),2)]	1.151 ± 0.014[1),2)]	1.113 ± 0.010[1),2)]	1.150 ± 0.049[1),2)]	1.139 ± 0.037[1),2)]
siRNA-*3-MPST*	0.723 ± 0.015[1)]	0.676 ± 0.043[1)]	0.619 ± 0.015[1)]	0.615 ± 0.019[1)]	0.632 ± 0.038[1)]	0.509 ± 0.020[1)]
siRNA-*3-MPST*+TGF-β1	0.886 ± 0.011[1),2)]	1.228 ± 0.014[1),2)]	1.235 ± 0.008[1),2)]	0.701 ± 0.011[1),2)]	0.775 ± 0.004[1),2)]	0.649 ± 0.016[1),2)]
siRNA-*SQOR*	0.405 ± 0.012[1)]	0.455 ± 0.033[1)]	0.464 ± 0.005[1)]	0.650 ± 0.040[1)]	0.607 ± 0.058[1)]	0.582 ± 0.016[1)]
siRNA-*SQOR*+TGF-β1	0.828 ± 0.010[1),2)]	0.747 ± 0.021[1),2)]	0.639 ± 0.007[1),2)]	0.792 ± 0.003[1),2)]	0.825 ± 0.005[1),2)]	0.798 ± 0.032[1),2)]

1) $P < 0.05$ vs. control group; 2) $P < 0.05$ vs. TGF-β1 group.

2.5　各组A549细胞中ROS水平和H_2S含量变化

与对照组比较，TGF-β1组和siRNA-*3-MPST*组ROS水平升高，H_2S含量降低（$P < 0.05$），而siRNA-*SQOR*组ROS水平降低，H_2S含量升高（$P < 0.05$）。与TGF-β1组比较，TGF-β1+NaHS组、siRNA-*SQOR*+TGF-β1组ROS水平降低，H_2S含量升高（$P < 0.05$），而siRNA-*3-MPST*+TGF-β1组ROS水平升高，H_2S含量降低。结果显示，3-MPST抑制ROS产生，而SQOR促进ROS产生；3-MPST促进H_2S生成，而SQOR减少H_2S生成。见表5。

表5　各组A549细胞中ROS水平和H_2S含量的比较

Tab.5　Comparison of the ROS level and H_2S content in A549 cells in each group

Group	ROS			H_2S（μmol/10^7 cells）		
	12 h	24 h	36 h	12 h	24 h	36 h
Control	6.733 ± 0.125	11.597 ± 0.314	12.233 ± 0.103	0.052 ± 0.000 3	0.045 ± 0.000 3	0.037 ± 0.000 1
TGF-β1	12.606 ± 0.319[1)]	16.982 ± 0.647[1)]	19.765 ± 0.283[1)]	0.050 ± 0.000 1[1)]	0.042 ± 0.000 4[1)]	0.035 ± 0.000 1[1)]
TGF-β1+NaHS	10.616 ± 0.572[1),2)]	15.217 ± 0.712[1),2)]	17.946 ± 0.163[1),2)]	0.059 ± 0.000 2[1),2)]	0.047 ± 0.000 1[1),2)]	0.039 ± 0.000 3[1),2)]
siRNA-*3-MPST*	10.286 ± 1.004[1)]	17.741 ± 0.150[1)]	19.316 ± 1.364[1)]	0.035 ± 0.000 1[1)]	0.035 ± 0.000 1[1)]	0.030 ± 0.000 2[1)]
siRNA-*3-MPST*+TGF-β1	18.590 ± 0.375[1),2)]	19.352 ± 0.334[1),2)]	21.339 ± 0.233[1),2)]	0.035 ± 0.000 1[1),2)]	0.034 ± 0.000 1[1),2)]	0.029 ± 0.000 2[1),2)]
siRNA-*SQOR*	5.171 ± 0.059[1)]	9.594 ± 0.659[1)]	9.700 ± 0.234[1)]	0.061 ± 0.000 1[1)]	0.048 ± 0.000 2[1)]	0.047 ± 0.000 1[1)]
siRNA-*SQOR*+TGF-β1	10.379 ± 0.123[1),2)]	13.973 ± 0.125[1),2)]	17.643 ± 0.415[1),2)]	0.051 ± 0.000 4[1),2)]	0.047 ± 0.000 0[1),2)]	0.045 ± 0.000 0[1),2)]

1) $P < 0.05$ vs. control group; 2) $P < 0.05$ vs. TGF-β1 group.

3　讨论

3.1　TGF-β1诱导A549细胞发生EMT，NaHS抑制EMT

特发性肺纤维化是一种慢性间质性疾病，其特征为肺组织中细胞外基质沉积，最终导致肺结构破坏和肺功能下降。由TGF-β1诱发的EMT是肺纤维化过程的一个环节[7]。在EMT过程中，*E-cadherin*表达下调和*α-SMA*表达上调是其重要的分子特征[8]。H_2S供体NaHS可以抑制博莱霉素诱导的肺泡Ⅱ型细胞中p53和p21的表达，抑制肺纤维化的发生。外源性NaHS通过调节TGF-β1/Smad2/3信号通路，减轻$NiCl_2$诱导的EMT和细胞迁移，抑制百草枯诱导的人肺泡上皮细胞的内皮细胞转化和迁移[9]。H_2S通过调节内质网应激，抑制支气管上皮细胞发生EMT[10]。本研究结果显示，TGF-β1可以使A549细胞中*α-SMA*表达水平升高，*E-cadherin*表达水平降低，ROS水平升高，而H_2S含量降低。NaHS可以使A549细胞中*α-SMA*表达水平降低，*E-cadherin*表达水平升高，ROS水平降低，而H_2S含量增加。这些结果说明，TGF-β1可以提高ROS水平，降低H_2S含量，使A549细胞发生EMT，而NaHS可以通过增加H_2S含量和降低ROS水平来抑制EMT，进而减轻肺纤维化。研究[3]报道，在细胞和小鼠肺纤维化模型中，细胞内H_2S水平降低。然而，加入NaHS后氧化损伤和肺纤维化的程度减轻。这与以往的研究[4]结果一致，说明在EMT和肺纤维化发生中H_2S含量减少，NaHS（H_2S供体）可以通过增加H_2S含量、降低ROS水平抑制肺纤维化。

3.2　3-MPST可能通过增加H_2S含量、降低ROS水平抑制EMT和肺纤维化

3-MPST是3种H_2S合成酶之一，其在肺纤维化中的作用尚未见报道。在$NiCl_2$诱导的EMT过程中，内源性H_2S（CBS、CSE和3-MPST）的蛋白水平显著下调。NaHS可逆转$NiCl_2$诱导的A549细胞的EMT和迁移能力[9]。当TNF-α作用于HT29细胞时，*3-MPST*表达被抑制，促炎性细胞因子的表达水平显著升高，ROS水平和凋亡发生率升高，而过表达*3-MPST*显著改善这些作用[11]。Takotsubo心肌病大鼠血浆和心脏组织中CSE和3-MPST表达水平降低，H_2S含量降低，ROS水平升高[12]。这些研究表明，*3-MPST*表达降低或被抑制可以导致H_2S含量降低，ROS水平升高，参与多种疾病的发生。本研究结果表明，肺纤维化大鼠肺组织中*3-MPST*表达水平显著降低；TGF-β1可降低A549细胞中*3-MPST*表达水平，提示在EMT和肺纤维化中*3-MPST*表达受到抑制。沉默*3-MPST*后，*α-SMA*表达水平升高，而*E-cadherin*表达水平降低，同时H_2S含量降低，ROS水平升高。这些结果说明，

*3-MPST*表达降低或被抑制，促进了A549细胞的EMT过程，对肺纤维化可能有促进作用。反之则提示，3-MPST可能通过提高H_2S含量、降低ROS水平来抑制EMT和肺纤维化。研究[3]报道，H_2S可能通过抗氧化特性和减轻脂质过氧化损伤来改善博来霉素诱导的肺纤维化。这些研究结果说明，3-MPST通过提高H_2S含量、降低ROS水平来抑制肺纤维化。

3.3　SQOR可以通过减少H_2S生成、提高ROS水平促进EMT和肺纤维化

SQOR是一种线粒体膜黄素蛋白，在线粒体中催化H_2S氧化的第一步反应，在调节H_2S介导的信号传导中起关键作用[6]。SQOR以辅酶Q为电子受体催化H_2S的双电子氧化生成硫烷硫[13]。谷氨酰胺–果糖–6–磷酸转氨酶2在D492细胞EMT模型中控制生长和侵袭，是氧化应激的标志物，敲低谷氨酰胺–果糖–6–磷酸转氨酶2后，*SQOR*表达下调[14]。在巨噬细胞中，H_2S介导过硫化作用，*SQOR*抑制后过硫化作用增加，增强了抗氧化应激作用，也抑制了巨噬细胞NLRP3炎症小体的活化，并对炎症细胞死亡有保护作用[15]。这些研究提示，*SQOR*敲低具有增强过硫化作用、对抗氧化应激的作用。本研究发现，肺纤维化大鼠肺组织中*SQOR*表达增加；TGF-β1处理后，A549细胞中*SQOR*表达水平升高；沉默*SQOR*基因后，*α-SMA*表达水平降低，*E-cadherin*表达水平升高，H_2S含量增加，而ROS水平降低。说明抑制SQOR可以提高H_2S含量，增强过硫化作用，降低ROS水平，从而抑制EMT；反之也提示，SQOR可能通过减少H_2S含量、提高ROS水平促进EMT和肺纤维化的作用。

综上所述，本研究发现，3-MPST可能通过增加H_2S含量、降低ROS水平抑制EMT和肺纤维化，SQOR则通过减少H_2S含量、升高ROS水平促进EMT和肺纤维化的发生，NaHS可通过提高H_2S含量、降低ROS水平发挥抑制肺纤维化的作用。

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. DOI：10.1016/S2213-2600(18)30007-9.

[2] 尹策，刘畅，冯革. KRT6A介导Wnt/β-catenin信号通路调节上皮–间质转化促进非小细胞肺癌A549细胞抗辐射[J]. 中国医科大学学报，2024，53(7)：628-634. DOI：10.12007/j.issn.0258-4646.2024.07.009.

[3] HOU J，HUANG Y，FU L，et al. Evaluating the effect of hydrogen sulfide in the idiopathic pulmonary fibrosis model with a fluorescent probe[J]. Anal Chem，2023，95(13)：5514-5521. DOI：10.1021/acs.analchem.2c03640.

[4] WANG H，JIA M，CHANG Y，et al. Hydrogen sulfide donor NaHS inhibits formaldehyde-induced epithelial-mesenchymal transition in human lung epithelial cells via activating TGF-β1/Smad2/3 and MAPKs signaling pathways[J]. Curr Res Toxicol，2024，7：100199. DOI：10.1016/j.crtox.2024.100199.

[5] PANDEY T，PANDEY V. Hydrogen sulfide (H_2S) metabolism：unraveling cellular regulation，disease implications，and therapeutic prospects for precision medicine[J]. Nitric Oxide，2024，144：20-28. DOI：10.1016/j.niox.2024.01.004.

[6] KUMAR R，LANDRY AP，GUHA A，et al. A redox cycle with complex Ⅱ prioritizes sulfide quinone oxidoreductase-dependent H_2S oxidation[J]. J Biol Chem，2022，298(1)：101435. DOI：10.1016/j.jbc.2021.101435.

[7] 王帆，王鹏皓. miR-361-3P调控转化生长因子β1诱导成骨细胞凋亡的研究[J]. 中国医科大学学报，2023，52(7)：577-581. DOI：10.12007/j.issn.0258-4646.2023.07.001.

[8] HAN Y，YE L，DU F，et al. Iron metabolism regulation of epithelial-mesenchymal transition in idiopathic pulmonary fibrosis[J]. Ann Transl Med，2021，9(24)：1755. DOI：10.21037/atm-21-5404.

[9] BAI YW，YE MJ，YANG DL，et al. Hydrogen sulfide attenuates paraquat-induced epithelial-mesenchymal transition of human alveolar epithelial cells through regulating transforming growth factor-β1/Smad2/3 signaling pathway[J]. J Appl Toxicol，2019，39(3)：432-440. DOI：10.1002/jat.3734.

[10] LIN F，LIAO C，ZHANG J，et al. Hydrogen sulfide inhibits bronchial epithelial cell epithelial mesenchymal transition through regulating endoplasm reticulum stress[J]. Front Mol Biosci，2022，9：828766. DOI：10.3389/fmolb.2022.828766.

[11] ZHANG J，CEN L，ZHANG X，et al. MPST deficiency promotes intestinal epithelial cell apoptosis and aggravates inflammatory bowel disease via AKT[J]. Redox Biol，2022，56：102469. DOI：10.1016/j.redox.2022.102469.

[12] ZHANG Z，JIN S，TENG X，et al. Hydrogen sulfide attenuates cardiac injury in takotsubo cardiomyopathy by alleviating oxidative stress[J]. Nitric Oxide，2017，67：10-25. DOI：10.1016/j.niox.2017.04.010.

[13] JACKSON MR，MELIDEO SL，JORNS MS. Role of human sulfide：quinone oxidoreductase in H_2S metabolism[J]. Methods Enzymol，2015，554：255-270. DOI：10.1016/bs.mie.2014.11.037.

[14] WANG Q，KARVELSSON ST，KOTRONOULAS A，et al. Glutamine-fructose-6-phosphate transaminase 2(GFPT2) is upregulated in breast epithelial-mesenchymal transition and responds to oxidative stress[J]. Mol Cell Proteomics，2022，21(2)：100185. DOI：10.1016/j.mcpro.2021.100185.

[15] SALTI T，BRAUNSTEIN I，HAIMOVICH Y，et al. Widespread S-persulfidation in activated macrophages as a protective mechanism against oxidative-inflammatory stress[J]. Redox Biol，2024，72：103125. DOI：10.1016/j.redox.2024.103125.

（编辑　陈　姜）