

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2020.21.001

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20200604.0900.006.html\(2020-06-04\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20200604.0900.006.html(2020-06-04))

## 上皮细胞钠通道在博来霉素诱导小鼠肺纤维化中的作用机制\*

丁 炎,王 琳,刘妍宏,候亚鹏,聂宏光<sup>△</sup>

(中国医科大学基础医学院干细胞与再生医学研究室,辽宁沈阳 110122)

**[摘要]** **目的** 探讨上皮细胞钠通道(ENaC)在博来霉素诱导小鼠肺纤维化中的作用及相关机制,以及骨髓间充质干细胞条件培养基(BMSCs-CM)对 ENaC 的作用。**方法** 将 20 只 C57 小鼠随机分为对照组和实验组。Masson 染色观察小鼠肺纤维化程度;实时荧光定量逆转录-PCR(RT-PCR)和 Western blot 方法检测  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -SMA)、 $\alpha/\beta/\gamma$ -ENaC mRNA 的表达水平。将体外常规培养的肺泡 II 型上皮细胞(AEC II)随机分为 DMEM/F12 组(CON 组)、转化生长因子  $\beta$ 1(TGF- $\beta$ 1)处理组(TGF 组)、TGF- $\beta$ 1+BMSCs-CM 组(T+CM 组),培养 24 h,采用 Western blot 方法检测  $\alpha/\gamma$ -ENaC 蛋白的变化。**结果** 与对照组比较,实验组小鼠体重明显下降( $P<0.05$ ),死亡率为 36.36%。实验组小鼠肺组织 Masson 染色观察到明显的肺细胞损伤和组织纤维化。RT-PCR 和 Western blot 结果显示实验组小鼠 TGF- $\beta$ 1、 $\alpha$ -SMA 表达水平明显上升( $P<0.05$ ), $\alpha/\beta/\gamma$ -ENaC 3 个亚基的表达明显下降( $P<0.05$ )。与 CON 组比较,TGF 组小鼠的 AEC II 中  $\alpha/\gamma$ -ENaC 蛋白表达水平明显降低( $P<0.05$ );与 TGF 组比较,T+CM 组小鼠的 AEC II 中  $\alpha/\gamma$ -ENaC 蛋白表达水平明显升高( $P<0.05$ )。**结论** BMSCs-CM 对肺纤维化的保护作用可能与促进 AEC II 中 ENaC 的表达有关。

**[关键词]** 肺纤维化;博来霉素;上皮细胞钠通道;骨髓间充质干细胞条件培养基;上皮-间质转化**[中图分类号]** R363.1**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2020)21-3505-05

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



## Action mechanism of epithelial sodium channel in bleomycin-induced pulmonary fibrosis of mice\*

DING Yan, WANG Lin, LIU Yanhong, HOU Yapeng, NIE Hongguang<sup>△</sup>

(Research Section of Stem Cells and Regenerative Medicine, College of Basic Medical Science, China Medical University, Shenyang, Liaoning 110122, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the role and related mechanism of epithelial sodium channel (ENaC) in bleomycin-induced pulmonary fibrosis of mice and the effects of bone marrow mesenchymal stem cells conditioned medium (BMSCs-CM) on ENaC. **Methods** Twenty C57 mice were randomly divided into the control group and experimental group. The pulmonary fibrosis degree was observed by Masson staining. The expression levels of  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) and  $\alpha/\beta/\gamma$ -ENaC were detected by using the real-time PCR(RT-PCR) and Western blot, respectively. The in vitro conventionally cultured type II alveolar epithelial cells (AEC II) were randomly divided into the DMEM/F12 group (CON group), transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) treatment group (TGF group) and TGF- $\beta$ 1+BMSCs-CM treatment group (T+CM group). The AEC II were cultured for 24 h. The Western blot method was used to detect the protein levels of  $\alpha/\gamma$ -ENaC. **Results** The body weight of the mice in the experimental group was significantly decreased compared with that in the control group, and the mortality rate was 36.36%. The obvious pulmonary cell injury and tissue fibrosis in the experimental group were observed by the Masson staining. The real-time PCR and Western blot results showed that the expression levels of TGF- $\beta$ 1 and  $\alpha$ -SMA in the experimental group were increased ( $P<0.05$ ), whereas the expression levels of 3 subunits of  $\alpha/\beta/\gamma$ -ENaC were decreased ( $P<0.05$ ). Compared with CON group, the expression levels of  $\alpha/\gamma$ -ENaC protein in AEC II of TGF group mice was decreased ( $P<0.05$ ); compared with the simple TGF group, the expression levels of  $\alpha/\gamma$ -ENaC protein in the T+CM group were increased ( $P<0.05$ ). **Conclusion** The protective effect of BMSCs-CM on pulmonary fibrosis may

\* 基金项目:国家自然科学基金项目(81670010);辽宁省高等学校基本科研项目(LQNK201745)。作者简介:丁炎(1987-),实验师,在读博士研究生,主要从事肺脏离子转运研究。 <sup>△</sup> 通信作者, E-mail: hgnie@cmu.edu.cn。

be related with promotion of ENaC expression in AEC II.

**[Key words]** pulmonary fibrosis; bleomycin; epithelial sodium channels; bone marrow mesenchymal stem cells conditioned medium; epithelial-mesenchymal transition

肺纤维化是一种进行性加重的弥漫性肺间质疾病,以限制性通气功能障碍、进行性弥漫性肺间质纤维化为特征。过度沉积的胶原蛋白将会使肺组织增厚、肺泡的通气量降低,临床表现以慢性咳嗽、渐进性呼吸困难为主,最终可导致器官功能障碍和衰竭,预后极差,而临床缺乏有效的治疗方法<sup>[1-2]</sup>。因此,探究肺纤维化的发病机制,寻找积极、有效、安全的治疗方法,具有重要的理论和现实意义。近年来,肺泡上皮细胞间质转分化(EMT)在肺纤维化中的作用逐渐获得认可,被认为在肺纤维化发生、发展过程中发挥着重要作用<sup>[3]</sup>。EMT 是指在特定的生理及病理条件下,上皮细胞失去极性、细胞形态改变、上皮细胞标志物 E-钙黏素等丢失或表达下调、间质细胞标记物如  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -SMA)表达上调,最终使得细胞黏附能力减弱,增殖和迁移能力增强<sup>[3-4]</sup>。在肺泡内液体清除过程中,钠离子迁移主要依赖于顶膜侧上皮细胞钠通道(ENaC),随后由钠-钾-三磷酸腺苷酶泵送至基底外侧,并伴随着水运输<sup>[5]</sup>。目前认为钠离子( $\text{Na}^+$ )通过顶膜侧转运是关键的一步,ENaC 作为肺泡上皮细胞中的重要离子通道在肺泡盐水再吸收中起着至关重要的作用,但其在 EMT 中是否参与肺纤维化发病的调控机制仍未完全清楚。间充质干细胞(MSCs)是一种非造血成体干细胞,具有多向分化和自我更新能力。研究发现,MSCs 能够减轻肺组织损伤并促进其修复,可用于肺纤维化等肺部疾病治疗<sup>[6,7]</sup>,且 MSCs 所分泌的因子是其发挥组织修复作用的关键<sup>[8]</sup>。骨髓 MSCs 条件培养基(BMSCs-CM)是用于 MSCs 培养的无血清培养基,其内含有 MSC 分泌的各种因子。本研究通过构建博来霉素诱导的小鼠肺纤维化模型,探讨 ENaC 在肺纤维化发病中的相关作用,以及 BMSCs-CM 对小鼠肺泡上皮细胞 ENaC 的影响及机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验动物

健康 C57 雄性小鼠 20 只,SPF 级,体重( $20 \pm 2$ )g,鼠龄 8~10 周,用于动物造模;体重( $15 \pm 2$ )g,鼠龄 3 周,用于提取 BMSCs。由中国医科大学实验动物中心提供,动物合格证号:SCXK(辽)2015-0001。

#### 1.1.2 主要仪器和试剂

肺泡 II 型上皮细胞(AEC II);DMEM/F12 培养基、胎牛血清(FBS)购自美国 HyClone 公司,胰酶购自美国 Cellgro 公司,重组小鼠碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)、转化生长因子  $\beta$ 1(TGF- $\beta$ 1)购自美国 PeproTech 公司;博来霉素购自日本化药株式会社;TRIzol 购自美国 Life Technologies 公司;逆转录试剂

盒、实时荧光定量逆转录-PCR(RT-PCR)试剂盒、引物序列合成购自日本 TaKaRa 公司;小鼠抗  $\alpha$ -SMA 单克隆抗体购自美国 millipore 公司,兔抗  $\alpha$ -ENaC 单克隆抗体购自美国 Thermo 公司,兔抗  $\gamma$ -ENaC 单克隆抗体购自英国 abcam 公司,小鼠抗  $\beta$ -actin 单克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司;电化学发光(ECL)试剂盒购自美国 Thermo Fisher 公司;Masson 三色染色试剂盒购自南京森贝伽生物科技有限公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 博来霉素肺纤维化模型建立

将 20 只小鼠随机分为对照组和实验组,每组 10 只。以 10%水合氯醛按照 0.045 mL/10 g 腹腔注射麻醉小鼠,将小鼠固定于操作台,消毒颈部皮肤,眼科剪剪开颈前皮肤,钝性分离组织暴露气管。实验组用 1 mL 注射器气管内滴注博来霉素 2.5 mg/kg,对照组给予等剂量 0.9%氯化钠溶液,拔除注射器,迅速提起小鼠,绕长轴左右旋转,使药物分布均匀,缝合颈部皮肤。此后每日观察活动,测体重及每日死亡数量,21 d 后处死尚存活小鼠,收集肺脏标本。

#### 1.2.2 Masson 染色

小鼠右肺于 4%中性甲醛溶液中固定 24 h 后,进行常规脱水、透明、包埋,5  $\mu$ m 石蜡组织切片进行 Masson 染色。

#### 1.2.3 BMSCs-CM 的获取及细胞分组

BMSCs 分离、鉴定及 BMSCs-CM 获取具体方法参照本课题组前期研究<sup>[9]</sup>。用 2 mL 含 10% FBS、1%青霉素/链霉素及重组小鼠 bFGF(10 ng/mL)的 DMEM/F12 培养基冲洗小鼠股骨骨髓腔,获得骨髓细胞。将细胞置于 37  $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub> 和 95%O<sub>2</sub> 条件下培养,当第 2 代细胞生长融合 70%~80%时,加入无血清的 DMEM/F12 培养基,培养 24 h 收集其培养基即为 BMSCs-CM。将 BMSCs-CM 用 0.22  $\mu$ m 滤器过滤后置于 -20  $^{\circ}$ C 冰箱保存。体外常规培养 AEC II,用含 10%FBS 和 1%青霉素/链霉素的 DMEM/F12 培养基培养,待其生长融合 70%~80%时,将细胞随机分为 DMEM/F12 组(CON 组)、TGF- $\beta$ 1 组(TGF 组)、TGF- $\beta$ 1+BMSCs-CM 组(T+CM 组),每组设 4 个复孔( $1.6 \times 10^5$  个/孔)。其中,CON 组以无血清的 DMEM/F12 培养基培养 24 h,TGF 组以不含血清的 DMEM/F12 培养基并加入 TGF- $\beta$ 1(10 ng/mL)培养 24 h,T+CM 组同时以 TGF- $\beta$ 1 和获取的小鼠 BMSCs-CM 培养 24 h。

#### 1.2.4 RT-PCR 检测

用 TRIzol 试剂盒提取细胞总 RNA。紫外分光光度法进行准确定量,取 500 ng 进行逆转录,最后用 RT-PCR 仪检测组织中 TGF- $\beta$ 1、 $\alpha$ -SMA、 $\alpha$ / $\beta$ / $\gamma$ -ENaC 的表

达量。内参采用 GAPDH, 特异寡核苷酸引物, TGF- $\beta$ 1: 5'-AGC CTG GAC ACA CAG TAC-3' (正向), 5'-TGC ACT TGC AGG AGC GCA C-3' (反向);  $\alpha$ -SMA: 5'-CTA TGA AGG CTA TGC CCT GCC-3' (正向), 5'-GCT TCT CCT TGA TGT CTC GCA C-3' (反向);  $\alpha$ -ENaC: 5'-TAC AAC TCT TCC TAC ACT CGC CA-3' (正向), 5'-CTG GTT GAA ACG ACA GGT AAA GAT-3' (反向);  $\beta$ -ENaC: 5'-CAA TGA CAC CCA GTA TAA GAT GAC C-3' (正向), 5'-CAA TGA GGC ACA GCA CCG A-3' (反向);  $\gamma$ -ENaC: 5'-CAA TGA GAA CGA GAA GGG AAA G-3' (正向), 5'-AAG AAG CAG GTC ACC AGC AGT-3' (反向); GAPDH: 5'-GCA CAG TCA AGG CCG AGA AT-3' (正向), 5'-GCC TTC TCC ATG GTG GTG AA-3' (反向)。反应条件为 95 °C 预变性 30 s; 95 °C 变性 1 min, 58 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 1 min 共 30 个循环; 72 °C 再延伸 10 min。以 GAPDH 为内参, 采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算相对表达量。

1.2.5 Western blot 分析

提取肺组织和细胞的总蛋白, 12 000 r/min, 4 °C 离心 10 min, 取上清液存于 -20 °C 保存。每份样品取 30  $\mu$ g 蛋白裂解液分别进行十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 后, 将蛋白转到聚偏氟乙烯 (PVDF) 膜上, 用含 5% 牛血清白蛋白的 TBST 缓冲液在室温封闭 1 h, TBST 1 : 2 000 稀释  $\alpha$ -SMA、 $\alpha$ / $\gamma$ -ENaC、 $\beta$ -actin, 4 °C 孵育过夜后用 TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min。然后加入二抗辣根过氧化物酶标记抗鼠 IgG, 1 : 2 000 稀释。室温孵育 1 h, TBST 洗膜后与 ECL 试剂反应。X 线片曝光, 显影, 定影后分析。以  $\beta$ -actin 作为内参, 检测相应蛋白表达的变化。

1.3 统计学处理

采用 SPSS17.0 软件进行统计学分析, 计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较采用方差分析, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 两组小鼠体重和生存时间比较

两组小鼠体重均经历了先下降后上升的趋势, 实验组体重增加较对照组缓慢, 第 3 天起, 两组体重比较差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。与对照组比较, 实验组的生存时间明显缩短 ( $P < 0.05$ ), 见图 1。

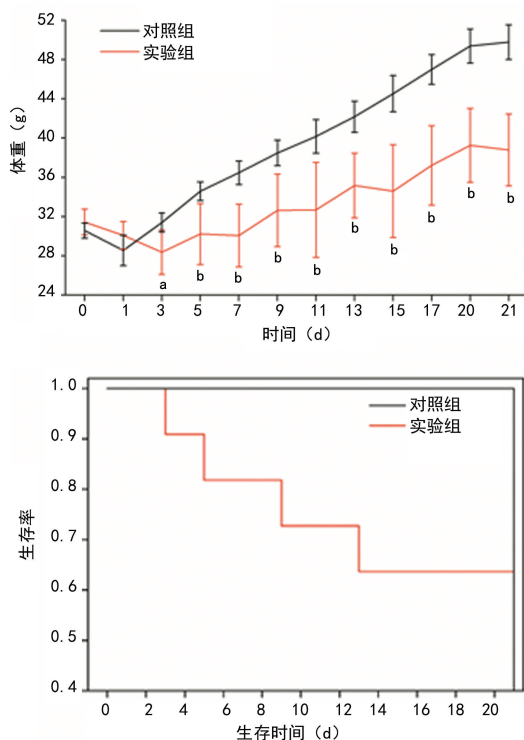
2.2 两组小鼠肺组织病理学改变

显微镜下观察, 对照组小鼠肺泡结构正常, 肺泡间隔无增厚, 未见充血、水肿病灶, 未见明显蓝色胶原沉积; 实验组小鼠肺泡结构破坏严重, 肺泡间隔明显增厚, 肺泡腔融合、陷闭, 肺泡形态基本消失, 大量蓝色胶原纤维填充, 提示造模成功。两组小鼠肺组织病理学改变, 见图 2。

2.3 两组小鼠肺组织中相关 mRNA 表达水平比较

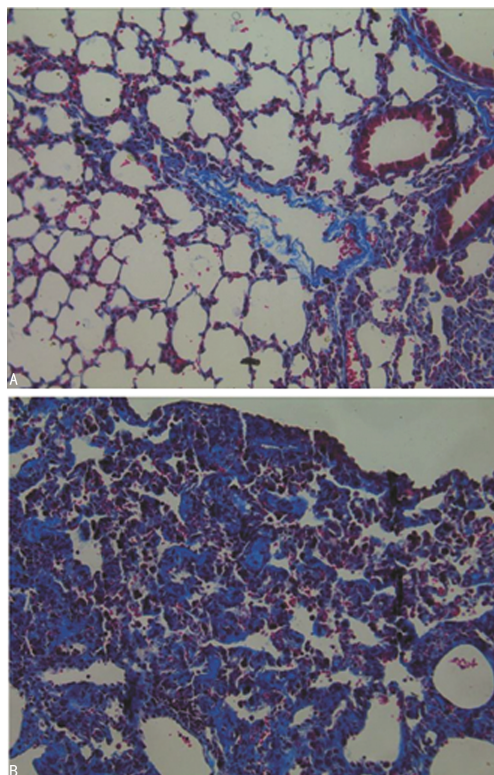
与对照组比较, 实验组小鼠肺组织中的 TGF- $\beta$ 1、 $\alpha$ -SMA 表达水平明显升高 ( $P < 0.05$ ); 而肺组织中的

$\alpha$ / $\beta$ / $\gamma$ -ENaC 表达水平明显降低 ( $P < 0.05$ ), 见图 3。



<sup>a</sup>:  $P < 0.05$ , <sup>b</sup>:  $P < 0.01$ , 与对照组比较。

图 1 两组小鼠体重和生存时间比较



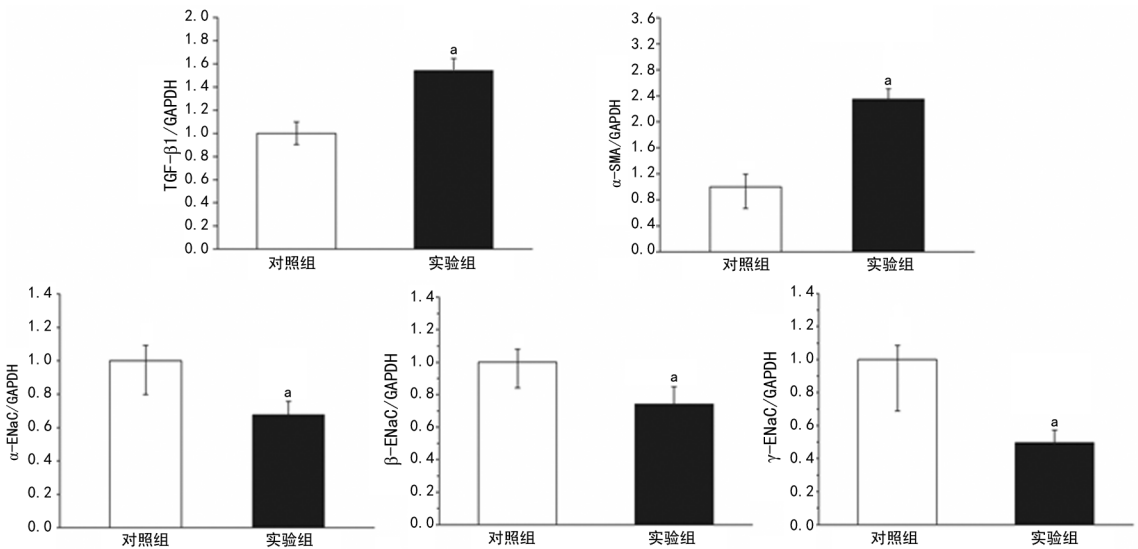
A: 对照组; B: 实验组。

图 2 两组小鼠肺组织 Masson 染色显微镜下观察 ( $\times 200$ )

2.4 两组小鼠肺组织中相关蛋白表达水平比较

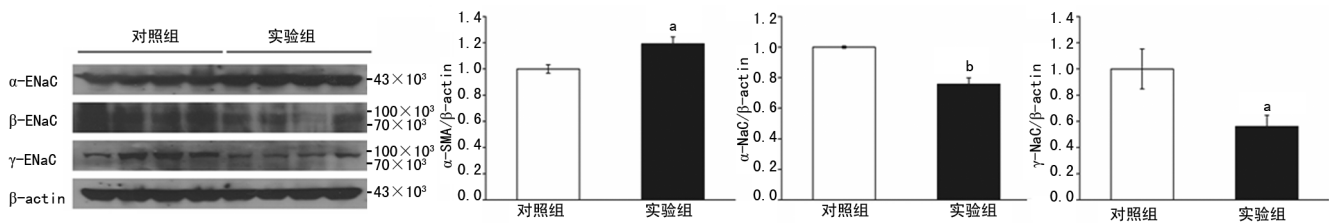
与对照组比较, 实验组小鼠肺组织中的  $\alpha$ -SMA 蛋白表达水平明显升高 ( $P < 0.05$ ); 而肺组织中的  $\alpha$ / $\gamma$ -ENaC 表达水平明显降低 ( $P < 0.05$ ), 见图 4。





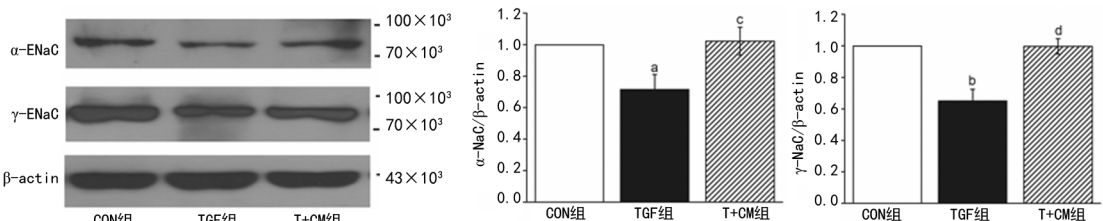
<sup>a</sup>:  $P < 0.05$ , 与对照组比较。

图 3 两组小鼠肺组织中相关因素 mRNA 表达水平比较 ( $n=3$ )



<sup>a</sup>:  $P < 0.05$ , <sup>b</sup>:  $P < 0.01$ , 与对照组比较。

图 4 两组小鼠肺组织中蛋白表达水平比较 ( $n=4$ )



<sup>a</sup>:  $P < 0.05$ , <sup>b</sup>:  $P < 0.01$ , 与 CON 组比较; <sup>c</sup>:  $P < 0.05$ , <sup>d</sup>:  $P < 0.01$ , 与 TGF 组比较。

图 5 各组 AEC II 中  $\alpha/\gamma$ -ENaC 蛋白表达水平比较 ( $n=3$ )

## 2.5 各组 AEC II 中 $\alpha/\gamma$ -ENaC 表达水平比较

与 CON 组比较, TGF 组小鼠 AEC II 中的  $\alpha/\gamma$ -ENaC 蛋白表达水平明显降低 ( $P < 0.05$ ); 与 TGF 组比较, T+CM 组 AEC II 中的  $\alpha/\gamma$ -ENaC 蛋白表达水平明显升高 ( $P < 0.05$ ), 见图 5。

## 3 讨论

肺纤维化是一种严重危害人类健康的呼吸系统常见并发症, 是各种不同病因的肺间质疾病的最后共同结果。从病理学角度看, 是两个生理平衡过程失衡的结果, 即成纤维细胞的增殖和凋亡, 以及细胞外基质的累积和分解<sup>[10-11]</sup>。博来霉素是目前世界公认的致肺纤维化药物<sup>[12-13]</sup>, 本实验通过气管内注射博来霉素建立肺纤维化模型, 肺纤维化小鼠的体重和生存时间均明显下降, 通过 RT-PCR 和 Western blot 检测显示实验组 TGF- $\beta$ 1 及  $\alpha$ -SMA 表达明显升高 ( $P > 0.05$ ), 说明肺纤维化小鼠的肺泡上皮细胞及气道上皮细胞发生了 EMT。同时结合 Masson 染色结果表

明本实验造模成功, 与前期报道一致<sup>[13]</sup>。

通过分子克隆技术已证实 ENaC 有  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ -ENaC 5 个亚基, 其生理功能是跨越紧密连接上皮单向转运  $\text{Na}^+$ , 调节水和离子的转运<sup>[14]</sup>。功能性 ENaC 通常由  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  亚基构成, 其中  $\alpha$  亚基构成 ENaC 的成孔通道, 是维持正常肺上皮  $\text{Na}^+$  转运所必需的通道<sup>[15]</sup>。在非洲爪蟾卵母细胞和细胞系 (H441、A549、CFPAC、Caco-2 cells) 中证实,  $\beta$ 、 $\gamma$  亚基调节  $\alpha$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$  亚基的活性<sup>[16]</sup>。通过 RT-PCR 和 Western blot 实验结果可以看出, 实验组中  $\alpha/\beta/\gamma$ -ENaC 的表达水平均降低, 这可能是由于博来霉素导致的肺纤维化早期, 伴有炎症导致的肺损伤和组织结构的破坏<sup>[17]</sup>, 导致 ENaC 的表达水平下降。因为  $\beta$ -ENaC 没有公认的特异性抗体, 所以本实验未能在蛋白水平进行该亚基水平检测。目前, 临床上比较公认的肺纤维化发病机制, 是上皮细胞向成纤维细胞到肌成纤维细胞转化, 伴随着细胞外基质在结缔组织累计, 最终导致肺纤维

化<sup>[18]</sup>。同时,ENaC 主要在上皮细胞表达。由此看来,在肺纤维化中 ENaC 的表达可能与上皮细胞的减少有关。

BMSC 具有治疗肺纤维化的作用,其旁分泌效应具有抗炎、抗纤维化和调节肺通透性的作用,其作用机制主要涉及增加抗炎介质、减少促炎性因子分泌的免疫调节效应、分泌生长因子的屏障修复效应等<sup>[19]</sup>。本研究结果显示,BMSCs-CM 使 AEC II 中 ENaC 的蛋白表达增加,由此推测 BMSCs-CM 可能通过提高肺泡上皮细胞的 ENaC 表达水平,调节肺泡液体清除,对肺泡上皮细胞起到保护作用。由于 BMSCs 条件培养基中含有其分泌的各种因子,因此,本研究推测其分泌的一些特异性生长因子可能参与其中,具体机制有待于进一步研究。

综上所述,本研究阐明 ENaC 表达的改变可能参与了肺纤维化的发病过程,而 BMSCs-CM 治疗肺纤维化的机制可能与促进 AEC II 中 ENaC 的表达有关,此结果将为以后寻求合适药物减轻肺纤维化状态提供理论基础。

## 参考文献

[1] RAGHU G, ROCHWERG B, ZHANG Y, et al. An official ATS/ERS/JRS/ALAT clinical practice guideline: treatment of idiopathic pulmonary fibrosis, an update of the 2011 clinical practice guideline [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2015, 192(5): 644.

[2] 郭敬文, 张振玲, 邵华. 肺纤维化药物治疗机制研究进展[J]. *中国职业医学*, 2017, 44(5): 633-637.

[3] PIERA-VELAZQUEZ S, MENDOZA F A, JIMENEZ S A. Endothelial to mesenchymal transition (EndoMT) in the pathogenesis of human fibrotic diseases[J]. *J Clin Med*, 2016, 5(4): 45.

[4] MUTHURAMALINGAM K, CHO M, KIM Y. Cellular senescence and EMT crosstalk in bleomycin-induced pathogenesis of pulmonary fibrosis-an in vitro analysis[J]. *Cell Biol Int*, 2020, 44(2): 477-487.

[5] WARE L B, MATTHAY M A. Clinical practice. Acute pulmonary edema [J]. *N Engl J Med*, 2005, 353(26): 2788-2796.

[6] CAEDENES N, ALVAREZ D, SELLAES J, et al. Senescence of bone marrow-derived mesenchymal stem cells from patients with idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2018, 9(1): 1-10.

[7] CHU K A, WANG S Y, YE H C C, et al. Reversal of bleomycin-induced rat pulmonary fibrosis by a xenograft of human umbilical mesenchy-

mal stem cells from Wharton's jelly [J]. *Theranostics*, 2019, 9(22): 6646-6664.

[8] KUPCOVA S H. Proteomic techniques for characterisation of mesenchymal stem cell secretome [J]. *Biochimie*, 2013, 95(12): 2196-2211.

[9] 周祉好, 昌建钧, 候亚鹏, 等. 骨髓间充质干细胞条件培养基对小鼠肺泡上皮细胞增殖的影响及机制[J]. *山东医药*, 2018, 58(20): 5-8.

[10] FERNANDEZ I E, EICKELBERG O. New cellular and molecular mechanisms of lung injury and fibrosis in idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Lancet*, 2012, 380(9842): 680-688.

[11] TODD N W, LUZINA I G, ATAMAS S P. Molecular and cellular mechanisms of pulmonary fibrosis [J]. *Fibrogenesis Tissue Repair*, 2012, 5(1): 1-24.

[12] 高云星, 蒋莉莉, 张倩, 等. 吴茱萸次碱通过抑制 Notch1/eIF3a 信号通路保护博来霉素诱导的大鼠肺纤维化[J]. *中国中药杂志*, 2018, 43(17): 3530-3538.

[13] 王慧慧, 蒙艳丽, 杨志敏, 等. 地龙对肺纤维化小鼠肺组织中纤维化因子 TGF- $\beta$ 1 及  $\alpha$ -SMA 表达的影响[J]. *中国中药杂志*, 2019(24): 5473-5478.

[14] QADRI Y J, ROOJ A K, FULLER C M. ENaCs and ASICs as therapeutic targets [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2012, 302(7): C943-965.

[15] 刘宏飞, 候亚鹏, 周祉好, 等. 无赖氨酸激酶 4 在小鼠气管上皮细胞液体转运中的作用[J]. *中国细胞生物学学报*, 2019, 41(1): 103-107.

[16] JI H L, SU X F, KEDAR S, et al. Delta-subunit confers novel biophysical features to alpha beta gamma-human epithelial sodium channel (ENaC) via a physical interaction [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(12): 8233-8241.

[17] 孙晴波, 林炳静, 徐寒梅, 等. 肺纤维化的发病机制及其治疗药物研究进展[J]. *药学进展*, 2018, 42(11): 868-873.

[18] LIU G, WANG Y, YANG L, et al. Tetraspanin 1 as a mediator of fibrosis inhibits EMT process and Smad2/3 and beta-catenin pathway in human pulmonary fibrosis [J]. *J Cell Mol Med*, 2019, 23(5): 3583-3596.

[19] LEE J W, KRASNODEMBSKAYA A, MCKENNA D H, et al. Therapeutic effects of human mesenchymal stem cells in ex vivo human lungs injured with live bacteria [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2013, 187(7): 751-760.