

RUNX3通过调控FAP对小鼠肺原代成纤维细胞增殖的影响

尤峻柏¹,汪先晨¹,凌辉¹,范家好¹,陈齐²,陶辉²,沙纪名¹

(安徽医科大学第二附属医院¹胸外科、²麻醉与围手术期医学科,合肥 230601)

摘要 目的 探讨Runt相关转录因子3(RUNX3)在转化生长因子- β 1(TGF- β ₁)诱导的小鼠肺原代成纤维细胞(PFs)活化中的作用,以及其对成纤维细胞活化蛋白(FAP)表达、细胞增殖与胶原合成的影响。**方法** 从C57BL/6小鼠中分离并培养PFs,利用小干扰RNA(siRNA)技术构建RUNX3基因沉默模型,并将细胞分为空白对照组(Control组)、TGF- β ₁组(TGF- β ₁组)、阴性对照组(TGF- β ₁+siRNA-NC组)及RUNX3沉默组(TGF- β ₁+si-RUNX3组),并在TGF- β ₁刺激基础上进行RUNX3过表达回复实验。采用蛋白质印迹(Western blot)和实时荧光定量逆转录PCR(RT-qPCR)检测RUNX3、FAP及I型胶原(COL1A1)的表达;以CCK-8和EdU评估细胞增殖;免疫荧光双标观察COL1A1与FAP的表达。**结果** 与Control组相比,TGF- β ₁组PFs中RUNX3、FAP及COL1A1的表达上调($P < 0.01$)。CCK-8实验显示,与阴性对照组比较,RUNX3沉默组吸光度值下降($P < 0.01$);EdU实验显示,与阴性对照组比较,RUNX3沉默组的EdU阳性细胞率降低($P < 0.01$)。免疫荧光双标染色显示,与阴性对照组比较,RUNX3沉默组COL1A1与FAP的荧光强度减弱;在RUNX3过表达回复实验中,上述荧光信号出现回升($P < 0.01$)。**结论** RUNX3在TGF- β ₁诱导下刺激PFs细胞活化,可能通过正向调控FAP表达促进细胞增殖与胶原合成。靶向干预RUNX3/FAP轴为肺纤维化治疗提供潜在策略。

关键词 RUNX3;肺成纤维细胞;FAP;细胞增殖;肺纤维化

中图分类号 R332.2;R322.3;R563.9

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2026)04-0606-07

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2026.04.003

特发性肺纤维化(idiopathic pulmonary fibrosis, IPF)是一种病因未明的慢性进行性间质性肺疾病,以肺成纤维细胞异常增殖/活化及细胞外基质过度沉积为主要病理特征,最终导致肺结构破坏和功能衰竭^[1-2]。尽管吡非尼酮与尼达尼布可延缓疾病进展,IPF总体预后仍不理想,亟需进一步阐明关键分子机制以探索新的干预靶点^[3-4]。

肺成纤维细胞活化并向肌成纤维细胞表型转化是IPF进展的核心环节^[5-6]。除传统标志物 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)外,成纤维细胞活化蛋白(fibroblast activation protein, FAP)被认为具有更高特异性,且与多器官纤维化过程密切相关^[7-9]。Runt相关转录因子(Runt-related transcription factor, RUNX)家族成员RUNX3可参与细胞分化、增殖与凋亡等过程^[10],并被报道为转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)信号通路下游关键分子,在肝、肾纤维化中发挥作

用^[11];其在肺纤维化中是否与FAP相关并影响肺成纤维细胞功能仍待明确。该研究聚焦RUNX3,结合siRNA敲低与过表达回复实验,观察RUNX3与FAP及纤维化相关表型/基因表达的变化,为理解IPF分子机制提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物 选用20只雄性SPF级C57BL/6小鼠,由安徽医科大学第二附属医院实验动物中心提供。所有小鼠均饲养于标准实验动物设施内,环境条件符合实验动物饲养管理规范,以确保其健康状况满足后续研究需求。本研究方案经安徽医科大学实验动物伦理委员会审批通过(编号:LLSC 20231701)。

1.2 实验试剂及仪器 兔抗RUNX3多克隆抗体(货号:27099-1-AP)、兔抗FAP多克隆抗体(货号:27596-1-AP)及兔抗I型胶原蛋白(type I collagen, Collagen I)多克隆抗体(货号:14695-1-AP)、FITC标记的羊抗兔IgG(货号:SA00003-2)与Cy3标记的羊抗兔IgG(货号:SA00009-2)均购自武汉Proteintech公司;小鼠抗 β -actin单克隆抗体(货号:3700)购自美国Cell Signaling Technology公司;TGF- β ₁购自

2026-02-01 接收

基金项目:安徽省高校自然科学基金项目(编号:2023AH040376)

作者简介:尤峻柏,男,硕士研究生;

沙纪名,男,博士,副主任医师,硕士生导师,通信作者, E-mail:shajiming@vip.163.com

美国 PeproTech 公司; siRNA-RUNX3 及阴性对照 siRNA (si-NC) 由上海吉玛公司合成; RUNX3 过表达质粒 (pCMV-RUNX3) 及空载质粒 (pCMV) 购自武汉森灵生物科技有限公司; Lipofectamine 3000 转染试剂、TRIzol 试剂均购自美国 Invitrogen 公司; CCK-8 试剂盒购自合肥 Biosharp 公司; 5-乙炔基-2'-脱氧尿苷 (5-ethynyl-2'-deoxyuridine, EdU) 细胞增殖检测试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司; 实时荧光定量逆转录聚合酶链反应 (reverse transcription quantitative real-time polymerase chain reaction, RT-qPCR) 试剂盒购自湖南艾克瑞生物工程有限公司; 细胞培养试剂 (包括培养基、血清等) 购自美国 Gibco 公司。

1.3 肺原代成纤维细胞 (primary fibroblasts, PFs) 的分离、培养与鉴定 取 1~3 d 新生的乳鼠, 所有乳鼠通过吸入异氟烷 (4% 浓度诱导麻醉, 1.5%~2.0% 维持) 进行麻醉, 并通过足部夹捏反射消失确认麻醉深度。随后采用颈椎脱臼法实施安乐死。随后将乳鼠置于 75% 乙醇中浸泡 30 s, 以达到消毒目的, 再将其放置于细胞超净工作台上。通过暴露胸腔并在右心室注入预冷的磷酸盐缓冲液 (PBS), 对肺组织进行灌流处理。灌流后的肺组织被取出并剪碎成直径约 1 mm 的小块, 随后用 PBS 洗涤 3 次以清除残留血液和细胞碎片。接下来, 将处理好的组织块加入到离心管中, 并加入 5 mL 预先配制好的消化液 (该消化液由 0.25% 的胰蛋白酶、0.2% 的 II 型胶原酶和培养基按 2:2:1 的比例混合而成)。将离心管放入 37 °C 水浴消化 30 min。消化过程结束后, 加入 3 μ L 完全培养基以终止消化反应, 并通过低温离心机以 200 r/min 的速度离心 6 min。离心后, 将上清液转移到新的离心管中。首先对组织糜进行了过滤, 随后重复执行了先前的消化过程 2~3 次, 以确保细胞的充分释放。在完成所有的消化步骤之后, 将所得的上清液合并以便于后续操作。依据既定的离心参数, 舍弃上清液, 进而使用 1 mL 的培养基对细胞进行重悬, 并将培养基的体积补充至 4 μ L。将细胞悬液转移至培养箱初步培养 5 h 后, 更换新鲜培养液。通过评估细胞沉降的速度以及它们贴壁的能力, 结合细胞形态学的观察, 最终确认所提取的细胞为 PFs。

1.4 细胞处理与实验分组 使用含 TGF- β_1 (5 ng/mL) 的无血清培养基刺激 PFs 24 h, 建立体外纤维化细胞模型。随后细胞分为 4 组: 空白对照组 (Control 组), 使用不含 TGF- β_1 的完全培养基培养; TGF- β_1

组, 使用含 5 ng/mL TGF- β_1 的无血清培养基处理 24 h; 阴性对照转染组 (TGF- β_1 +siRNA-NC 组), 在 TGF- β_1 刺激基础上, 转染阴性对照 siRNA; RUNX3 沉默组 (TGF- β_1 +si-RUNX3 组), 在 TGF- β_1 刺激基础上, 转染靶向 RUNX3 的 siRNA。为进一步验证 RUNX3 在该模型中的作用, 进行过表达回复实验, RUNX3 过表达回复实验分为 2 组: TGF- β_1 +pCMV 组, 在 TGF- β_1 刺激基础上, 转染空载质粒 pCMV; TGF- β_1 +pCMV-RUNX3 组, 在 TGF- β_1 刺激基础上, 转染 RUNX3 过表达质粒 pCMV-RUNX3。所有转染实验采用 Lipofectamine 3000 试剂, 转染后 48 h 收集细胞进行后续检测。

1.5 检测指标与方法

1.5.1 细胞模型的建立 PFs 在 37 °C、5%CO₂ 恒温培养箱中培养, 常规使用完全培养基维持生长, 待细胞生长状态良好且细胞密度达约 70%~80%, 将细胞更换为无血清培养基并加入 TGF- β_1 (5 ng/mL) 刺激 24 h。在 TGF- β_1 刺激基础上, 采用 Lipofectamine 3000 按说明书配制转染复合物, 分别转染阴性对照 siRNA (siRNA-NC)、靶向 RUNX3 的 siRNA (si-RUNX3)、空载质粒 pCMV 及 RUNX3 过表达质粒 pCMV-RUNX3。转染完成后继续培养, 转染后 48 h 收集细胞用于后续检测。

1.5.2 Western blot 检测蛋白表达 PFs 经过分组处理后, 向每瓶加入 150 μ L 的 RIPA+PMSF 裂解液, 每孔加入 100 μ L。随后, 将细胞置于 4 °C 环境下进行慢速振荡 30 min 以实现细胞裂解, 并将裂解后的细胞收集于离心管中。利用低温离心机对细胞进行离心处理并重新悬浮细胞, 然后采用 BCA 法测定蛋白浓度。接下来, 通过 SDS-PAGE 蛋白电泳方法对蛋白进行分离。电泳完成后, 将凝胶上的蛋白转移到 PVDF 膜上, 转移过程采用 200 mA, 转移时间按蛋白分子量估算 (约 1 min/ku) 进行。转膜完成后, 使用 5% 脱脂牛奶对膜进行封闭处理 2 h, 并用 TBST 洗涤膜 3 次。之后, 在 4 °C 冰箱中与相应的一抗进行慢速振荡孵育过夜, 时间为 12~14 h。孵育完成后, 用 TBST 洗涤膜 3 次, 然后在室温下放上慢速摇床孵育二抗 2 h。随后再用 TBST 洗涤 3 次, 10 min/次, 并在凝胶成像仪上进行显影。为确保实验数据的准确性和可重复性, 整个实验重复进行了 3 次以验证结果的一致性。

1.5.3 RT-qPCR 检测 mRNA 表达 从细胞或组织样本中提取 RNA, 并验证 RNA 的质量和浓度; 利用

逆转录酶将提取的RNA逆转录为cDNA;设计特异性引物,用于扩增目标基因和内参基因;配制实时荧光定量聚合酶链式反应(quantitative polymerase chain reaction, qPCR)混合物,包括cDNA模板、特异性引物、荧光染料和qPCR主混合物;设置qPCR循环参数,包括预变性、变性、退火和延伸步骤;运行qPCR循环,并在每个循环后测量荧光信号;分析扩增曲线和熔解曲线,验证PCR产物的特异性;采用内参基因进行标准化,计算目标基因的相对表达量。

1.5.4 细胞增殖检测

1.5.4.1 CCK-8法 将细胞以 5×10^3 个/孔的密度接种于96孔板,分组处理。分别于处理24、48、72 h后,每孔加入10 μ L CCK-8试剂,继续孵育2 h。用酶标仪在450 nm波长处测定吸光度(absorbance, A)值。

1.5.4.2 EdU染色法 将细胞接种于24孔板中的细胞爬片上,分组处理。按试剂盒说明书,每孔加入含EdU的培养基孵育2 h。固定、透化后,进行Click-iT反应检测EdU掺入,并用Hoechst 33342染核。荧光显微镜下观察拍照,随机选取5个视野计算EdU阳性细胞百分比。

1.5.5 免疫荧光双标染色检测COL1A1与FAP的共表达 将细胞接种于24孔板的细胞爬片上,分组处理。细胞经4%多聚甲醛固定15 min,0.5% Triton X-100通透10 min,5% BSA封闭1 h。随后,加入兔抗COL1A1一抗(1:200)和兔抗FAP一抗(1:200)的混合液,4 $^{\circ}$ C孵育过夜。PBS洗涤后,加入FITC标记的羊抗兔IgG(1:200)和Cy3标记的羊抗兔IgG(1:200)的混合液,室温避光孵育1 h。PBS洗涤后,用DAPI染核5 min。封片后于荧光显微镜下观察。

1.6 统计学处理 收集的数据在GraphPad Prism 8.0中进行统计分析。组间差异的比较,采用单因素方差分析(ANOVA)结合Tukey多重比较检验。所有实验均设置至少3个生物学重复,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RUNX3沉默对TGF- β_1 诱导的PFs中FAP及COL1A1表达的影响 Western blot与RT-qPCR结果显示(图1),与Control组相比,TGF- β_1 组中RUNX3、FAP及COL1A1的蛋白和mRNA表达水平上调($P < 0.01$ 或 $P < 0.001$)。在TGF- β_1 刺激下,与阴

性对照组相比,RUNX3沉默组RUNX3、FAP和COL1A1的表达降低($P < 0.001$ 或 $P < 0.01$)。此结果提示,RUNX3可能上调了FAP和COL1A1的表达。

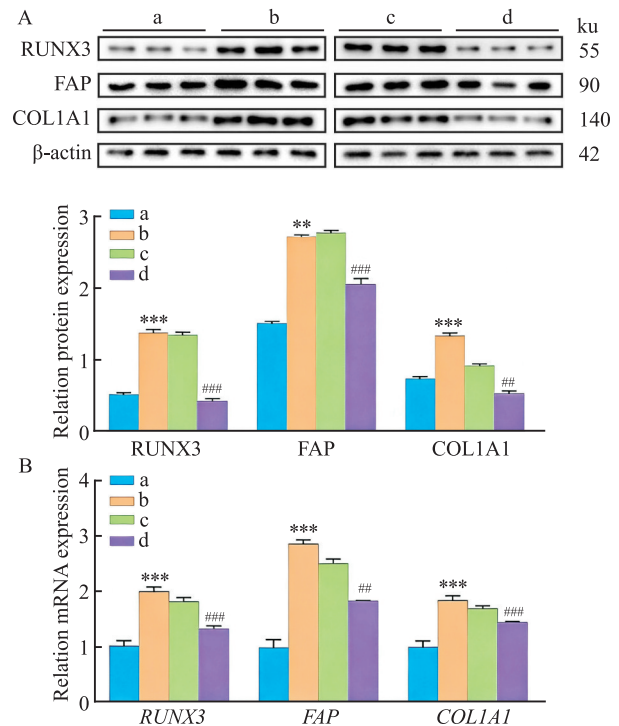


图1 RUNX3沉默对TGF- β_1 诱导的FAP及COL1A1表达的影响

Fig. 1 The effects of RUNX3 silencing on TGF- β_1 -induced FAP and COL1A1 expression

A: Western blot analysis of RUNX3, FAP, and COL1A1 protein expression levels in Control group, TGF- β_1 group, TGF- β_1 +siRNA-NC and TGF- β_1 +si-RUNX3 group and corresponding quantification; B: RT-qPCR analysis of relative mRNA expression levels of RUNX3, FAP, and COL1A1 in each group; β -actin was used as the internal control; a: Control group; b: TGF- β_1 group; c: TGF- β_1 +siRNA-NC group; d: TGF- β_1 +si-RUNX3 group; ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs Control group; ### $P < 0.01$, #### $P < 0.001$ vs TGF- β_1 +siRNA-NC group.

2.2 RUNX3沉默对肺成纤维细胞增殖能力的影响 CCK-8实验显示,与Control组相比,TGF- β_1 组细胞在450 nm处的吸光度值升高($P < 0.001$);而在TGF- β_1 刺激基础上,RUNX3沉默组的吸光度值较阴性对照组降低($P < 0.01$)。EdU染色结果显示,与Control组比较,TGF- β_1 组的EdU阳性细胞率升高($P < 0.001$),表明细胞处于活跃的增殖状态。而在RUNX3沉默后,与阴性对照组相比,RUNX3沉默组EdU阳性细胞率降低($P < 0.01$),进一步在单细胞水平证实了RUNX3对肺成纤维的增殖作用。见图2。

2.3 RUNX3沉默对COL1A1与FAP共表达水平的影响 免疫荧光双标染色结果显示:Control组

COL1A1(红色)与FAP(绿色)的荧光信号较弱,经TGF-β₁刺激后,COL1A1($P<0.001$)与FAP($P<0.01$)的荧光强度均增强;然而,在RUNX3沉默后,RUNX3沉默组COL1A1与FAP的荧光强度均较TGF-β₁组及阴性对照组减弱($P<0.001$)。该结果表明,RUNX3沉默可降低COL1A1和FAP各自的表

达,提示RUNX3可能协同调控这两个纤维化关键蛋白的表达与分布。见图3。

2.4 RUNX3过表达回复实验及功能评估 功能回复实验结果所示,与TGF-β₁+pCMV组比较,TGF-β₁+pCMV-RUNX3组中RUNX3、FAP及COL1A1的表达水平升高(均 $P<0.001$)。EdU检测显示,与

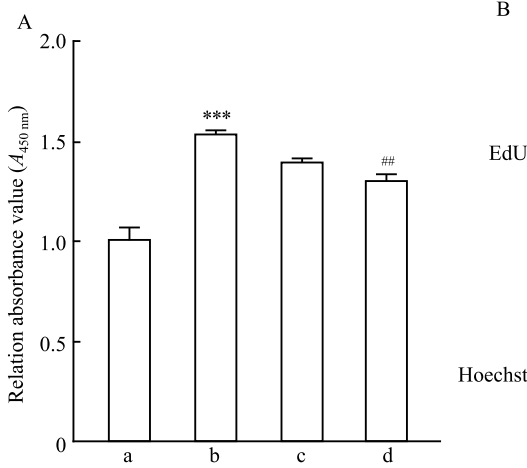
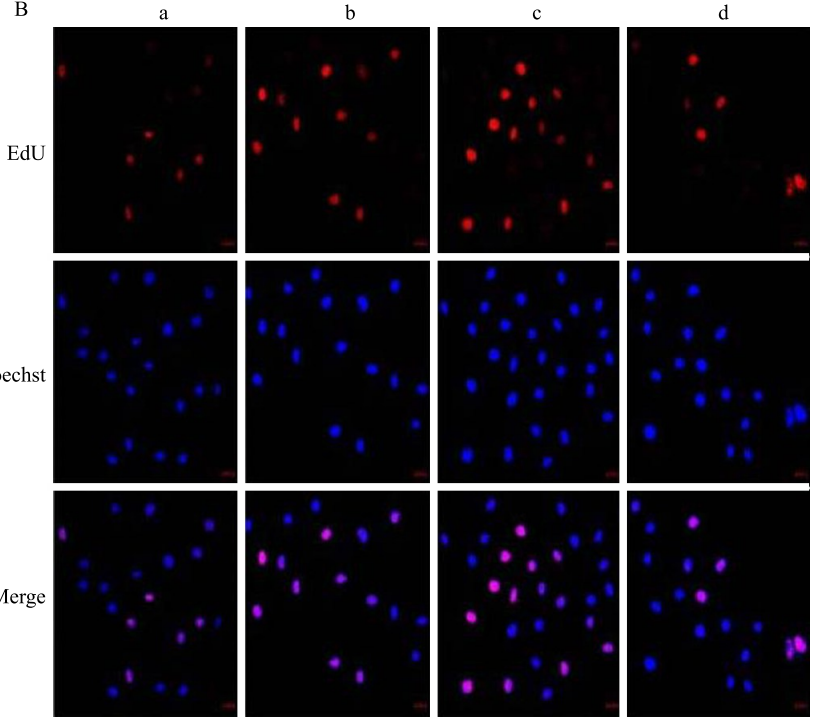


图2 RUNX3沉默抑制肺成纤维细胞的增殖能力
Fig. 2 RUNX3 silencing inhibited lung fibroblast proliferation

A: Cell proliferative viability in each group was assessed by CCK-8 assay (absorbance at 450 nm); B: DNA synthesis activity in each group was evaluated by EdU staining (×200); EdU (red) indicates



S-phase proliferating cells; Hoechst (blue) marks nuclei; Merge (pink) denotes EdU-positive proliferating cells; a: Control group; b: TGF-β₁ group; c: TGF-β₁+siRNA-NC group; d: TGF-β₁+si-RUNX3 group; *** $P<0.001$ vs Control group; ## $P<0.01$ vs TGF-β₁+siRNA-NC group.

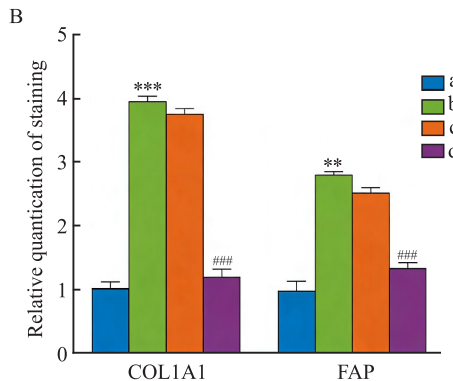
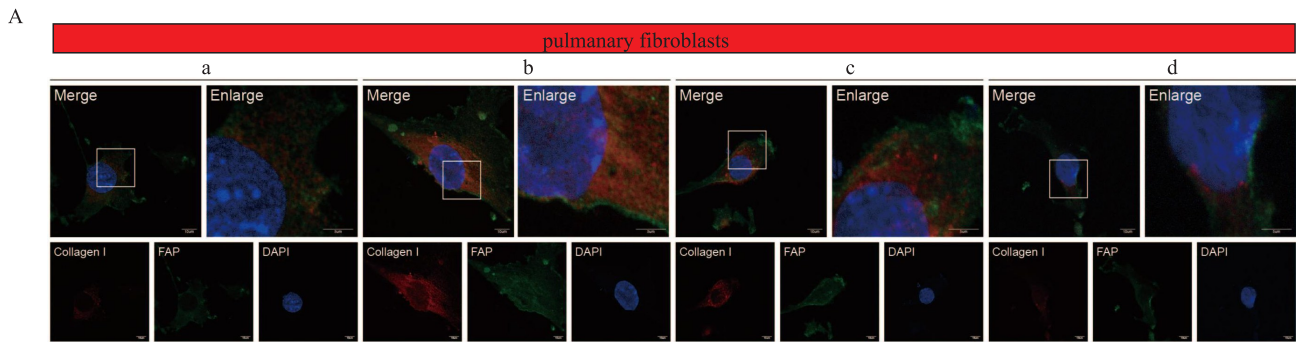


图3 免疫荧光双染色(A)检测各组细胞中COL1A1(红色)与FAP(绿色)的表达及其直方图统计结果(B) ×200

Fig. 3 Immunofluorescence double staining (A) was performed to examine COL1A1 (red) and FAP (green) expression in each group, with histogram-based quantification shown in (B) ×200

Scale bar: 50 μm; a: Control group; b: TGF-β₁ group; c: TGF-β₁+siRNA-NC group; d: TGF-β₁+si-RUNX3 group; ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ vs Control group; #### $P<0.001$ vs TGF-β₁+siRNA-NC group.

TGF-β₁+pCMV 组比较, TGF-β₁+pCMV-RUNX3 组的 EdU 阳性细胞率升高 ($P < 0.001$); 免疫荧光双染色结果显示, 与 TGF-β₁+pCMV 组比较, TGF-β₁+pCMV-RUNX3 组中 COL1A1 与 FAP 的荧光信号增强。此实验从反面证实了 RUNX3 增加了 FAP 表达及促进了细胞活化进而促进细胞增殖。见图 4。

3 讨论

本研究聚焦于转录因子 RUNX3 在肺纤维化细胞模型中的作用, 将其与成纤维细胞激活蛋白 FAP 的表达调控相联系。结果显示, 在 TGF-β₁ 诱导的小鼠肺原代成纤维细胞中, RUNX3 的表达上调, 并正向调控 FAP 及 COL1A1 的表达。功能学实验表明, 沉默 RUNX3 能有效抑制细胞的异常增殖 (CCK-8 及 EdU 实验证实)。此外, 免疫荧光双染色揭示, RUNX3 沉默降低了 COL1A1 与 FAP 的荧光强度水平。过表达回复实验则从反面验证了 RUNX3 在该过程中的驱动作用。以上结果表明, RUNX3 可能是连接 TGF-β₁ 信号与肺成纤维细胞活化的一个重要

枢纽^[12]。

FAP 作为一种 II 型跨膜丝氨酸蛋白酶, 在活化的成纤维细胞中高表达, 不仅可作为细胞活化的标志物, 还直接参与细胞外基质重塑、细胞迁移及生长因子信号调控^[13-14]。本研究观察到 RUNX3 变化与 FAP 表达一致, 提示 RUNX3 可能通过转录层面正向调控 FAP, 从而促进成纤维细胞活化及胶原合成。后续可通过 ChIP-qPCR、双荧光素酶报告基因等实验验证 RUNX3 是否直接结合 FAP 启动子并调控其转录活性, 同时结合 α-SMA、FN1 等标志物进一步完善活化表型评估^[15]。

本研究仍存在局限性: 目前结论主要基于体外原代细胞模型, RUNX3-FAP 轴在体内肺纤维化模型中的作用仍需验证; 此外, RUNX3 调控 FAP 的直接性及其下游信号网络尚未明确。未来可在博来霉素诱导的肺纤维化模型中开展组织水平验证, 并结合基因干预与药物干预探索其潜在转化价值。

综上所述, RUNX3 在 TGF-β₁ 诱导下刺激 PFs 活化, 其机制可能涉及对 FAP 表达的正向调控, 进而

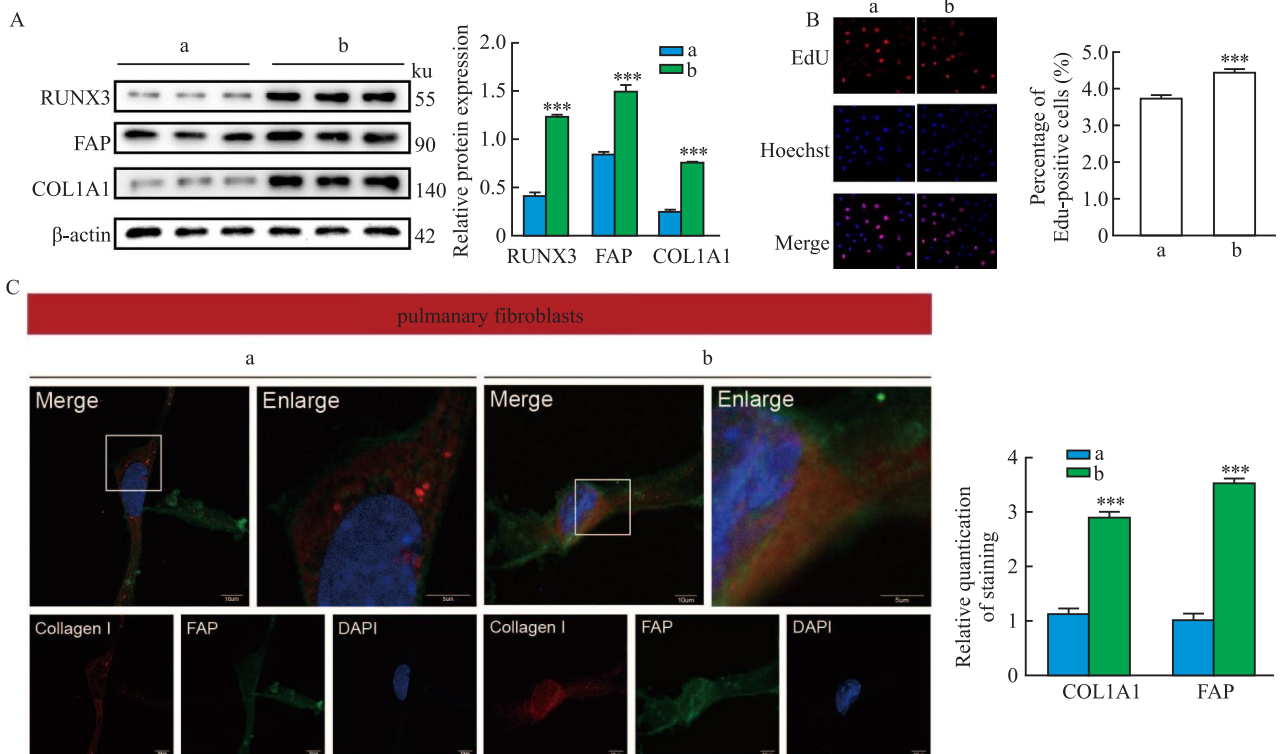


图4 RUNX3过表达回复实验验证其功能

Fig. 4 RUNX3 overexpression rescue experiment verified its function

A: Western blot analysis of the effects of RUNX3 overexpression on the protein expression of FAP and COL1A1 under TGF-β₁ stimulation; B: EdU staining assessing the impact of RUNX3 overexpression on cell proliferation ×200; C: Immunofluorescence double staining evaluating the effects of RUNX3 overexpression on the expression of COL1A1 (red) and FAP (green); DAPI (blue) was used to stain nuclei; Scale bar: 50 μm; a: TGF-β₁+pCMV group; b: TGF-β₁+pCMV-RUNX3 group; *** $P < 0.001$ vs TGF-β₁+pCMV group.

驱动细胞的增殖、迁移及胶原合成过程。靶向干预 RUNX3/FAP轴有望为肺纤维化的治疗提供新的分子靶点。

参考文献

- [1] Lederer D J, Martinez F J. Idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *N Engl J Med*, 2018, 378 (19): 1811-23. doi: 10.1056/nejmra1705751.
- [2] Moss B J, Ryter S W, Rosas I O. Pathogenic mechanisms underlying idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Annu Rev Pathol Mech Dis*, 2022, 17: 515-46. doi: 10.1146/annurev-pathol-042320-030240.
- [3] King T E Jr, Bradford W Z, Castro-Bernardini S, et al. A phase 3 trial of pirfenidone in patients with idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *N Engl J Med*, 2014, 370(22): 2083-92. doi:10.1056/nejmoa1402582.
- [4] Martinez F J, Collard H R, Pardo A, et al. Idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2017, 3: 17074. doi: 10.1038/nrdp.2017.74.
- [5] Hinz B, Phan S H, Thannickal V J, et al. The myofibroblast one function, multiple origins [J]. *Am J Pathol*, 2007, 170 (6): 1807-16. doi:10.2353/ajpath.2007.070112.
- [6] Wang J, Li K, Hao D, et al. Pulmonary fibrosis: pathogenesis and therapeutic strategies [J]. *MedComm*, 2024, 5(10): e744. doi: 10.1002/mco2.744.
- [7] Lavis P, Garabet A, Cardozo A K, et al. The fibroblast activation protein alpha as a biomarker of pulmonary fibrosis [J]. *Front Med*, 2024, 11: 1393778. doi:10.3389/fmed.2024.1393778.
- [8] Basalova N, Alexandrushkina N, Grigorieva O, et al. Fibroblast activation protein alpha (FAP α) in fibrosis: beyond a perspective marker for activated stromal cells? [J]. *Biomolecules*, 2023, 13 (12): 1718. doi:10.3390/biom13121718.
- [9] Acharya P S, Zukas A, Chandan V, et al. Fibroblast activation protein: a serine protease expressed at the remodeling interface in idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Hum Pathol*, 2006, 37 (3): 352-60. doi:10.1016/j.humpath.2005.11.020.
- [10] Ito Y, Miyazono K. RUNX transcription factors as key targets of TGF- β superfamily signaling [J]. *Curr Opin Genet Dev*, 2003, 13 (1): 43-7. doi:10.1016/S0959-437X(03)00007-8.
- [11] Ojha U, Kim S, Rhee C Y, et al. Endothelial RUNX3 controls LSEC dysfunction and angiocrine LRG1 signaling to prevent liver fibrosis [J]. *Hepatology*, 2025, 81(4): 1228-43. doi: 10.1097/hep.0000000000001018.
- [12] Giarratana A O, Prendergast C M, Salvatore M M, et al. TGF- β signaling: critical nexus of fibrogenesis and cancer [J]. *J Transl Med*, 2024, 22: 594. doi:10.1186/s12967-024-05411-4.
- [13] Juillerat-Jeanneret L, Tafelmeyer P, Golshayan D. Fibroblast activation protein- α in fibrogenic disorders and cancer: more than a prolyl-specific peptidase? [J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2017, 21(10): 977-91. doi:10.1080/14728222.2017.1370455.
- [14] Fitzgerald A A, Weiner L M. The role of fibroblast activation protein in health and malignancy [J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2020, 39(3): 783-803. doi:10.1007/s10555-020-09909-3.
- [15] Chuang L S H, Ito K, Ito Y. RUNX family: regulation and diversification of roles through interacting proteins [J]. *Int J Cancer*, 2013, 132(6): 1260-71. doi:10.1002/ijc.27964.

RUNX3 regulates FAP to influence the proliferation of mouse lung primary fibroblasts

You Junbo¹, Wang Xianchen¹, Ling Hui¹, Fan Jiahao¹, Chen Qi², Tao Hui², Sha Jiming¹

(¹*Dept of Thoracic Surgery*, ²*Dept of Anesthesiology and Perioperative Medicine*,
The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601)

Abstract Objective To investigate the role of runt-related transcription factor 3 (RUNX3) in transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1)-induced activation of mouse primary pulmonary fibroblasts (PFs), and its effects on fibroblast activation protein (FAP) expression, cell proliferation, and collagen synthesis. **Methods** PFs were isolated from C57BL/6 mice and cultured. A *RUNX3* knockdown model was established using small interfering RNA (siRNA). Cells were assigned to the control group (Control), TGF- β_1 -treated group (TGF- β_1), negative control group (TGF- β_1 +siRNA-NC), and RUNX3-silenced group (TGF- β_1 +si-RUNX3). In addition, a RUNX3 overexpression rescue experiment was performed based on TGF- β_1 stimulation. Protein and mRNA levels of RUNX3, FAP, and type I collagen (COL1A1) were measured by Western blot and reverse transcription quantitative real-time PCR (RT-qPCR). Cell proliferation was assessed using CCK-8 and EdU assays. Co-expression of COL1A1 and FAP was examined by double immunofluorescence staining. **Results** Compared with the Control group, RUNX3, FAP, and COL1A1 expression levels were upregulated in PFs in the TGF- β_1 group ($P < 0.01$). The CCK-8 assay showed that the absorbance value was reduced in the RUNX3 knockdown group compared with the negative

异麦角甾苷对呼吸道合胞病毒复制过程的影响

刘威,孙志阳,曹新旺

(安徽医科大学生命科学院细胞生物学系,合肥 230032)

摘要 **目的** 探究异麦角甾苷对呼吸道合胞病毒(RSV)复制过程的影响及其作用机制。**方法** 用RSV感染HEp-2细胞(对照组),再用异麦角甾苷处理RSV感染的细胞(异麦角甾苷处理组)。利用实时荧光定量PCR(qPCR)技术,分析2组中RSV融合蛋白(F)基因和基质蛋白(M)基因mRNA水平的差异;运用病毒空斑实验测定2组病毒滴度,以评估异麦角甾苷对病毒复制的抑制作用;利用细胞转染和激光共聚焦成像实验测定形成的RSV包涵体数量,以评估异麦角甾苷在RSV复制必需的包涵体形成过程中的作用。选取18只7周龄BALB/c雌鼠,随机分为3组:未感染RSV的对照组($n=6$)、RSV感染组($n=6$)以及RSV感染后给予异麦角甾苷治疗组($n=6$)。感染后第5天处死小鼠,取肺组织进行病理学分析,以评估异麦角甾苷对RSV感染所致小鼠肺组织损伤的疗效。**结果** 与对照组相比,异麦角甾苷处理组RSV F基因($t=17.13, P<0.001$)和M基因($t=18.22, P<0.001$)mRNA水平降低,病毒滴度($t=15.32, P<0.001$)下降,RSV包涵体数量降低($t=16.12, P<0.001$)。在RSV感染小鼠实验中,与RSV感染组相比,异麦角甾苷处理组小鼠肺部组织中炎症因子IL-4($t=14.76, P<0.01$)与IL-6($t=21.13, P<0.001$)以及RSV F($t=19.52, P<0.001$)与M($t=18.76, P<0.001$)基因mRNA水平降低,由RSV感染引起的肺组织病理损伤减轻。**结论** 异麦角甾苷通过阻碍RSV包涵体的形成抑制RSV复制,减轻了RSV感染诱导的小鼠肺组织损伤。

关键词 异麦角甾苷;呼吸道合胞病毒;包涵体;F蛋白;M蛋白;炎症因子

中图分类号 R373.1

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2026)04-0612-06

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2026.04.004

呼吸道合胞病毒(respiratory syncytial virus, RSV)是全球范围内引起婴幼儿、老年人及免疫功能低下者下呼吸道感染的首要病原体,每年均导致重大的公共卫生负担和经济损失^[1]。尽管历经数十年

研究,可选择的RSV特异性治疗方案依然十分有限。利巴韦林等抗病毒药物因其疗效有限和潜在毒性而在临床应用受限,而价格高昂的帕利珠单抗等中和抗体无法用于治疗已发生的大面积感染^[2]。近年获批的小分子药物如瑞特沙韦,靶点单一,病毒仍有产生耐药性的潜在风险^[3]。从天然产物中探寻高效、低毒抗RSV药物,仍然是当前抗RSV研究领域的重要方向。

RSV在复制和转录过程高度依赖于病毒在感染细胞内形成的特殊结构——包涵体包涵体是病

2026-01-09 接收

基金项目:国家自然科学基金项目(编号:91854120);安徽省转化医学研究院科研基金项目(编号:2023zhyx-B16)

作者简介:刘威,男,硕士研究生;

曹新旺,男,博士,教授,博士生导师,通信作者,E-mail:

caoxw@ahmu.edu.cn

control group ($P<0.01$). Consistently, the EdU assay demonstrated a lower proportion of EdU-positive cells in the RUNX3 knockdown group than in the negative control group ($P<0.01$). Immunofluorescence double staining revealed decreased fluorescence intensities of COL1A1 and FAP in the RUNX3 knockdown group relative to the negative control. Under RUNX3 overexpression conditions, these fluorescence signals exhibited a partial rebound ($P<0.01$). **Conclusion** RUNX3 in TGF- β 1-induced PFs may promote cell proliferation and collagen synthesis by positively regulating FAP expression. Targeting the RUNX3/FAP axis may represent a potential therapeutic strategy for pulmonary fibrosis.

Key words RUNX3; primary pulmonary fibroblasts; fibroblast activation protein; proliferation; pulmonary fibrosis

Fund program Natural Science Research Project of Anhui Educational Committee (No. 2023AH040376)

Corresponding author Sha Jiming, E-mail: shajiming@vip.163.com