



安徽医科大学学报
Acta Universitatis Medicinalis Anhui
ISSN 1000-1492, CN 34-1065/R

《安徽医科大学学报》网络首发论文

题目: RUNX3 通过调控 FAP 对小鼠肺原代成纤维细胞增殖的影响
作者: 尤峻柏, 汪先晨, 凌辉, 范家好, 陈齐, 陶辉, 沙纪名
网络首发日期: 2026-02-11
引用格式: 尤峻柏, 汪先晨, 凌辉, 范家好, 陈齐, 陶辉, 沙纪名. RUNX3 通过调控 FAP 对小鼠肺原代成纤维细胞增殖的影响[J/OL]. 安徽医科大学学报. <https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20260211.1327.008>



网络首发: 在编辑部工作流程中, 稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定, 且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式(包括网络呈现版式)排版后的稿件, 可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定; 学术研究成果具有创新性、科学性和先进性, 符合编辑部对刊文的录用要求, 不存在学术不端行为及其他侵权行为; 稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准, 正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性, 录用定稿一经发布, 不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容, 只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

出版确认: 纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊(光盘版)》电子杂志社有限公司签约, 在《中国学术期刊(网络版)》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版, 以单篇或整期出版形式, 在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊(网络版)》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物(ISSN 2096-4188, CN 11-6037/Z), 所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

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激活蛋白 (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; 细胞迁移; 肺纤维化

中图分类号 R 332.2; R 322.3; R 563.9

文献标志码 A

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

(¹Dept of Thoracic Surgery, ²Dept of Anesthesiology and Perioperative Medicine, The Second

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

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 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.

Keywords 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

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 (extracellular matrix, ECM) 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, 成纤维细胞激活蛋白 (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: LLSC20231701)。

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) 购自武汉淼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 型胶原酶和培养基质按 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-β₁ (5 ng/mL) 刺激 24 h。在 TGF-β₁ 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 μl 的 RIPA+PMSF 裂解液，每孔加入 100 μl。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/kDa) 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 μL 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 °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。

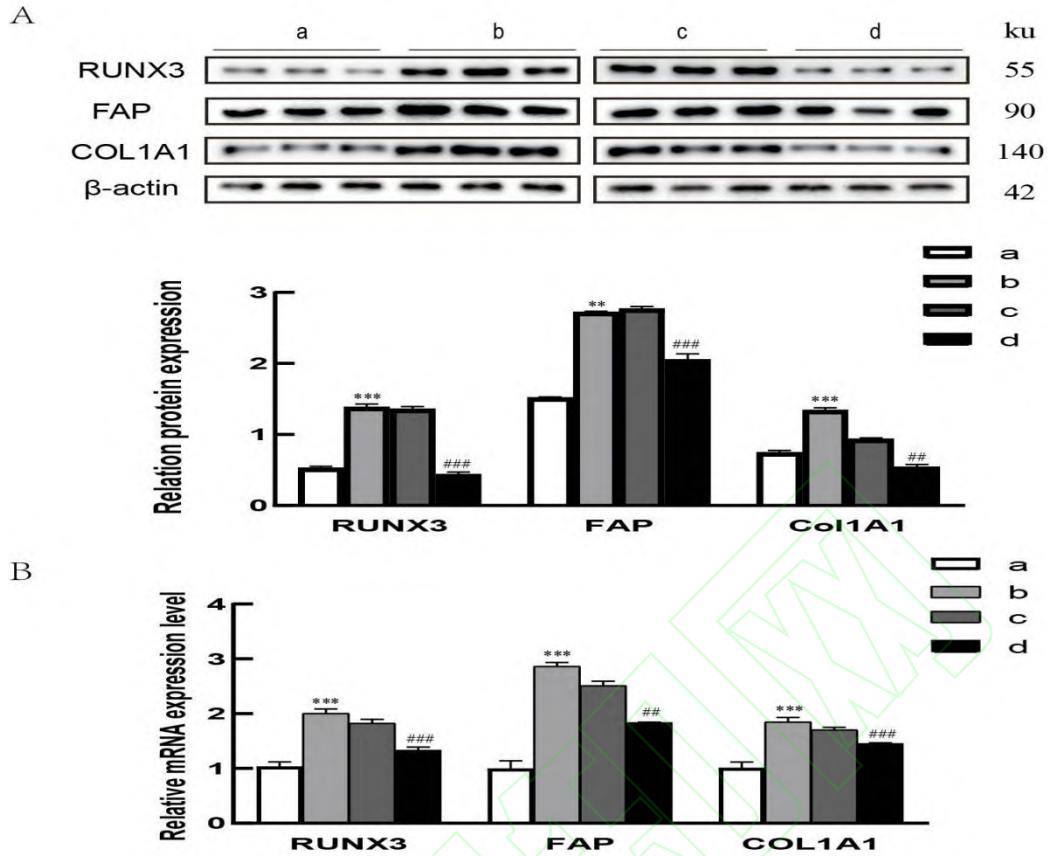


图 1 RUNX3 沉默对 TGF- β_1 诱导的 FAP 及 COL1A1 表达的影响

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 groups and corresponding quantification; 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 组的细胞在 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 对肺成纤维细胞的增殖作用。见图 2。

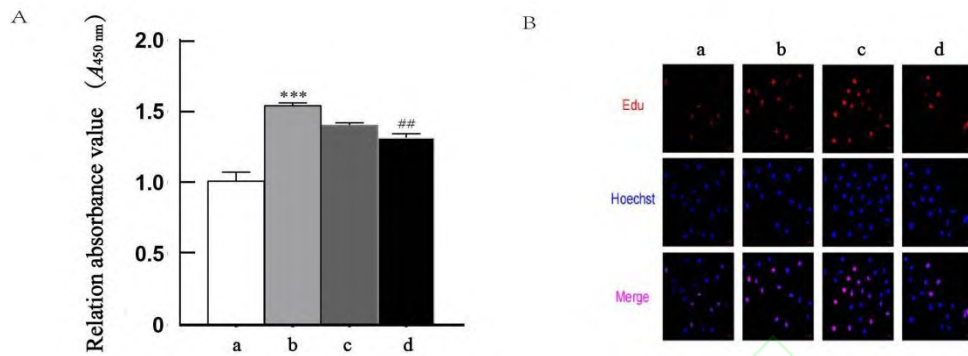


图 2 RUNX3 沉默抑制肺成纤维细胞的增殖能力

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 ($\times 200$); EdU (red) indicates S-phase proliferating cells; Hoechst (blue) marks nuclei; Merge (pink) denotes EdU-positive proliferating cells; a: Control group; b: TGF- β_1 group; c: TGF- β_1 +siRNA-NC group; d: TGF- β_1 +si-RUNX3 group; *** $P < 0.001$ vs Control group; ## $P < 0.01$ vs TGF- β_1 +siRNA-NC group.

2.3 RUNX3 沉默对 COL1A1 与 FAP 共表达水平的影响

免疫荧光双染色结果显示: Control 组 COL1A1 (红色) 与 FAP (绿色) 的荧光信号较弱, 经 TGF- β_1 刺激后, COL1A1 与 FAP 的荧光强度均增强 ($P < 0.01$); 然而, 在 RUNX3 沉默后, RUNX3 沉默组 COL1A1 与 FAP 的荧光强度均较 TGF- β_1 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。

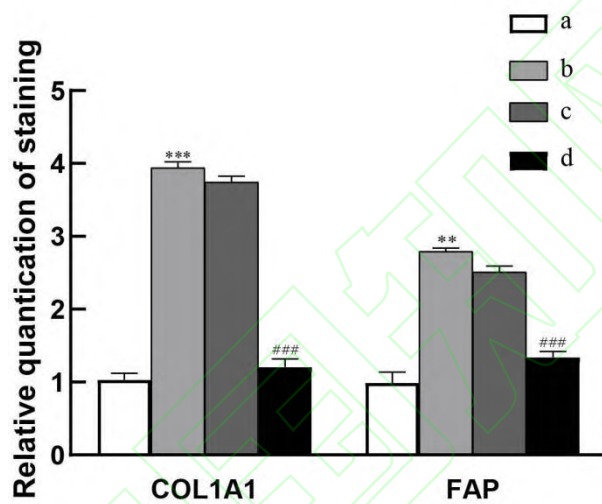
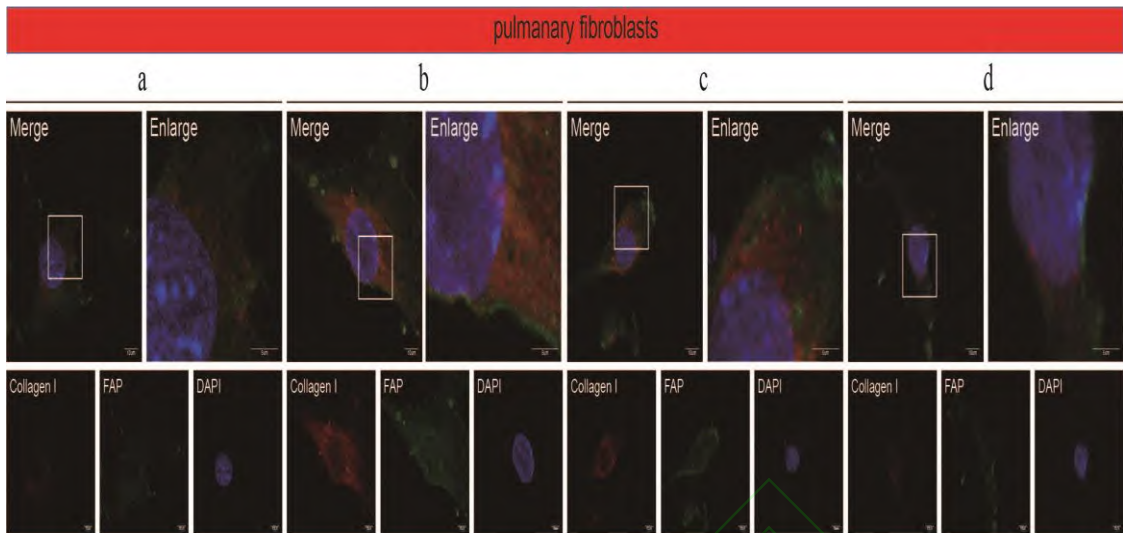


图3 免疫荧光双标染色 (A) 检测各组细胞中 COL1A1 (红色) 与 FAP (绿色) 的表达及其直方图统计结果 (B) ×200

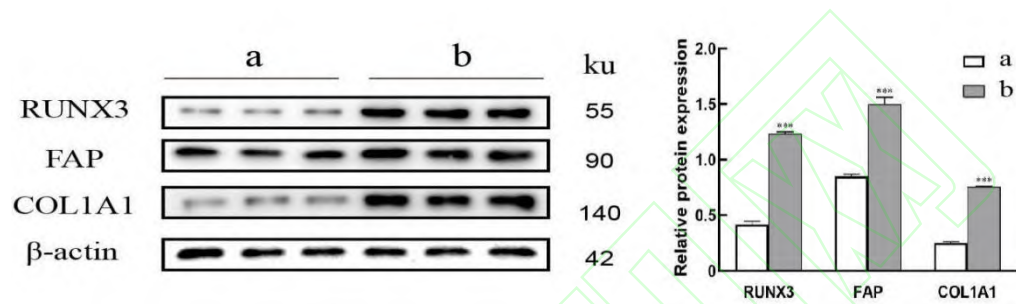
Fig.3 Immunofluorescence double staining (A) was performed to examine COL1A1 (red) and FAP (green) expression in each group, with histogram-based quantification shown in (B) ×200

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.

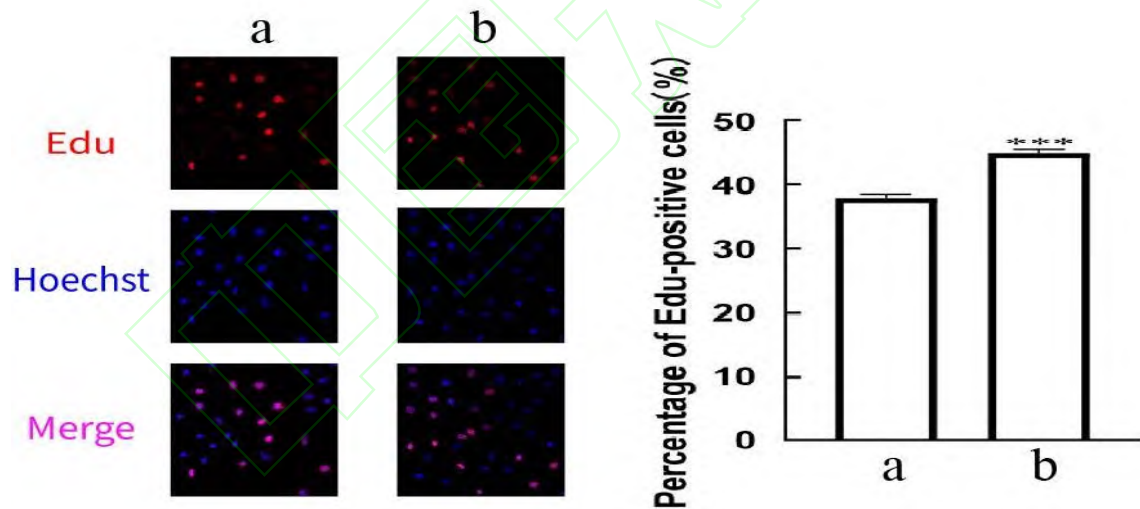
2.4 RUNX3 过表达回复实验及功能评估

功能回复实验结果所示,与 TGF- β_1 +pCMV 组比较,TGF- β_1 +pCMV-RUNX3 组中 RUNX3、FAP 及 COL1A1 的表达水平升高(均 $P < 0.001$)。同时,EdU 检测显示,与 TGF- β_1 +pCMV 组比较, TGF- β_1 +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- β_1 +pCMV 组比较, TGF- β_1 +pCMV-RUNX3 组中 COL1A1 与 FAP 的荧光信号增强。此回复实验从反面证实了 RUNX3 增加了 FAP 表达及促进了细胞的活化进而促进细胞的增殖。

A



B



C

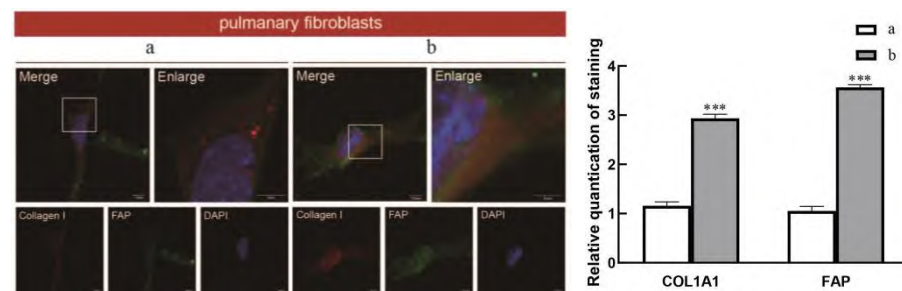


图 4 RUNX3 过表达回复实验验证其功能

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- β_1 stimulation; B: EdU staining assessing the impact of RUNX3 overexpression on cell proliferation $\times 200$; 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- β_1 +pCMV; b: TGF- β_1 +pCMV-RUNX3 group; *** $P < 0.001$ vs TGF- β_1 +pCMV group.

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- β_1 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，免疫荧光双标染色揭示，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- β_1 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- β_1 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.