

## • 研究论文 •

## 虫草素靶向HDAC7介导上皮细胞-间充质转化改善肺纤维化

王小叶<sup>1,2</sup>, 程明涵<sup>2</sup>, 盛光丽<sup>2</sup>, 吴悦<sup>2</sup>, 高建<sup>1,2\*</sup>

(1. 安徽中医药大学药学院, 安徽 合肥 230012; 2. 上海交通大学医学院附属上海儿童医学中心, 上海 200127)

**摘要:** 虫草素(cordycepin, Cpn)是来源于传统中药冬虫夏草的天然活性化合物,具有抗纤维化、抗氧化、抗炎作用,其对肺纤维化的作用和机制尚不明确。本研究以人肺上皮A549细胞为实验细胞系,采用转化生长因子 $\beta 1$ (transforming growth factor  $\beta 1$ , TGF- $\beta 1$ )诱导细胞模型,利用CCK-8法、划痕实验及Transwell实验检测虫草素对细胞活力、迁移能力及侵袭能力的影响,通过分子对接和分子动力学模拟对组蛋白去乙酰化酶7(histone deacetylase 7, HDAC7)与波形蛋白(vimentin)的相互作用及虫草素与HDAC7的关联进行预测。采用博来霉素(bleomycin, BLM)构建小鼠肺纤维化模型,考察虫草素对小鼠肺组织病理变化的作用效果。利用免疫印迹法(Western blot)、细胞转染实验、免疫共沉淀实验、免疫荧光实验、免疫组化及实时荧光定量PCR(real-time quantitative PCR, RT-qPCR)实验等研究其对肺纤维化的作用及其分子机制。动物福利和实验过程均遵循上海儿童医学中心实验动物伦理委员会的规定(批准号:SCMC-LAWEC-2022-017)。实验结果显示,虫草素在 $100\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度内对细胞无毒,可抑制A549细胞的迁移及侵袭;虫草素可显著减少胶原沉积,降低小鼠肺组织炎症和纤维化程度。在体内外模型中,虫草素显著逆转上皮细胞-间充质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)及肺纤维化标志物I型胶原 $\alpha 1$ (collagen type I  $\alpha 1$  chain, collagen I)、 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -smooth muscle actin,  $\alpha$ -SMA)、N-钙黏蛋白(N-cadherin)、vimentin及E-钙黏蛋白(E-cadherin)及HDAC7的mRNA和蛋白表达;HDAC7敲低可抑制EMT及collagen I的表达,且虫草素可靶向HDAC7抑制EMT及collagen I的表达;vimentin与HDAC7存在相互作用,且分子对接实验发现虫草素与HDAC7存在相互关联。综上所述,虫草素可靶向HDAC7抑制EMT发挥抗肺纤维化作用,为开发抗肺纤维化药物提供新的思路与选择。

**关键词:** 虫草素; 肺纤维化; 组蛋白去乙酰化酶7; A549细胞; 上皮细胞-间充质转化

中图分类号: R966

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870(2024)06-1627-12

## Cordycepin targets HDAC7 to mediate epithelial-mesenchymal transition to ameliorate pulmonary fibrosis

WANG Xiao-ye<sup>1,2</sup>, CHENG Ming-han<sup>2</sup>, SHENG Guang-li<sup>2</sup>, WU Yue<sup>2</sup>, GAO Jian<sup>1,2\*</sup>

(1. School of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012, China; 2. Shanghai Children's Medical Center Affiliated to Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200127, China)

**Abstract:** Cordycepin (Cpn), a natural active compound derived from the traditional Chinese medicine *Cordyceps sinensis*, has antifibrotic, antioxidant, and anti-inflammatory effects, but the impact of Cpn on pulmonary fibrosis and the downstream molecular mechanism remain unclear. In this study, A549 cells were induced by transforming growth factor  $\beta 1$  (TGF $\beta 1$ ) *in vitro*, the viability of A549 cells was evaluated by CCK-8 assay; and migration of A549 cells were detected by wound healing assay, invasion of A549 cells were detected by transwell assay. Molecular docking and molecular dynamics simulations were used to predict the interaction of histone deacetylase 7 (HDAC7) with vimentin and the association of Cpn with HDAC7. The pulmonary fibrosis

收稿日期: 2024-01-21; 修回日期: 2024-04-17.

\*通讯作者 Tel: 18918320295, E-mail: gaojianayfy@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2024-0064

model of mice was established by bleomycin *in vivo* to investigate the effect of Cpn on pathological changes of lung tissue. The impact of Cpn and molecular mechanism on pulmonary fibrosis were studied by Western blot assay, cell transfection assay, immunoprecipitation assay, immunofluorescence assay, immunohistochemistry and real-time quantitative PCR (RT-qPCR). All animal experiments were approved by the Shanghai Children's Medical Center Experimental Animal Ethics Committee (grant No. SCMC-LAWEC-2022-017). Results showed that Cpn had no toxic effect on A549 cells even at the concentration of  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ . Cpn inhibited migration and invasion of A549 cells and reduced deposition of collagen, the degree of lung inflammation and fibrosis in mice; *in vivo* and *in vitro* models, Cpn significantly reversed mRNA and protein expressions of epithelial-mesenchymal transition (EMT) and lung fibrosis markers collagen I,  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA), N-cadherin, vimentin and E-cadherin and HDAC7. Deficiency of HDAC7 suppressed TGF $\beta$ 1-induced EMT and expression of collagen I; vimentin interacted with HDAC7; and molecular docking experiment revealed that Cpn was interrelated with HDAC7. In conclusion, Cpn can target HDAC7 to mediate EMT and exert its anti-fibrotic effect, the inhibition of EMT and the improvement of pulmonary fibrosis provide a new idea and choice for the development of anti-pulmonary fibrosis drug.

**Key words:** cordycepin; pulmonary fibrosis; histone deacetylase 7; A549 cell; epithelial-mesenchymal transition

肺纤维化 (pulmonary fibrosis, PF) 是一种致命的、不可逆的呼吸系统疾病,其特征包括气道重塑、炎症、肺泡破坏和纤维化<sup>[1]</sup>,同时,也是新型冠状病毒肺炎重症患者的后遗症<sup>[2]</sup>。目前,常用治疗措施包括药物治疗、姑息疗法、肺康复、肺移植等仍无法治愈<sup>[3]</sup>。因此,急需寻找新的有效治疗方法与药物。

肺纤维化是肺内弥漫性细胞外基质 (extra cellular matrix, ECM) 的生成与降解平衡失调,过量细胞外基质沉积引起炎症与肺重塑,改变肺部正常生理结构导致肺功能的受损。上皮细胞-间充质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 在肺纤维化形成中起着重要的作用,大约 1/3 的肺成纤维细胞被鉴定为上皮来源。它导致成纤维细胞和肌成纤维细胞的积累及大量的细胞外基质生成,进而导致肺纤维化<sup>[4]</sup>。肺纤维化过程中有肺上皮细胞等多种细胞参与,上皮细胞-间充质转化过程中的主要效应细胞通常被认为是肺上皮细胞。活化的肺上皮细胞增殖和迁移能力增强,细胞的上皮表型丧失和间充质表型增加,即参与细胞接触的蛋白质 (E-钙黏蛋白的丢失和 N-钙黏蛋白的获得)、细胞骨架蛋白 (细胞角蛋白的丢失和波形蛋白、 $\alpha$ 平滑肌肌动蛋白、结蛋白和纤连蛋白的获得) 生成大量以 I 型胶原 (collagen type I  $\alpha$ 1, collagen I) 为主的细胞外基质与降解正常细胞外基质的金属蛋白酶 2 (matrix metalloproteinase 2, MMP2) 等,最终导致细胞外基质过度沉积于肺部诱发肺纤维化<sup>[5]</sup>。因此,抑制 EMT,减少细胞外基质的沉积,是肺纤维化治疗研究的重中之重。最近的研究表明, vimentin 作为 EMT 主要标记物,在治疗肺纤维化中发挥重要作用<sup>[6]</sup>,可被乙酰化而降解, vimentin 降解可抑制 EMT<sup>[7]</sup>。据报道,组蛋白去乙

酰化酶 9 (histone deacetylase 9, HDAC9) 激活增强 vimentin 的表达导致 EMT,进而诱发疾病<sup>[8]</sup>。HDAC9 与组蛋白去乙酰化酶 7 (histone deacetylase 7, HDAC7) 是组蛋白去乙酰化酶 (histone deacetylase, HDAC) IIa 类,具有去乙酰化作用,尽管研究报道靶向 HDAC 的抑制剂可改善肺纤维化,然而药物特异性差导致药效存在一定的局限性<sup>[9]</sup>,因此提高靶向 HDAC 抑制剂的选择性,对改善肺纤维化有重要意义。研究报道,HDAC7 参与 EMT 的调节<sup>[10]</sup>,在肺纤维化患者的组织中高表达,HDAC7 作为一种去乙酰化酶,参与细胞增殖、血管生成和迁移<sup>[11]</sup>,可激活转录因子 (AP-1) 介导内皮素-1 诱导的人肺成纤维细胞结缔组织生长因子的表达,在气道纤维化的发病机制中发挥关键作用<sup>[12]</sup>。研究发现 HDAC7 通过脱乙酰化参与疾病调控作用,可直接结合并脱乙酰化信号转导子和转录激活子 3 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3),从而调节下游基因的表达<sup>[13]</sup>,HDAC7 过表达抑制  $\beta$ -连环蛋白 ( $\beta$ -catenin) 的乙酰化和磷酸化,从而诱发疾病<sup>[14]</sup>。因此,调节肺组织纤维化部位的 HDAC7 的表达发挥其脱乙酰化有助于抑制 EMT,促进肺纤维化疾病转归。

中医药使用已有千年历史,众多来源于中医药的天然产物具有明确的抗肺纤维化功能。但是天然产物的作用靶点不明确是限制其成药的关键因素之一。探究其抗肺纤维化作用,并在此基础上筛选天然产物的作用靶点,有助于提升药效并规避毒副作用,从而充分利用现有中草药资源开发出有效缓解肺纤维化的药物。冬虫夏草 (*Cordyceps sinensis*, CS) 作为药用效果明确的传统补虚中草药之一,据报道它是有效的抗肺纤维化中药,能改善肺功能,减轻呼吸困难<sup>[15]</sup>,但何种

活性成分发挥抗肺纤维化作用需进一步研究。虫草素是冬虫夏草重要的活性成分之一, 又称为3'-脱氧腺苷, 是腺苷的天然衍生物, 具有多种药理活性, 包括抑制肿瘤、调节免疫和抑制炎症<sup>[16]</sup>。研究报道, 虫草素通过激活核因子-红细胞2相关因子2 (nuclear factor-erythroid 2 related factor 2, Nrf2)/血红素加氧酶-1 (heme oxygenase-1, HO-1) 通路改善脂多糖诱导的急性肺损伤<sup>[17]</sup>, 已证实激活腺苷酸活化蛋白激酶 (AMP-activated protein kinase, AMPK) 信号通路发挥抗纤维化功能<sup>[18]</sup>, 且作用于 Nrf2 和 AMPK 通路抑制细胞衰老<sup>[19]</sup>, 作为 AMPK 信号通路抑制剂抑制肺癌进程<sup>[20]</sup>。但关于虫草素改善肺纤维化的药效及机制研究还非常少, 本研究从肺纤维化和上皮间质转化两个角度共同考察虫草素的活性与机制, 争取为未来肺纤维化治疗领域提供更多的候选药物。

## 材料与方法

**主要药物与试剂** 注射用博来霉素 (bleomycin, BLM, 批号 22037911), 瀚辉制药有限公司; 虫草素 (SC8470), 索莱宝生物科技有限公司; 4%多聚甲醛固定液 (P0099)、RIPA 裂解液 (P0013B), 碧云天生物技术有限公司; AProtein A/G Magnetic Beads (PB101-01), 南京诺唯赞生物科技有限公司; 吡非尼酮 (pirfenidone, PFD) (批号 20230328), 北京康蒂尼药业有限公司; Human TGF- $\beta$ 1 (AF-100-21C-10), 美国 PeproTech 公司; 一抗  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白 ( $\alpha$ -smooth muscle actin,  $\alpha$ -SMA) (5694)、N-cadherin (76011)、collagen I (255809-10)、兔来源 vimentin (92547)、兔来源 HDAC7 (166911), 英国 Abcam 公司; 鼠来源 vimentin (6260, 用于免疫共沉淀)、鼠来源 HDAC7 (74563, 用于免疫荧光与免疫共沉淀), 美国 Santa Cruz 公司; mouse IgG (B900620), 武汉三鹰生物技术有限公司; HDAC7 敲低质粒 (sh-HDAC7), 上海吉凯基因科技有限公司。

**实验仪器** 蛋白成像系统 (上海天能科技有限公司, Tanon4600); 高速冷冻型微量离心机 (德国艾本德公司, 5427 R); 激光共聚焦显微镜 (美国 Lecia 公司, SP8); 酶标仪 (瑞士 Tecan 公司, Infinite® 200 Pro)。

**细胞培养** 人肺上皮 A549 细胞系 (来源于维亚生物技术有限公司) 置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中, 用 Ham's F-12K 培养基 (含 10% 胎牛血清、1% 双抗) 培养。取对数生长期的 A549 细胞, 显微镜下观察细胞密度约 90% 时按照 1:3 的比例进行传代培养。

**细胞活力与药物毒性测定** 将细胞收集后使用细胞计数板进行计数, 将调整好浓度的细胞悬液均匀铺在 96 孔板中, 放入 37 °C 培养箱培养 24 h。用含 10%

血清与含 TGF- $\beta$ 1 (5 ng·mL<sup>-1</sup>) 低血清培养基稀释虫草素, 分别加入 96 孔板中继续培养 24 h。用磷酸盐缓冲液洗 2 遍, 随后按照每孔 1:10 的比例加入 CCK-8 溶液, 并在 37 °C 下孵育 1 h。去除 CCK-8 溶液, 置于 4 °C 冰箱终止反应, 用酶标仪检测波长 450 nm 处的吸光度值, 计算各组药物细胞活力并分析。

**划痕实验检测细胞迁移能力** 将细胞接种于 6 孔板, 显微镜下观察细胞融合约 90% 时, 用 200  $\mu$ L 的枪头垂直于 6 孔板的板底划痕。用磷酸盐缓冲液将细胞漂洗 3 次, 加入 2 mL 含 0.75% 胎牛血清的培养基于显微镜下拍照, 再给予梯度浓度虫草素 (50、100  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup>) 处理细胞 2 h 后加入 TGF- $\beta$ 1 (5 ng·mL<sup>-1</sup>) 诱导, 培养 48 h 后显微镜下观察 A549 细胞迁移情况并拍照记录。

**Transwell 实验检测细胞侵袭能力** 将细胞用无血清 Ham's F-12K 培养基饥饿 24 h, Matrigel 基质胶用无血清 Ham's F-12K 培养基以 1:8 比例稀释, 均匀铺于 transwell 小室, 放入 37 °C 孵箱, 随后以无血清的培养基调整细胞密度, 每小室加入 100  $\mu$ L 细胞悬液并给予梯度浓度虫草素 (50、100  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup>) 处理及 TGF- $\beta$ 1 (5 ng·mL<sup>-1</sup>) 诱导, 含 10% 的胎牛血清培养基加入 600  $\mu$ L 于下室, 在细胞培养箱中孵育 24 h 取出, 磷酸盐缓冲液漂洗 2 次后 4% 多聚甲醛固定、0.1% 结晶紫染色液染色, 棉签轻轻擦去上室内细胞, 于倒置显微镜下观察并拍照。

**Western blot** 收集药物处理 48 h 后的细胞, 每孔加入含 1% PMSF RIPA 裂解液 80  $\mu$ L, 置冰上裂解 35 min, 4 °C 条件下 13 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 15 min 后取上清, 用紫外分光光度法测定蛋白浓度。每组取 35  $\mu$ g 总蛋白, 10% SDS-PAGE 分离蛋白样品, 将分离得到的蛋白样品转移至 PVDF 膜, 用 5% 脱脂牛奶封闭 60 min, 洗膜后加入一抗 (collagen I、 $\alpha$ -SMA、N-cadherin、vimentin、E-cadherin、HDAC7), 4 °C 孵育过夜, 膜洗 3 遍后二抗孵育 1 h, 洗膜后显影并采用 Image J 分析灰度值。

**分子对接实验** 将 HDAC7 与 vimentin 进行分子对接, 虫草素与 HDAC7 蛋白的活性位点进行分子对接。从 PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 中下载虫草素核心成分的 sdf 文件 (3D 结构)。在 PDB 数据库 (<https://www.rcsb.org/>) 中获取以上靶点的人源 pdb 文件 (3D 结构), 用 PyMOL 对受体的 pdb 文件进行预处理以去除水分子和其他原子, 并将预处理后的文件通过 Auto Dock Tools 软件进行加氢、加电荷、补充缺失的残基等操作, 保存为 pdbqt 格式的文件。随后将 HDAC7 与 vimentin 进行分子对接, 虫草素与 HDAC7 蛋白的活性位点进行分子对接。分子对接后, 结果用 Pymol2.2.0 进行可视化处理。

**shRNA 转染** HDAC7 特异性敲低 shRNA 序列为: shRNAHDAC7 5'-GCCAGCAAGATCCTCATTGTA-3', 3'-TACAATGAGGATCTTGCTGGC-5'。转染步骤如下: 细胞接种于 6 孔板, 当细胞密度达到 45%, 更换新培养基。将细胞分成 5 组: 阴性对照组 (sh-NC)、阳性对照组 (sh-NC+TGF- $\beta$ 1)、HDAC7 敲低组 (sh-HDAC7)、HDAC7 敲低+TGF- $\beta$ 1 处理组 (sh-HDAC7+TGF- $\beta$ 1)、HDAC7 敲低给药组 (sh-HDAC7+TGF- $\beta$ 1+Cpn 100  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )。取 6  $\mu\text{L}$  转染试剂与 300  $\mu\text{L}$  Opti-MEM 无血清培养基混匀, 静置 5 min; 取 6  $\mu\text{L}$  sh-HDAC7 与 sh-NC 质粒分别与 150  $\mu\text{L}$  Opti-MEM 无血清培养基混匀并静置 5 min; 随后取上述含转染试剂溶液与含质粒的溶液按照 1:1 混合, 振荡混匀 20 s 后离心, 静置 30 min 形成复合物。以 100  $\mu\text{L}$  体积加入相应的孔中。8 h 后将 Opti-MEM 无血清培养基换成含 10% 胎牛血清的 Ham's F-12K 培养基培养 48 h, 分别加入对应药物进行处理, 收集细胞蛋白进行 Western blot 检测。

**免疫共沉淀实验** 将调整好浓度的细胞悬液均匀接种于大皿中, 待细胞贴壁后饥饿 24 h, 随后加入 8 mL 含 TGF- $\beta$ 1 低血清培养基, 48 h 后收集细胞的蛋白。将收集的蛋白分别与 vimentin、IgG、HDAC7 一抗置于 37  $^{\circ}\text{C}$  摇床孵育 3.5 h。随后加入 40  $\mu\text{L}$  磁珠, 继续 37  $^{\circ}\text{C}$  摇床孵育 2 h。收集抗体磁珠, 加入 20  $\mu\text{L}$  载样液到所收集的磁珠中, 置于 99  $^{\circ}\text{C}$  恒温金属浴变性洗脱 10 min, 然后离心 10 s, 用磁力架吸附磁珠, 收集上清液放 -80  $^{\circ}\text{C}$  冰箱保存。Western blot 对样本进行检测。

**免疫荧光实验** 细胞接种于共聚焦皿中, 隔天换成无血清 Ham's F-12K 培养基饥饿 24 h, 再给予梯度浓度虫草素 (50、100  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 处理细胞 2 h 后加入 TGF- $\beta$ 1 (5  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) 诱导, 48 h 后收集细胞。细胞用 4% 多聚甲醛固定 30 min, 磷酸盐缓冲液洗涤后用 2% Triton X-100 透化打孔 30 min, 5% BSA 室温封闭 30 min, 然后将细胞与 vimentin 及 HDAC7 一抗在 4  $^{\circ}\text{C}$  下孵育过夜, 随后与荧光二抗室温避光孵育 1 h, DAPI 孵育细胞 10 min, 用 TBST 洗 3 次, 使用激光共聚焦显微镜观察并拍摄图像。

**荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR)** 收集药物处理 48 h 后的细胞, 用 Trizol 提取细胞总 RNA, 提取总 RNA 后通过紫外分光光度计测定 RNA 浓度和纯度, 将 A260/280 值在 1.8~2.9 范围内的 RNA 样品逆转录为 cDNA, 保存于 -80  $^{\circ}\text{C}$  冰箱。以逆转录得到的 cDNA 稀释 10 倍为模板, 进行实时荧光定量 PCR 检测, 每组 3 个复孔, 定量结果以 GAPDH 为内参, 采用  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  法计算目标基因的相对表达量。检测指标为 collagen I、 $\alpha$ -SMA、vimentin、E-cadherin、N-cadherin、HDAC7, 引物序列见表 1。

**实验动物** SPF 级 C57BL/6J 小鼠, 雄性, 6~8 周龄, 购于上海吉辉实验动物饲养有限公司, 动物许可证号: SCXK (沪) 2022-0009, 实验动物质量合格证编号: 20220009014150, 饲养条件: SPF 级屏障环境动物房, 温度: 22~25  $^{\circ}\text{C}$ , 相对湿度: 50%~60%, 光照: 12 h/12 h 光暗交替。方案经上海儿童医学中心动物伦理委员会批准 (批准号: SCMC-LAWEC-2022-017), 本课题中动物实验严格按照《中华人民共和国动物伦理指南》操作。

**肺纤维化小鼠模型构建及分组给药** 小鼠适应性饲养 7 天后, 采用博来霉素诱导小鼠肺纤维化模型。将小鼠随机分为 6 组, 每组 8 只, 分别为生理盐水对照组、BLM 模型组、虫草素组 (6  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )、虫草素组 (12  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )、虫草素组 (24  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) 及 PFD 组 (100  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )。小鼠以 1% 戊巴比妥钠腹腔麻醉后, 用微量进样针沿着气管软骨插入, 气管内滴注博来霉素灭菌溶液大约 50  $\mu\text{L}$ , 立即拔出针头, 保持小鼠直立体位旋转 5~30 s, 使药物均匀到达两侧肺部, 对照组仅滴注相同体积的生理盐水。造模成功后的第二天灌胃给药, 虫草素的给药剂量及给药方法参考 Hulpia 等<sup>[21]</sup>的研究。对照组和模型组给予等体积生理盐水灌胃, 虫草素组给予不同剂量灌胃, PFD 组以 100  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  剂量灌胃, 持续 21 天。

**样本收集** 在造模后的第 21 天, 小鼠腹腔麻醉, 剖腹心尖取血后处死并迅速分离双肺, 取左肺用 4% 多聚甲醛固定, 以备组织病理学及免疫组化检测, 取右肺 -80  $^{\circ}\text{C}$  冰箱冻存。

**小鼠肺组织病理学检测** 取 4% 多聚甲醛固定左

**Table 1** The primers used for RT-qPCR analyses. Collagen I: Collagen type I  $\alpha$ 1 chain;  $\alpha$ -SMA:  $\alpha$ -Smooth muscle actin; HDAC7: Histone deacetylase 7

Species	Gene	Forward primer	Reverse primer
Human	Collagen I	GCGAGAGCATGACCGATGGATTC	GCCTTCTTGAGGTTGCCAGTCTG
	$\alpha$ -SMA	CTCTGGACGCACAACCTGGCATC	CACGCTCAGCAGTAGTAACGAAGG
	Vimentin	CCTTCGTGAATACCAAGACCTGCTC	AATCCTGCTCTCCTCGCCTTCC
	E-cadherin	CGAGAGCTACACGTTTCACGG	GGGTGTCGAGGAAAAATAGG
	N-cadherin	AGCCAACCTTAAGTGGAGGAGT	GGCAAGTTGATTGGAGGGGATG
	HDAC7	GAAAGAACAGTCCATCCCAACA	GCTTATAGCGCAGCTTCAGG
	GAPDH	TTCAACGGCACAGTCAAG	TACTCAGCACCAGCATCA

肺进行石蜡包埋,切片进行常规H&E及Masson染色,显微镜镜检,图像采集分析。

**免疫组化实验** 石蜡切片脱蜡和水化,经抗原修复及阻断内源性过氧化氢酶后分别滴加一抗vimentin、 $\alpha$ -SMA、HDAC7,反应增强液、二抗后AEC显色,随后复染,脱水、透明、封片,最后显微镜下观察并采集图像。

**Western blot检测肺组织的蛋白表达** 取30 mg肺组织加入含1% PMSF、5%蛋白磷酸酶抑制剂混合物的RIRA裂解液,在低温组织研磨仪研磨后放置冰上裂解30 min,4 °C条件下12 000 r·min<sup>-1</sup>离心15 min,取上清液并用紫外分光光度法测定蛋白浓度。随后Western blot检测肺组织中collagen I、 $\alpha$ -SMA、N-cadherin、vimentin、E-cadherin、HDAC7的蛋白表达情况,采用Image J软件分析条带的光密度值。

**统计学分析** 本实验中符合正态分布的计量数据使用平均值 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。数据采用one-way ANOVA进行统计分析,并使用GraphPad Prism 9进行绘图。 $P < 0.05$ 时判定具有统计学意义。

## 结果

### 1 虫草素对A549细胞活力、细胞迁移能力及侵袭能力的影响

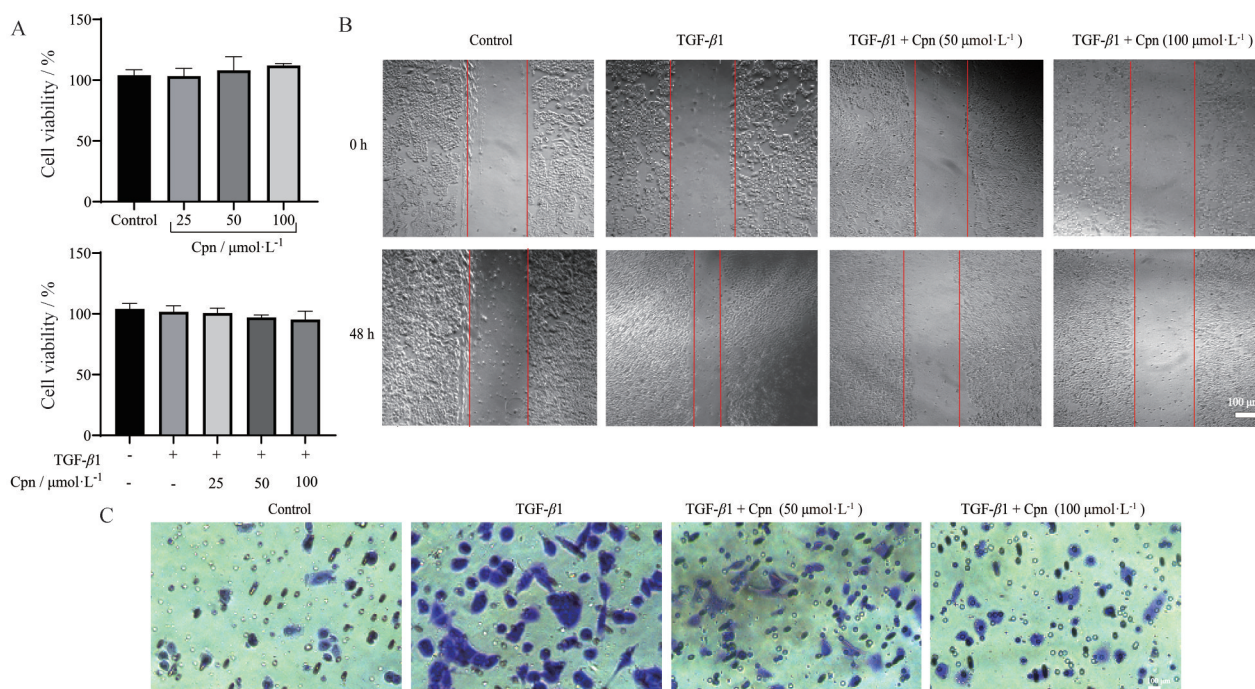
为了考察虫草素对A549细胞潜在的毒性,通过

CCK-8法检测不同浓度虫草素对细胞活力影响。结果显示(图1A),以100  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度内的虫草素处理A549细胞24 h,细胞活力没有下降;即使在TGF- $\beta$ 1 (5 ng·mL<sup>-1</sup>)存在的情况下,细胞活力也没有下降。结果表明,100  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度内的虫草素对细胞不产生毒性。

在上皮细胞-间充质转化的过程中,上皮细胞附着到细胞外基质使细胞的迁移能力增强。本研究采用划痕实验检测50、100  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的虫草素对TGF- $\beta$ 1诱导的A549细胞迁移能力及侵袭能力的影响。结果显示(图1B),在细胞处理48 h后,与对照组比较,TGF- $\beta$ 1显著增强了A549细胞的迁移能力,虫草素显著抑制TGF- $\beta$ 1诱导的A549细胞迁移能力。采用Transwell法检测A549细胞侵袭能力,结果显示(图1C),与对照组比较,TGF- $\beta$ 1组侵袭到基底膜下的细胞数明显增多,TGF- $\beta$ 1显著增强了A549细胞的侵袭能力;与TGF- $\beta$ 1组比较,虫草素干预组侵袭到基底膜下的细胞数量减少,侵袭能力显著下降。表明虫草素可抑制TGF- $\beta$ 1诱导的A549细胞的侵袭能力。

### 2 虫草素抑制TGF- $\beta$ 1诱导的EMT及collagen I的表达

EMT可导致成纤维细胞和肌成纤维细胞的积累及过量的细胞外基质沉积,是肺纤维化形成的主要诱



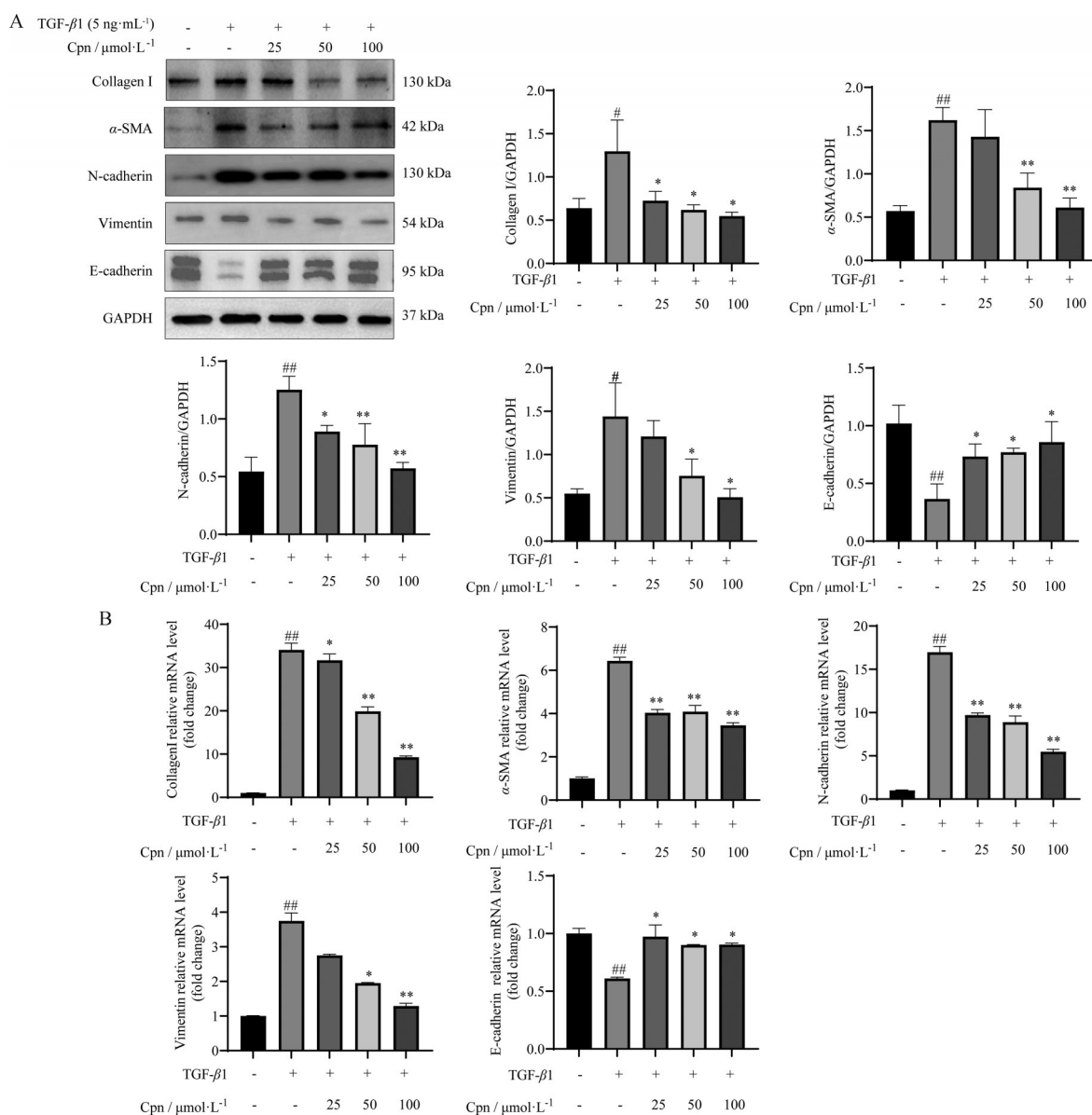
**Figure 1** Cpn caused neglectable cytotoxicity and inhibited migration on A549 cells. A: The cell viability of A549 cells treated with Cpn (0, 25, 50, 100  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) for 24 h was determined by CCK-8 assay with or without TGF- $\beta$ 1 ( $n = 3$ ,  $\bar{x} \pm s$ ); B: The cell of horizontal migration was detected by wound healing assays at 48 h. Scale bar: 100  $\mu\text{m}$ ; C: The cell of spatial migration was detected by Transwell assays at 48 h. Scale bar: 100  $\mu\text{m}$ . TGF- $\beta$ 1: Transforming growth factor  $\beta$ 1; Cpn: Cordycepin

因<sup>[4]</sup>, 相关标志物为 collagen I、 $\alpha$ -SMA、N-cadherin、vimentin、E-cadherin。在体外模型中, 使用浓度为 25、50、100  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  虫草素作用于 TGF- $\beta$ 1 诱导的 A549 细胞 48 h。结果显示 (图 2A), 虫草素均能明显逆转 TGF- $\beta$ 1 诱导 A549 细胞的 collagen I、 $\alpha$ -SMA、N-cadherin、vimentin、E-cadherin 蛋白表达水平。Quantitative real-time PCR 结果显示 (图 2B), 与对照组比较, TGF- $\beta$ 1 组细胞的 collagen I、 $\alpha$ -SMA、N-cadherin、vimentin、HDAC7 mRNA 水平显著升高, E-cadherin 的 mRNA 水平降低; 与 TGF- $\beta$ 1 组比较, 由 TGF- $\beta$ 1 激活的 collagen I、 $\alpha$ -SMA、N-cadherin、vimentin、HDAC7 的

mRNA 水平均明显被虫草素抑制, E-cadherin 的 mRNA 水平明显被虫草素激活。表明虫草素具有逆转 TGF- $\beta$ 1 诱导 A549 细胞的 EMT 与抑制 collagen I 表达的作用。

### 3 HDAC7 和 vimentin 相互作用抑制 EMT 及 collagen I 的表达

EMT 作为肺纤维化重要机制, HDAC7 参与 EMT 调控<sup>[10]</sup>。为了检测 HDAC7 对 EMT 的影响及虫草素对 HDAC7 靶向作用, 通过转染的实验方法敲低细胞中 HDAC7 的基因表达, 进行细胞刺激和虫草素干预, 评估 HDAC7 与 EMT 之间的关联及虫草素对 HDAC7 靶

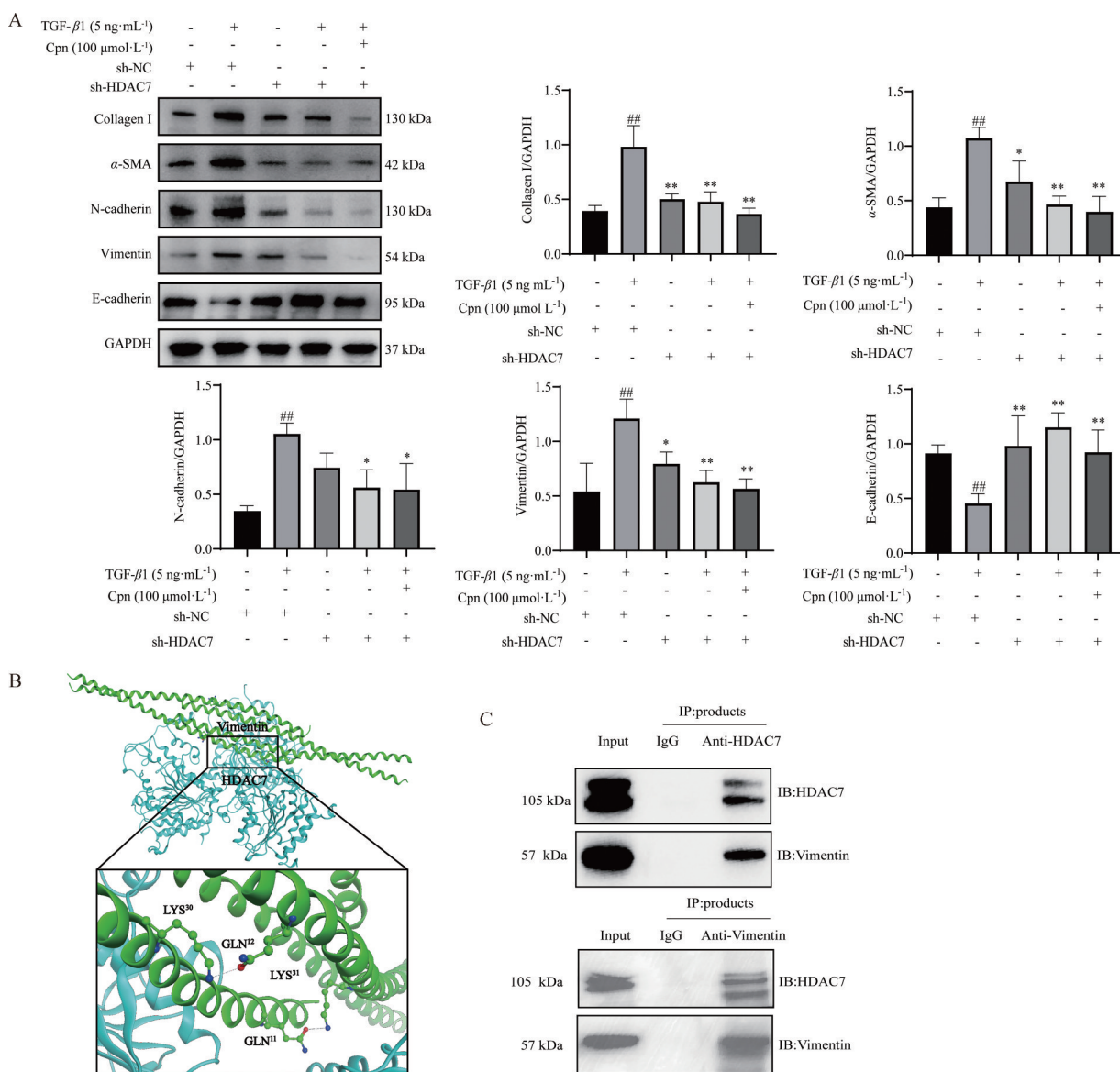


**Figure 2** Cpn repressed TGF- $\beta$ 1-stimulated EMT and expressions of collagen I. A: Levels of collagen I,  $\alpha$ -SMA, N-cadherin, vimentin, E-cadherin in TGF- $\beta$ 1-stimulated A549 cells treated with Cpn for 48 h were analyzed by Western blot; B: Expressions of collagen I,  $\alpha$ -SMA, N-cadherin, E-cadherin, vimentin mRNA levels in A549 cells were analyzed by quantitative real-time PCR.  $n = 3$ ,  $\bar{x} \pm s$ . # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$  vs control group; \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs TGF- $\beta$ 1 group. EMT: Epithelial-mesenchymal transition

向作用。结果所示(图3A),与sh-NC对照组相比较,TGF- $\beta$ 1诱导sh-NC处理组collagen I、 $\alpha$ -SMA、N-cadherin、vimentin蛋白表达水平升高;E-cadherin蛋白表达水平降低。与TGF- $\beta$ 1诱导sh-NC处理后相比较,HDAC7敲低组(sh-HDAC7)、HDAC7敲低+TGF- $\beta$ 1处理组(sh-HDAC7+TGF- $\beta$ 1)及HDAC7敲低给药组(sh-HDAC7+TGF- $\beta$ 1+Cpn100  $\mu$ mol·L)组的collagen I、 $\alpha$ -SMA、N-cadherin、vimentin蛋白表达水平降低,E-cadherin蛋白表达水平升高。因此,HDAC7敲低抑制EMT及collagen I的表达;虫草素可靶向调控HDAC7抑制EMT与collagen I的表达。

Vimentin可被乙酰化降解<sup>[7]</sup>,HDAC7具有去乙酰

化作用,抑制HDAC7的活性可促进乙酰化的反应。Vimentin的表达水平密切调控EMT从而影响肺纤维化的形成,证明了HDAC7在上皮细胞-间充质转化过程中的作用后,更深一步进行机制研究。通过分子对接实验预测了HDAC7和vimentin之间的作用,结果表明HDAC7和vimentin之间可能存在相互作用(图3B);进一步通过Co-IP实验确定HDAC7和vimentin之间的相互作用(图3C),用HDAC7抗体进行免疫共沉淀反应,通过Western blot能够检测到vimentin条带的信号;用vimentin抗体进行免疫共沉淀反应,通过Western blot能够检测到HDAC7条带的信号;而IgG对照组中检测不到信号。说明在TGF- $\beta$ 1刺激A549细



**Figure 3** HDAC7 is involved in the regulation of EMT by interaction with vimentin. A: Deficiency of HDAC7 suppressed TGF- $\beta$ 1-induced EMT and expression of collagen I; B: Molecular dynamic simulation shows interactions at the HDAC7 and vimentin interface; C: Reciprocal Co-IP of HDAC7 and vimentin in A549 cells.  $n = 3$ ,  $\bar{x} \pm s$ . <sup>###</sup> $P < 0.01$  vs sh-NC; <sup>\*</sup> $P < 0.05$ , <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$  vs sh-NC+ TGF- $\beta$ 1 group. Co-IP: Coimmunoprecipitation

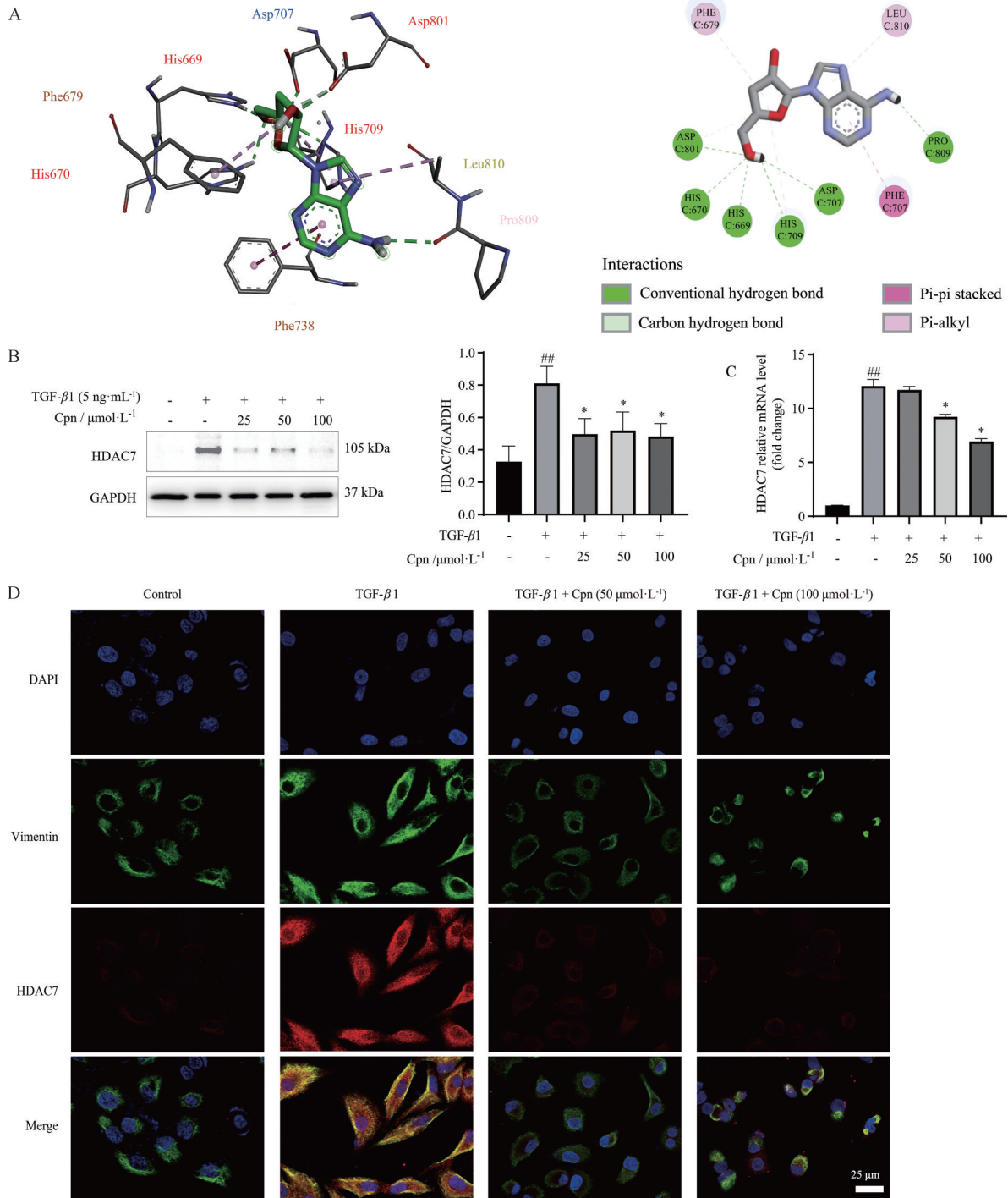
胞中, HDAC7和 vimentin存在相互作用。

#### 4 虫草素下调 TGF-β1 诱导的 A549 细胞的 HDAC7 和 vimentin 的表达

本研究接着通过分子对接实验预测虫草素与 HDAC7 之间的关系。将虫草素与 HDAC7 活性位点进

行分子对接验证, 结果所示 (图 4A), 观察到虫草素与 HDAC7 的活性位点形成强氢键, 表明受体与配体之间有良好的结合活性, 对接能力强, 对接后分子稳定性高。

EMT 的重要细胞表型标志之一是 vimentin 的表达升高, vimentin 的表达水平密切调控 EMT 从而影响肺



**Figure 4** Cpn down-regulates TGF-β1-induced expression of HDAC7 and vimentin in A549 cells. A: Docking of Cpn and HDAC7; B: The level of HDAC7 in TGF-β1-induced cells treated with Cpn for 48 h was analyzed by Western blot; C: The level of HDAC7 mRNA in TGF-β1-induced cells treated with Cpn was analyzed by quantitative real-time PCR.  $n = 3, \bar{x} \pm s$ .  $^{##}P < 0.01$  vs control group;  $^{*}P < 0.05$  vs TGF-β1 group; D: Expressions of vimentin and HDAC7 were observed by immunofluorescence microscopy in TGF-β1-induced cells. Scale bar: 25 μm

纤维化的形成, vimentin 可被乙酰化降解<sup>[7]</sup>, HDAC7 作为一种去乙酰化酶, 具有去乙酰化作用。本研究检测了不同浓度虫草素作用后 HDAC7 蛋白 (图 4B) 与基因 (图 4C) 的表达。结果显示, 与对照组比较, 单独用 TGF- $\beta$ 1 处理细胞组的 HDAC7 的蛋白及基因表达上升, 使用浓度为 25、50、100  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  虫草素作用于 TGF- $\beta$ 1 诱导的细胞 48 h 后均显著下调了 HDAC7 的蛋白及基因表达水平。结果表明, 虫草素可能通过下调 HDAC7 的表达抑制 EMT, 从而发挥其抗肺纤维化作用。

本研究通过细胞免疫荧光实验检测虫草素对 TGF- $\beta$ 1 激活 A549 细胞的 vimentin 及 HDAC7 表达的影响, 结果显示 (图 4D), 与对照组相比, TGF- $\beta$ 1 组的 vimentin 与 HDAC7 荧光水平显著升高; 与 TGF- $\beta$ 1 组相比, 使用浓度为 50 和 100  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的虫草素作用于 TGF- $\beta$ 1 诱导的细胞 48 h 后, 可显著降低细胞中 vimentin 与 HDAC7 荧光水平。结果表明, 虫草素可抑制 vimentin 与 HDAC7 表达, 抑制 EMT 从而发挥抗肺纤维化功能。

### 5 虫草素通过抑制 EMT 改善肺纤维化

本研究在 BLM 诱导的小鼠肺纤维化模型中验证虫草素作用, 通过对各实验组的肺组织进行了 H&E 染色考察虫草素给药治疗后肺组织病理结构的变化。结果所示 (图 5A), 生理盐水对照组小鼠肺泡结构正常, 无明显炎性细胞渗出; BLM 模型组小鼠肺泡结构紊乱, 肺泡壁增厚, 肺泡间隔增宽, 可见大量炎性细胞渗出, 纤维灶形成; 相比 BLM 模型组, 虫草素治疗组及 PFD 药物组明显减轻炎性细胞渗出, 减少了小鼠肺组织结构破坏, 以上结果表明虫草素能够减轻 BLM 诱导肺部炎症损伤。对各实验组的肺组织进行了 Masson 染色 (图 5B), 对照组的肺组织无明显蓝色胶原沉积, BLM 组小鼠肺组织有弥漫性蓝色胶原沉积, 表明肺纤维化形成。PFD 药物组未见明显的胶原沉积; 虫草素药物组的胶原沉积明显减少, 除了 Cpn (6  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) 剂量组的小鼠肺组织局部有少量蓝色胶原沉积, Cpn (12、24  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) 剂量组的小鼠肺内未见明显胶原纤维沉积, 提示虫草素长期给药治疗能够明显抑制胶原纤维沉积。

本研究通过免疫组化实验检测肺纤维化小鼠肺组织的  $\alpha$ -SMA 与 vimentin 的表达, 结果所示 (图 5C), 与对照组比较, BLM 组的  $\alpha$ -SMA 与 vimentin 阳性表达增加; 与 BLM 组比较, PFD 药物组与虫草素组  $\alpha$ -SMA 与 vimentin 阳性表达减少。通过 Western blot 测了各组小鼠肺组织中 collagen I、 $\alpha$ -SMA、N-cadherin、vimentin、E-cadherin 蛋白表达, 结果所示 (图 5D), 与对照组比较, collagen I、 $\alpha$ -SMA、N-cadherin、vimentin 蛋白表达在气管滴入 BLM 21 天后明显上调, E-cadherin 的表达

下降; 与 BLM 模型组相比, PFD 药物组及虫草素治疗组肺组织中 collagen I、 $\alpha$ -SMA、N-cadherin、vimentin 蛋白的表达水平下降, E-cadherin 的蛋白表达水平上升。综上, 虫草素能够减轻 BLM 诱导的肺纤维化小鼠的 EMT, 发挥抗肺纤维化作用。

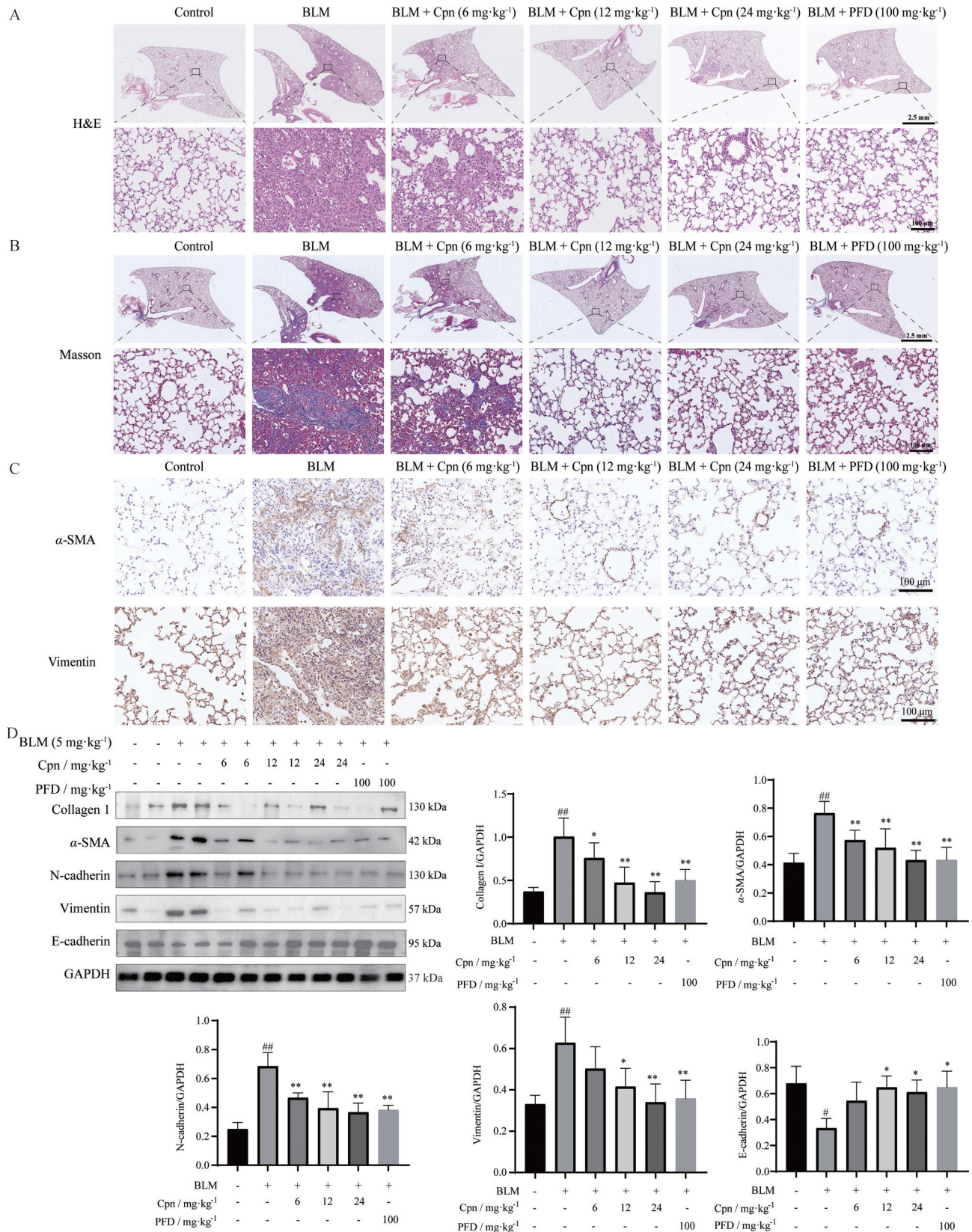
### 6 虫草素下调肺纤维化小鼠肺组织中 HDAC7 蛋白表达

本研究进一步在 BLM 诱导的小鼠肺纤维化模型验证虫草素抗肺纤维化的分子作用机制, 采用 Western blot 与免疫组化考察了虫草素对肺组织中 HDAC7 蛋白表达的影响。结果显示 (图 6), 与对照组比较, 模型组小鼠肺组织 HDAC7 蛋白表达明显升高; 与模型组比较, PFD 药物组与虫草素组 HDAC7 蛋白表达明显降低。提示虫草素可能靶向 HDAC7 促使 vimentin 发生乙酰化而降解, 抑制 EMT 从而发挥抗肺纤维化作用。

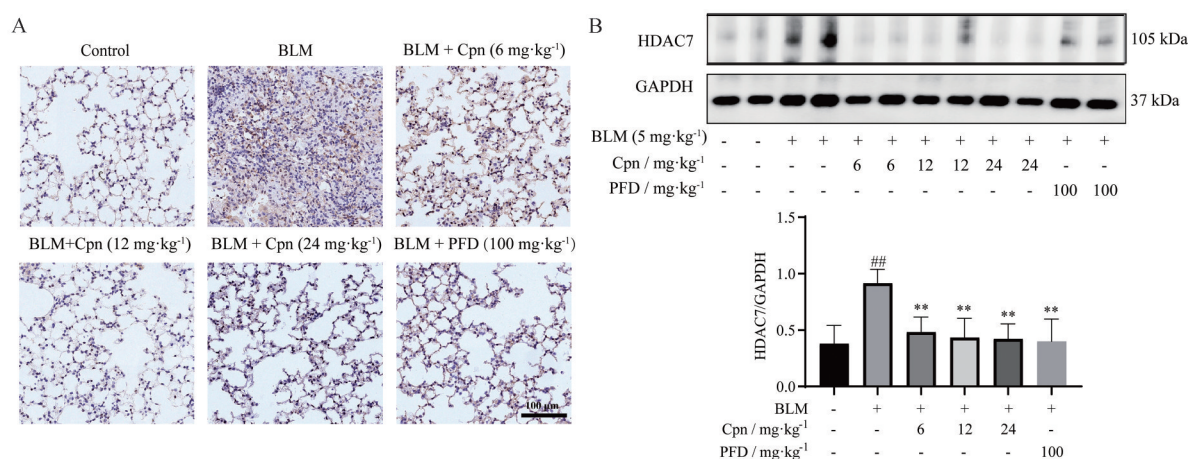
### 讨论

肺纤维化是一种不明原因的慢性疾病, 肺功能的持续下降导致呼吸衰竭至最终死亡。尽管美国食品药品监督管理局批准 PFD 和尼达尼布作为唯一的抗 PF 药物, 但只能缓解症状, 无法有效逆转病情, 且具有肝脏和肾脏毒性<sup>[22]</sup>。肺移植虽是治疗终末期肺纤维化最有效的手段, 但供体短缺、价格昂贵等限制了其在临床的应用<sup>[23]</sup>, 肺纤维化具体发病机制仍不明确, 且缺乏有效治疗肺纤维化药物。

如今, 从传统中药中提取毒副作用小的有效单体成分已成为纤维化疾病治疗的新途径<sup>[24]</sup>。中医认为肺纤维化病机以虚痰瘀痹阻为主, 冬虫夏草是一味补虚中药, 治疗久咳虚喘、劳嗽痰血, 为平补肺肾之佳品, 已有研究表明, 具有改善肺纤维化的功效<sup>[15]</sup>。这启发研究者从传统中药冬虫夏草中挖掘抗肺纤维化的主要活性成分, 进而研发抗肺纤维化药物。虫草素是冬虫夏草的主要活性成分, 是一种具有广泛药理活性的单体中药, 吸收到细胞中并通过代谢转化为一磷酸、二磷酸和三磷酸, 其中一磷酸通过激活 AMPK 发挥多种作用<sup>[25]</sup>。据研究报道, 虫草素具有抗肝纤维化<sup>[26]</sup>、抗心肌纤维化<sup>[27]</sup>、抗衰老、抑制炎症及细胞凋亡<sup>[28]</sup>的功能, 且虫草素还具有改善肾损伤、肝损伤及肺损伤的作用<sup>[29]</sup>。肺纤维化是由慢性肺损伤所引发, 但是虫草素在肺纤维化中的作用及机制研究却很少见。EMT 是上皮屏障破坏后引起纤维化的重要机制<sup>[30]</sup>, EMT 发生逐渐破坏肺基质, 从而导致肌成纤维细胞的活化和积累, 最终导致肺纤维化, 因此抑制 EMT 是逆转肺纤维化的关键<sup>[31]</sup>。本研究基于 TGF- $\beta$ 1 诱导 A549 细胞模型与 BLM 诱导小鼠的肺纤维化模型, 体外细胞实验证实了虫草



**Figure 5** Cpn reduced BLM-induced EMT to exert antipulmonary fibrosis in mice. **A:** Pulmonary pathological changes in tissues from BLM-treated mice with or without Cpn treatments were examined by H&E staining (1× and 20×); **B:** Collagen deposition in lung tissues was visualized and examined by Masson's trichrome staining (1× and 20×); **C:** Expression levels of vimentin and  $\alpha$ -SMA detected by IHC (10×); **D:** Levels of collagen I,  $\alpha$ -SMA, N-cadherin, vimentin, E-cadherin by Western blot.  $n = 4, \bar{x} \pm s. \#P < 0.05, \#\#\#P < 0.01$  vs control group;  $*P < 0.05, **P < 0.01$  vs BLM group. BLM: Bleomycin; H&E: Hematoxylin-eosin; IHC: Immunohistochemistry



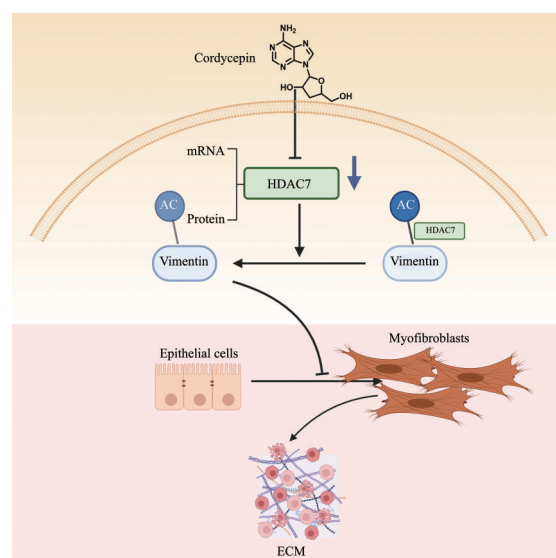
**Figure 6** Cpn repressed expression of HDAC7 in mice. A: Cpn reduced the expression level of HDAC7 detected by IHC (10 $\times$ ); B: The level of HDAC7 protein expression by Western blot.  $n = 4, \bar{x} \pm s$ . <sup>##</sup> $P < 0.01$  vs control group; <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$  vs BLM group

素抑制 A549 细胞的迁移与侵袭能力, 具有抑制 EMT 的作用, 体内动物实验发现虫草素可显著改善肺纤维化小鼠的病理状态与肺组织形态结构, 且抑制肺组织中胶原的沉积与 EMT。

HDAC7 是组蛋白去乙酰化酶 (HDAC) 中的一种, 可调控氧化应激、炎症及心肌重塑<sup>[32]</sup>, 在肺纤维化疾病中也起着重要作用<sup>[11]</sup>。Vimentin 在 EMT 进展为肺纤维化的过程中发挥关键作用<sup>[33]</sup>, 肺泡上皮细胞在上皮-间充质转化过程中会分泌大量的 vimentin, 促进肌成纤维细胞的活化并维持肌成纤维细胞的表型, 从而导致大量胶原蛋白过度在肺部沉积诱发肺纤维化<sup>[34]</sup>。Vimentin 乙酰化是抑制 EMT 的关键<sup>[7]</sup>。本研究敲低 HDAC7 基因后发现可抑制 TGF- $\beta$ 1 诱导 A549 细胞的 EMT 与胶原的生成, 且虫草素可靶向 HDAC7 发挥作用; 通过分子对接实验与免疫共沉淀实验发现 HDAC7 与 vimentin 存在相互作用; 且分子对接实验发现虫草素可明显结合在 HDAC7 的活性位点; 在 TGF- $\beta$ 1 诱导 A549 细胞模型与 BLM 诱导小鼠模型中, 发现虫草素干预后, HDAC7 的基因及蛋白表达明显下调。以上结果表明, 虫草素可能作用于 HDAC7 的活性位点, 导致 vimentin 乙酰化而降解, 进而抑制 EMT 发挥抗肺纤维化作用。

综上所述, 在体内外模型中, 虫草素抑制 EMT 发挥抗肺纤维化作用, 其机制通过作用于 HDAC7 的活性位点, 使得 vimentin 乙酰化而降解, 从而抑制 EMT 发挥肺纤维化保护作用 (图 7)。这从新的视角揭示了虫草素抑制肺纤维化发生发展的机制, 为其临床应用提供了新的理论基础与实验依据, 其抗肺纤维化作用机制有待进一步研究。

**作者贡献:** 王小叶负责细胞和动物实验、数据分析及文章撰写; 盛光丽参与部分动物实验; 吴悦负责分子对接实验;



**Figure 7** Roadmap of this article. Cpn suppressed EMT in pulmonary fibrosis through HDAC7/vimentin signaling pathway. ECM: Extra cellular matrix; Ac: Acetylation

程明涵参与课题设计和指导; 高建负责课题设计、指导和论文审阅。

**利益冲突:** 本文所有作者声明不存在利益冲突关系。

## References

- [1] Bocchino M, Bruzzese D, Scioscia G, et al. Disease stage-related survival in idiopathic pulmonary fibrosis patients treated with nintedanib and pirfenidone: an exploratory study [J]. *Respir Med Res*, 2023, 84: 101013.
- [2] Lechowicz K, Drożdżal S, Machaj F, et al. COVID-19: the potential treatment of pulmonary fibrosis associated with SARS-CoV-2 infection [J]. *J Clin Med*, 2020, 9: 1917.
- [3] Somogyi V, Chaudhuri N, Torrisi SE, et al. The therapy of idiopathic pulmonary fibrosis: what is next [J]? *Eur Respir Rev*,

- 2019, 28: 190021.
- [4] Peng L, Wen L, Shi QF, et al. Scutellarin ameliorates pulmonary fibrosis through inhibiting NF- $\kappa$ B/NLRP3-mediated epithelial-mesenchymal transition and inflammation [J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11: 978.
- [5] Salton F, Volpe MC, Confalonieri M. Epithelial-mesenchymal transition in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Medicina (Kaunas)*, 2019, 55: 83.
- [6] Li Q, Deng MS, Wang RT, et al. PD-L1 upregulation promotes drug-induced pulmonary fibrosis by inhibiting vimentin degradation [J]. *Pharmacol Res*, 2023, 187: 106636.
- [7] Xiong L, Ye X, Chen Z, et al. Advanced maternal age-associated SIRT1 deficiency compromises trophoblast epithelial-mesenchymal transition through an increase in vimentin acetylation [J]. *Aging Cell*, 2021, 20: e13491.
- [8] Ding S, Wang X, Lv D, et al. EBF3 reactivation by inhibiting the EGR1/EZH2/HDAC9 complex promotes metastasis *via* transcriptionally enhancing vimentin in nasopharyngeal carcinoma [J]. *Cancer Lett*, 2022, 527: 49-65.
- [9] Lyu X, Hu M, Peng J, et al. HDAC inhibitors as antifibrotic drugs in cardiac and pulmonary fibrosis [J]. *Ther Adv Chronic Dis*, 2019, 10: 2040622319862697.
- [10] Guo K, Ma Z, Zhang Y, et al. HDAC7 promotes NSCLC proliferation and metastasis *via* stabilization by deubiquitinase USP10 and activation of  $\beta$ -catenin-FGF18 pathway [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2022, 41: 91.
- [11] Korfei M, Skwarna S, Henneke I, et al. Aberrant expression and activity of histone deacetylases in sporadic idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Thorax*, 2015, 70: 1022-1032.
- [12] Hua HS, Wen HC, Weng CM, et al. Histone deacetylase 7 mediates endothelin-1-induced connective tissue growth factor expression in human lung fibroblasts through p300 and activator protein-1 activation [J]. *J Biomed Sci*, 2021, 28: 38.
- [13] Lei Y, Liu L, Zhang S, et al. HDAC7 promotes lung tumorigenesis by inhibiting STAT3 activation [J]. *Mol Cancer*, 2017, 16: 170.
- [14] Ma ZQ, Feng YT, Guo K, et al. Melatonin inhibits ESCC tumor growth by mitigating the HDAC7/ $\beta$ -catenin/c-Myc positive feedback loop and suppressing the USP10-maintained HDAC7 protein stability [J]. *Mil Med Res*, 2022, 9: 54.
- [15] Chen M, Cheung FW, Chan MH, et al. Protective roles of *Cordyceps* on lung fibrosis in cellular and rat models [J]. *J Ethnopharmacol*, 2012, 143: 448-454.
- [16] Ashraf SA, Elkhalfifa AEO, Siddiqui AJ, et al. Cordycepin for health and wellbeing: a potent bioactive metabolite of an entomopathogenic medicinal fungus *Cordyceps* and its nutraceutical and therapeutic potential [J]. *Molecules*, 2020, 25: 2735.
- [17] Qing R, Huang Z, Tang Y, et al. Cordycepin alleviates lipopolysaccharide-induced acute lung injury *via* Nrf2/HO-1 pathway [J]. *Int Immunopharmacol*, 2018, 60: 18-25.
- [18] Lan T, Yu Y, Zhang J, et al. Cordycepin ameliorates nonalcoholic steatohepatitis by activation of the AMP-activated protein kinase signaling pathway [J]. *Hepatology*, 2021, 74: 686-703.
- [19] Wang Z, Chen Z, Jiang Z, et al. Cordycepin prevents radiation ulcer by inhibiting cell senescence *via* NRF2 and AMPK in rodents [J]. *Nat Commun*, 2019, 10: 2538.
- [20] Wei C, Yao X, Jiang Z, et al. Cordycepin inhibits drug-resistance non-small cell lung cancer progression by activating AMPK signaling pathway [J]. *Pharmacol Res*, 2019, 144: 79-89.
- [21] Hulpia F, Mabilille D, Campagnaro GD, et al. Combining tubercidin and cordycepin scaffolds results in highly active candidates to treat late-stage sleeping sickness [J]. *Nat Commun*, 2019, 10: 5564.
- [22] Raghu G, Rochwerg B, Zhang Y, et al. An official ATS/ERS/JRS/ALAT clinical practice guideline: treatment of idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2015, 192: e3-e19.
- [23] Le Pavec J, Dauriat G, Gazengel P, et al. Lung transplantation for idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Presse Med*, 2020, 49: 104026.
- [24] Hao M, Guan Z, Zhang Z, et al. Atractylodinol prevents pulmonary fibrosis through inhibiting TGF- $\beta$  receptor 1 recycling by stabilizing vimentin [J]. *Mol Ther*, 2023, 31: 3015-3033.
- [25] Hawley SA, Ross FA, Russell FM, et al. Mechanism of activation of AMPK by cordycepin [J]. *Cell Chem Biol*, 2020, 27: 214-222.e4.
- [26] Qi G, Zhou Y, Zhang X, et al. Cordycepin promotes browning of white adipose tissue through an AMP-activated protein kinase (AMPK)-dependent pathway [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2019, 9: 135-143.
- [27] Wang HB, Duan MX, Xu M, et al. Cordycepin ameliorates cardiac hypertrophy *via* activating the AMPK $\alpha$  pathway [J]. *J Cell Mol Med*, 2019, 23: 5715-5727.
- [28] Zhou M, Zha Z, Zheng Z, et al. Cordycepin suppresses vascular inflammation, apoptosis and oxidative stress of arterial smooth muscle cell in thoracic aortic aneurysm with VEGF inhibition [J]. *Int Immunopharmacol*, 2023, 116: 109759.
- [29] Zheng R, Zhang W, Song J, et al. Cordycepin from *Cordyceps militaris* ameliorates diabetic nephropathy *via* the miR-193b-5p/MCL-1 axis [J]. *Chin Med*, 2023, 18: 134.
- [30] Luo L, Zhang W, You S, et al. The role of epithelial cells in fibrosis: mechanisms and treatment [J]. *Pharmacol Res*, 2024, 202: 107144.
- [31] Meyer KC. Pulmonary fibrosis, part I: epidemiology, pathogenesis, and diagnosis [J]. *Expert Rev Respir Med*, 2017, 11: 343-359.
- [32] Hsu A, Duan Q, McMahon S, et al. Salt-inducible kinase 1 maintains HDAC7 stability to promote pathologic cardiac remodeling [J]. *J Clin Invest*, 2020, 130: 2966-2977.
- [33] Ridge KM, Eriksson JE, Pekny M, et al. Roles of vimentin in health and disease [J]. *Genes Dev*, 2022, 36: 391-407.
- [34] Sehgal M, Jakhete SM, Manekar AG, et al. Specific epigenetic regulators serve as potential therapeutic targets in idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Heliyon*, 2022, 8: e09773.