ANXA3通过抑制肺成纤维细胞激活减轻肺纤维化

刘 阳, 牛知慧, 李 玮, 高慧莹, 班 涛*

(哈尔滨医科大学药学院, 黑龙江 哈尔滨 150081)

摘要: 肺纤维化 (pulmonary fibrosis, PF) 是一种慢性间质性肺部疾病, 其诊断后患者平均生存期仅为3～5年, 常表现为干咳及进行性呼吸困难, 患者肺部气体交换功能丧失最终导致呼吸功能衰竭, 但其具体的发病诱因和机制尚不明确, 且缺乏有效的治疗药物及手段。因此, 进一步深入探究肺纤维化发病机制, 寻找新的治疗靶点, 对肺纤维化的治疗和预后具有重要的意义。膜联蛋白A3 (annexin A3, ANXA3) 作为钙依赖性磷脂结合蛋白家族成员, 在细胞膜运输、炎症反应及肿瘤进展等多种病理生理过程中发挥重要作用, 但其在肺纤维化中的作用尚未阐明。本研究运用体内动物模型与体外细胞实验, 探讨了ANXA3在肺纤维化中的表达变化及功能机制。在博来霉素 (bleomycin, BLM) 诱导的肺纤维化小鼠模型中, 通过Western blot、实时荧光定量PCR及免疫荧光染色技术发现, ANXA3的蛋白及mRNA水平均显著下调。为进一步明确ANXA3的作用, 本研究利用人胚肺成纤维细胞 (MRC-5) 进行系列实验, 结果显示敲减ANXA3促进纤维化相关基因表达上调, 并显著增加细胞外基质蛋白FN1的表达, 同时EdU增殖实验与细胞划痕实验表明敲减ANXA3显著增强MRC-5细胞的增殖与迁移能力; 相反, 过表达ANXA3则显著抑制转化生长因子-β1 (TGF-β1) 诱导的纤维化反应, 包括纤维化标志物的表达减低、细胞外基质沉积减少、细胞增殖与迁移能力减弱。本研究揭示ANXA3在肺纤维化进程中表达下调, 并发挥抑制成纤维细胞活化与纤维化进程的关键作用, 表明ANXA3可能作为一种内源性抗纤维化调控因子。以上发现不仅丰富了ANXA蛋白家族在肺纤维化调控网络中的作用认识, 也为未来开发基于ANXA3的肺纤维化靶向治疗策略提供了实验依据。本实验经哈尔滨医科大学药学院伦理委员会批准 (批准号: IRB3035621)。

关键词: 肺纤维化; 膜联蛋白A3; MRC-5细胞; 成纤维细胞激活; 细胞外基质

中图分类号: R966 **文献标识码**: A **文章编号**: 0513-4870(2026)06-1985-10

ANXA3 alleviates pulmonary fibrosis by inhibiting the activation of pulmonary fibroblasts

LIU Yang, NIU Zhi-hui, LI Wei, GAO Hui-ying, BAN Tao*

(*School of Pharmacy, Harbin Medical University, Harbin 150081, China*)

Abstract: Pulmonary fibrosis (PF) is a chronic interstitial lung disease with an average post-diagnosis survival of only 3−5 years. It is commonly characterized by dry cough and progressive dyspnea, ultimately leading to respiratory failure due to loss of gas exchange function. However, its exact pathogenic triggers and mechanisms remain unclear, and effective therapeutic drugs and approaches are still lacking. Therefore, further exploration of the pathogenesis of pulmonary fibrosis and the identification of new therapeutic targets are of great significance for its treatment and prognosis. Annexin A3 (ANXA3), a member of the calcium-dependent phospholipid-binding protein family, plays important roles in various pathophysiological processes such as membrane trafficking, inflammatory responses, and tumor progression. Nevertheless, its function and mechanism in pulmonary fibrosis have not yet been elucidated. In this study, using both *in vivo* animal models and *in vitro* cell experiments, we

收稿日期: 2026-01-22; 修回日期: 2026-04-29.
基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82373868).
*通讯作者 Tel: 13304650285, E-mail: bantao2000@163.com
DOI: 10.16438/j.0513-4870.2026-0093

investigated the expression changes and functional mechanisms of ANXA3 in pulmonary fibrosis. In a bleomycin (BLM)-induced mouse model of pulmonary fibrosis, Western blot, quantitative real-time PCR, and immunofluorescence staining revealed that both the protein and mRNA levels of ANXA3 were significantly downregulated. To further clarify the role of ANXA3, a series of experiments were conducted using human embryonic lung fibroblasts (MRC-5). The results showed that knockdown of ANXA3 promoted the upregulation of fibrosis-related genes and significantly increased the expression of the extracellular matrix protein FN1. Meanwhile, EdU proliferation assays and wound healing assays demonstrated that ANXA3 knockdown markedly enhanced the proliferation and migration abilities of MRC-5 cells. In contrast, overexpression of ANXA3 significantly suppressed TGF-β1-induced fibrotic responses, including reduced expression of fibrotic markers, decreased extracellular matrix deposition, and weakened cell proliferation and migration. This study reveals that ANXA3 is downregulated during pulmonary fibrosis progression and plays a key inhibitory role in fibroblast activation and fibrogenesis, suggesting that ANXA3 may serve as an endogenous anti-fibrotic regulatory factor. These findings not only enrich the understanding of the ANXA protein family in the regulatory network of pulmonary fibrosis, but also provide experimental evidence for the future development of ANXA3-targeted therapeutic strategies for pulmonary fibrosis. This experiment was approved by the Ethics Committee of the School of Pharmacy, Harbin Medical University (approval number: IRB3035621).

Key words: pulmonary fibrosis; annexin A3; MRC-5 cell; fibroblast activation; extracellular matrix

肺纤维化是一种以肺部进行性瘢痕形成为特征的慢性、不可逆性间质性肺病的总称[1]。其病理特征核心是肺泡上皮细胞的反复损伤与异常修复, 导致成纤维细胞的过度增殖和细胞外基质的大量沉积, 最终引起肺实质结构的破坏[2]。肺纤维化使肺部弹力丧失、气体交换功能障碍, 临床主要表现为干咳、进行性呼吸困难, 最终发展为终末期呼吸衰竭进而导致患者死亡[3]。其中, 特发性肺纤维化 (IPF) 最为典型, 且预后极差, 其诊断后中位生存期仅为3～5年[4]。

流行病学研究表明, 肺纤维化的疾病负担在全球范围内呈显著上升趋势。以IPF为例, 其全球患病率约为13～40例/10万人, 且随着年龄的增长而急剧升高, 超过65岁的人群患病风险尤为显著[5]。这种上升趋势部分归因于人口老龄化、诊断意识的提高以及高分辨率计算机断层扫描 (HRCT) 等检查技术的广泛应用。肺纤维化不仅导致患者生活质量严重下降, 也给医疗卫生系统带来沉重的经济负担[6]。

肺纤维化的病因复杂, 主要分为继发性纤维化和特发性纤维化。继发性纤维化常与环境因素[7]、结缔组织病[8]、细菌病毒感染和药物毒性 (如部分化疗药物) 等密切相关[9]。然而, 在肺纤维化中, 特发性肺纤维化占据了绝大部分比例。在现有研究中, 肺纤维化的发病机制主要是由于遭受内源性和外源性刺激后, 肺泡上皮细胞发生异常激活和衰老[2]。这些受损的肺泡上皮细胞释放大量的转化生长因子-β (TGF-β)、血小板衍生生长因子等促纤维化介质, 破坏上皮细胞−间充质细胞之间的平衡, 驱动成纤维细胞向肌成纤维细胞转化, 从而造成细胞外基质过度沉积和肺组织结构的重塑[10]。

目前, 针对肺纤维化的诊断及治疗手段十分匮乏, 治疗药物仅有吡非尼酮[11]和尼达尼布[12], 但二者仅能延缓肺功能的下降, 减少肺纤维化急性加重, 而无法彻底治愈肺纤维化。肺移植是终末期肺纤维化患者的唯一选择, 但肺移植受到供体稀缺、手术风险大、器官排斥反应和并发症等条件的制约, 并不能够被大多数肺纤维化患者所选择[13]。因此, 探究肺纤维化的治疗靶点和治疗手段具有重要意义。

膜联蛋白 (annexin, ANX) 是一类钙依赖性磷脂结合蛋白超家族, 在脊椎动物中包含膜联蛋白A1 (ANXA1) 至ANXA11及ANXA13共12个成员, 其结构由保守的C端核心结构域和独特的N端结构域组成, 广泛参与膜转运、细胞骨架调控、炎症反应及细胞凋亡等过程[14]。多个膜联蛋白家族成员在器官纤维化进程中发挥重要调控作用。研究发现, 博来霉素与ANXA2的Glu139残基特异性结合, 进而阻碍转录因子EB介导的自噬流, 导致肺泡上皮细胞凋亡与增殖失衡, 而ANXA2基因缺失可显著减轻博来霉素诱导的肺纤维化[15]。ANXA1则作为内源性抗炎介质, 通过作用于甲酰肽受体调控巨噬细胞功能, 在多种纤维化疾病中发挥保护作用[16]。在肾纤维化方面, 髓系特异性ANXA2敲除小鼠表现出肾小管损伤减轻、胶原沉积减少及上皮−间质转化 (EMT) 受抑, 证实巨噬细胞ANXA2通过促进EMT进程加剧肾纤维化[17,18]。在肝纤维化领域, 膜联蛋白家族成员呈现功能多样性。ANXA1通过靶向FPR调控巨噬细胞功能, 进而抑制肝星状细胞 (HSC) 中Wnt/β-catenin通路活化, 发挥抗纤

维化作用[19]; ANXA2则通过促进STAT3磷酸化上调α-平滑肌肌动蛋白 (α-SMA) 表达, 加速肝纤维化进程[20]。ANXA5通过促进巨噬细胞M1向M2型极化, 改善脂质积累并抑制纤维化[21]。

膜联蛋白A3 (ANXA3) 作为钙依赖性膜结合蛋白家族的一员, 其核心功能依赖于经典的"annexin核心结构域", 使其能够响应细胞内钙信号变化并与质膜内叶的酸性磷脂结合[22]。ANXA3在多种疾病中发挥了重要作用。ANXA3介导的外泌体信号在调控铁死亡与肿瘤转移中的双重作用, 为靶向肿瘤相关巨噬细胞的免疫治疗提供了新靶点[23]; ANXA3是EB病毒感染肿瘤的潜在治疗靶点, 阻断ANXA3能够改善血管状况, 联合NK细胞+PD1抗体疗法, 有望成为EB病毒相关上皮性恶性肿瘤的有效治疗策略[24]。在脓毒症相关急性肺损伤模型中, ANXA3表达显著上调, 通过激活ERK/ELK1通路促进炎症因子释放和细胞凋亡, 而敲减ANXA3可有效减轻肺组织损伤、水肿和炎症反应[25]。然而, 在脓毒症内皮功能障碍中发现ANXA3通过直接与β-肌动蛋白相互作用维持细胞骨架稳定, 从而增强血管内皮连接蛋白如胞质紧密黏连蛋白1、钙黏蛋白E以及封闭蛋白5的表达, 抑制血管通透性; 同时通过减少激活转录因子2磷酸化来下调E选择素等黏附分子表达, 最终减轻白细胞浸润和炎症反应[26]。但是, ANXA3在肺纤维化中的功能尚未明确。因此, 本研究旨在揭示ANXA3在肺纤维化中的作用, 为肺纤维化的治疗提供全新的分子靶点。

材料与方法

试剂与材料　硫酸博来霉素 (S1214) 购于中国Selleck Chemicals公司; HumanKine® recombinant human TGF-β1 (HZ-1011)、纤维连接蛋白 (FN1) 抗体 (15613-1-AP)、β-actin抗体 (20536-1-AP)、一型胶原蛋白 (COL1) 抗体 (14695-1-AP) 购于武汉三鹰生物技术有限公司; 4%多聚甲醛固定液 (P0099)、RIPA裂解液 (P0013B)、免疫染色强力通透液 (P0096)、免疫染色封闭液 (P0102)、BeyoClick™ EdU-594细胞增殖检测试剂盒 (C0071S)、SDS-PAGE蛋白上样缓冲液 (P0289) 购于上海碧云天生物技术有限公司; Omni-Easy™一步法PAGE凝胶快速制备试剂盒 (PG212)、三色预染蛋白marker (WJ103) 购于上海雅酶生物医药科技有限公司; ANXA3过表达质粒、pcDNA3.1、siRNA-ANXA3、siNC-ANXA3均购于武汉金开瑞生物工程有限公司; ANXA3抗体 (AF5159)、兔来源α-SMA抗体 (AF1032) 购于江苏亲科生物研究中心有限公司; 鼠来源α-SMA抗体 (Ab7817) 购于美国Abcam公司。

实验动物　使用雄性6～8周龄的SPF级C57BL/6小鼠进行动物实验, 实验小鼠饲养条件为: SPF级屏障环境动物房, 温度25 ℃, 相对湿度45%, 光照12 h明暗交替。所用小鼠采购于辽宁长生生物实验动物技术公司。动物实验经哈尔滨医科大学药学院伦理委员会批准 (批准号: IRB3035621), 全部实验操作均严格按照《中华人民共和国动物伦理指南》操作。

肺纤维化小鼠模型的构建　通过气管滴注博来霉素的方式构建肺纤维化小鼠模型。首先, 通过腹腔注射阿氟汀 (250 mg·kg^{-1}) 的形式对小鼠进行麻醉, 将麻醉小鼠四肢固定后, 以钝性分离的方式将小鼠气管周围肌肉及前筋膜充分分离, 以充分暴露气管。使用1 mL注射器吸取50 μL硫酸博来霉素 (BLM, 3 mg·kg^{-1}) 或生理盐水滴注于气管内后, 保持小鼠直立体位30 s, 使BLM充分分布于小鼠肺部, 从而建立小鼠肺纤维化及对照模型。

模型构建21天后, 对小鼠执行安乐死。剪开胸腔后迅速分离各叶肺组织, 将左右叶肺分置于4%多聚甲醛中固定24 h以备后续免疫荧光检测, 将剩余肺组织置于液氮中充分冷冻后, 于−80 ℃超低温冰箱保存, 以用于后续蛋白及mRNA检测。

细胞培养　人胚肺成纤维MRC-5细胞来源于中国科学院细胞库。将其置于MEM完全培养基 (MEM培养基 + 10%胎牛血清 + 1%青霉素−链霉素−两性霉素B) 中, 于37 ℃、5% CO_2的培养箱中培养。取对数生长期的细胞, 当细胞密度约90%时, 将细胞以1∶2的比例进行细胞传代培养。

细胞转染　MRC-5细胞转染于无血清的MEM培养基中进行。将MRC-5细胞 (每孔5×10^{5}个) 接种于6孔板中, 24 h后更换为无血清MEM培养基。设置质粒终浓度为2 mg·L^{-1}, siRNA/si-NC浓度为5 μmol·L^{-1}。取2 μL Lipofectamine™ 2000与98 μL Opti-MEM无血清培养基, 充分混匀后静置5 min。根据质粒或siRNA浓度取适量体积, 使用Opti-MEM无血清培养基定容至100 μL后充分混匀静置5 min。将上述含有Lipofectamine™ 2000的溶液与含有质粒或siRNA的溶液充分混匀后静置孵育15 min。随后将混合溶液以200 μL每孔的体积加入6孔板中, 培养6 h后将6孔板内溶液更换为MEM完全培养基继续培养48 h, 收集细胞蛋白及RNA进行检测。

细胞划痕实验　通过细胞划痕实验检测MRC-5细胞的迁移能力。首先, 将MRC-5细胞以3×10^{5}个/孔的密度接种于6孔板内, 于细胞转染完毕, 更换完全培养基时, 使用200 μL移液器枪头在孔内划出笔直划痕。使用含有2%胎牛血清的MEM培养基对细胞进

行培养, 以排除胎牛血清对细胞生长迁移的影响, 分别在0和24 h时间点对划痕进行拍照, 使用Image J统计分析划痕面积以衡量细胞迁移能力。

Western blot 收集TGF-β1或转染处理48 h后的细胞, 每孔按细胞密度加入适量含有1%蛋白酶抑制剂的RIPA裂解液, 用细胞刮刀充分刮离细胞, 收集细胞悬液使用30 Hz破碎细胞3次, 每次间隔7 min, 随后于低温高速离心机中以4 ℃、13 500 r·min^{-1}离心15 min, 取上清液。使用BCA法测定蛋白浓度。每组取40 μg总蛋白, 加入适量6× loading buffer, 将蛋白置于100 ℃金属浴7 min使蛋白充分变性。使用10% SDS-PAGE凝胶分离蛋白样品, 电泳完毕后将充分分离的蛋白样品通过湿转法转移至PVDF膜上, 使用5%脱脂牛奶封闭1 h, 洗膜后将膜置于一抗中4 ℃孵育过夜。次日将膜置于PBST中清洗3次后, 依据一抗种属孵育对应荧光二抗1 h, 洗膜后通过Odyssey双色红外成像系统扫描仪显影条带, 并用Image Studio进行图像分析和条带灰度值处理。

实时荧光定量PCR 收集TGF-β1或转染处理48 h后的细胞或肺纤维化模型小鼠的肺组织, 使用TRIzol试剂提取细胞及组织的总RNA。使用NanoDrop 8000测定RNA样品的浓度和纯度, 将RNA稀释到均一浓度后逆转录为cDNA。以逆转录获得的cDNA为模板, 对细胞及组织中的基因进行扩增。所得数据以GAPDH为内参基因, 数据采用$2^{-\Delta\Delta CT}$分析目的基因表达的相对定量。检测指标为ANXA3、FN1、人胶原蛋白α1 (COL1α1)及平滑肌肌动蛋白α2 (ACTA2)。所用引物序列详见表1。

细胞免疫荧光染色 首先, 将MRC-5细胞接种于24孔板中(密度为1×10^{5}个/孔), 将细胞进行转染处理或TGF-β1处理后, 去除孔板内的培养基, 加入预冷的PBS清洗3次。之后于室温下向其中加入4%多聚甲醛500 μL, 静置15 min以固定细胞。固定完成后加入PBS清洗3次, 每次3 min。使用免疫染色强力通透液对细胞进行透化, 每孔加入500 μL, 室温穿透10 min。加入PBS清洗3次, 每次3 min。使用免疫染色封闭液进行封闭, 以降低非特异性结合。每孔加入500 μL, 室温封闭20 min后, 加入PBS清洗3次, 每次3 min。加入一抗后于4 ℃孵育过夜。次日回收一抗, PBS清洗3次。加入对应种属荧光二抗孵育1 h后, 再加入DAPI染液10 min使细胞核着色。最后通过荧光显微镜获取细胞免疫荧光染色图像。

组织免疫荧光染色 将新鲜采集的小鼠肺组织立即浸入4%多聚甲醛中, 于4 ℃条件下持续固定24 h以确保组织结构完整。固定完成后, 组织依次经含有15%和30%蔗糖的PBS溶液进行梯度脱水处理, 直至组织块自然沉降于管底。脱水后的组织用OCT包埋剂包埋, 置于−80 ℃超低温环境中快速冷冻固化。随后采用冷冻切片机将组织块切割为厚度5 μm的连续切片, −20 ℃保存备用。染色前将切片恢复至室温后, 使用预冷丙酮固定10 min, PBS漂洗3次。切片经3%过氧化氢溶液4 ℃孵育10 min以抑制内源性过氧化物酶干扰。PBS清洗3次后切片滴加适量免疫染色强力通透液, 室温穿透10 min; 随后采用免疫染色封闭液室温封闭10 min, 以减少非特异性结合。去除封闭液后, 滴加适量一抗覆盖组织区域, 将切片置于保湿盒中, 于4 ℃冰箱中孵育过夜。次日将切片恢复至室温, PBS充分洗涤3次以去除未结合一抗。滴加对应种属荧光二抗, 避光条件下室温孵育60 min。最终经PBS洗涤3次后, 使用DAPI染液于室温孵育5 min对细胞核进行染色。染色完成后以抗荧光淬灭封片剂封片, 并于激光共聚焦显微镜进行图像采集。

EdU细胞增殖实验 采用BeyoClick™ EdU-594细胞增殖检测试剂盒进行实验。细胞经相应处理后, 在完全培养基中加入终浓度为10 μmol·L^{-1}的EdU工作液, 于37 ℃二氧化碳培养箱内继续孵育2 h, 使增殖细胞将EdU整合入新合成的DNA链中。标记结束后, 弃去培养基, 使用4%多聚甲醛室温固定细胞15 min, 随后PBS洗涤3次, 每次3 min。洗涤后, 每孔加入现配制的Click反应混合液250 μL (其组成为Click reaction buffer 214.5 μL、$CuSO_4$ 10 μL、azide 594 0.5 μL及Click additive solution 25 μL), 于室温避光条件下反应30 min, 该点击化学反应使掺入的EdU与AF594荧光探针共价结合。反应终止后, 彻底洗涤去除未结合的探针。最后, 使用Hoechst 33342对细胞核进行复染10 min。处理后的样本在荧光显微镜下观察并采集图像, 其中红色荧光信号代表EdU阳性(即增殖)细胞, 而Hoechst复染的蓝色荧光用于标识全部细胞核, 通过使

Table 1 Primer sequence used for the analysis of mRNA expression. ANXA3: Annexin A3; FN1: Fibronectin; COL1α1: Collagen1α1; ACTA2: Actin alpha 2, smooth muscle

Species	Gene	Forward primer (5' to 3')	Reverse primer (5' to 3')
Human	*ANXA3*	CTCCACCAGCAGTCTTTGATGC	CCTTCATTTGCCTGCTTGTCCTG
	FN1	CGGTGGCTGTCAGTCAAAG	AAACCTCGGCTTCCTCCATAA
	COL1α1	GAGGGCCAAGACGAAGACATC	CAGATCACGTCATCGCACAAC
	ACTA2	GTGTTGCCCCTGAAGAGCAT	GCTGGGACATTGAAAGTCTCA

用Image J进行细胞计数从而计算细胞增殖比率。

统计学方法　所有实验结果通过Image J软件进行测量。所有实验数据通过GraphPad Prism 10.0软件进行分析和绘制, 用平均值 ± SEM表示。独立样本*t*检验 (*t*-test) 用于两组间数据比较; 单因素方差分析 (ANOVA) 进行多组间数据比较, Bonferroni检验法用于校正。$P < 0.05$认为有统计学意义。

结果

1　ANXA3在BLM诱导的肺纤维化小鼠模型中表达降低

本研究采用BLM气管滴注的方式构建了小鼠肺纤维化模型, 并且对模型小鼠的肺组织进行了Western blot检测。结果表明, 与对照组相比, 在纤维化模型小鼠的肺组织中纤维化相关标记基因FN1、COL1及*α*-SMA的蛋白表达显著上调 (图1A), 表明肺纤维化模型构建成功。进一步研究发现, ANXA3蛋白在肺纤维化小鼠模型中表达降低。同时, qRT-PCR检测发现, 在纤维化模型小鼠的肺组织中, *ANXA3*的mRNA水平也显著下降 (图1B)。此外, 通过免疫荧光实验发现, 与对照组相比, ANXA3在BLM诱导的纤维化小鼠模型中表达降低 (图1C)。上述结果表明, 在纤维化模型小鼠的肺组织中, ANXA3的表达下调。

2　敲减ANXA3促进MRC-5细胞分化

为明确ANXA3在肺纤维化中的作用, 本研究构建了siRNA以降低ANXA3的表达, 通过qRT-PCR实验验证了siRNA的敲减效率。结果表明, siANXA3能够有效抑制MRC-5细胞中ANXA3的表达 (图2A)。

在肺纤维化的病理进程中, 成纤维细胞异常激活, 细胞收缩力增强, 向肌成纤维细胞分化并分泌大量细胞外基质, 形成瘢痕组织后降低肺顺应性, 最终导致患者的呼吸衰竭。而ACTA2作为肌成纤维细胞标志物*α*-SMA的编码基因, 其水平可以反映成纤维细胞向肌成纤维细胞分化的程度。qRT-PCR实验结果发现, 与对照组相比, 敲减ANXA3可以显著升高MRC-5细胞中*FN1*、*ACTA2*和*COL1α1*的mRNA水平 (图2B～D)。同时Western blot实验结果也表明, 与对照组相比, 在MRC-5细胞中敲减ANXA3也可以显著上调FN1、COL1及*α*-SMA的蛋白表达 (图2E、F)。

本研究通过免疫荧光实验发现, 当敲减ANXA3时, MRC-5细胞中肌成纤维细胞标志物*α*-SMA的表达显著增加, 表明敲减ANXA3促进了成纤维细胞向肌成纤维细胞分化 (图2G)。上述实验结果表明, 敲减ANXA3可以促进肺成纤维细胞转分化为肌成纤维细胞。

3　敲减ANXA3促进MRC-5细胞增殖与迁移

成纤维细胞活化和异常增殖是肺纤维化的主要病理学特征。因此, 本研究进一步探究了ANXA3的缺失对MRC-5细胞增殖与迁移能力的影响。EdU实验结果表明, 与对照组相比, 敲减ANXA3显著增加了MRC-5细胞中EdU阳性细胞数量 (图3A), 表明ANXA3的缺失可以促进MRC-5细胞的增殖能力。同

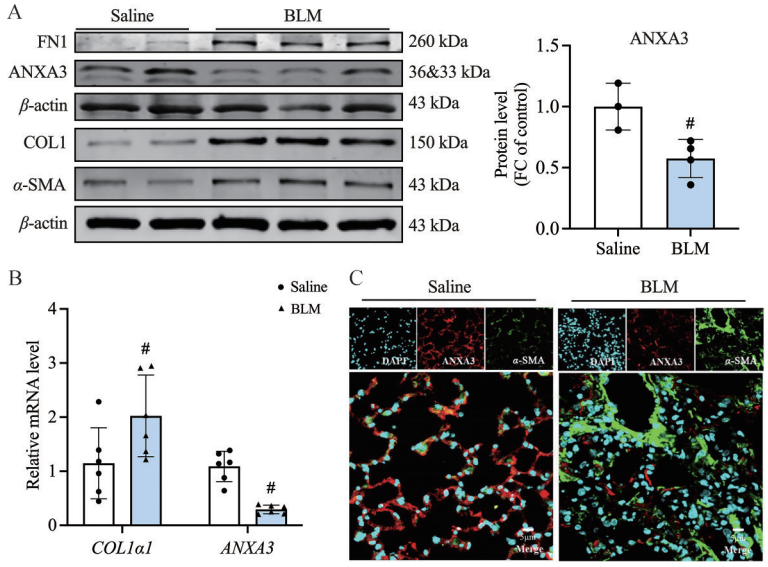


Figure 1　Down-regulation of ANXA3 in the bleomycin (BLM)-induced mouse model of pulmonary fibrosis. A: Western blot analysis was performed to evaluate the expression levels of ANXA3 and the fibrosis marker genes in lung tissues from BLM-induced mice [n = 3 (saline), n = 4 (BLM)]; B: The mRNA expression levels of *ANXA3* and the fibrosis marker *COL1α1* in lung tissues from BLM-induced mice were analyzed by qRT-PCR (n = 6); C: Immunofluorescence was used to assess the localization and expression level of ANXA3 in lung tissues from BLM-induced mice (n = 3). Scale bar: 5 μm. $\bar{x} \pm s$. $^{\#}P < 0.05$ *vs* saline group

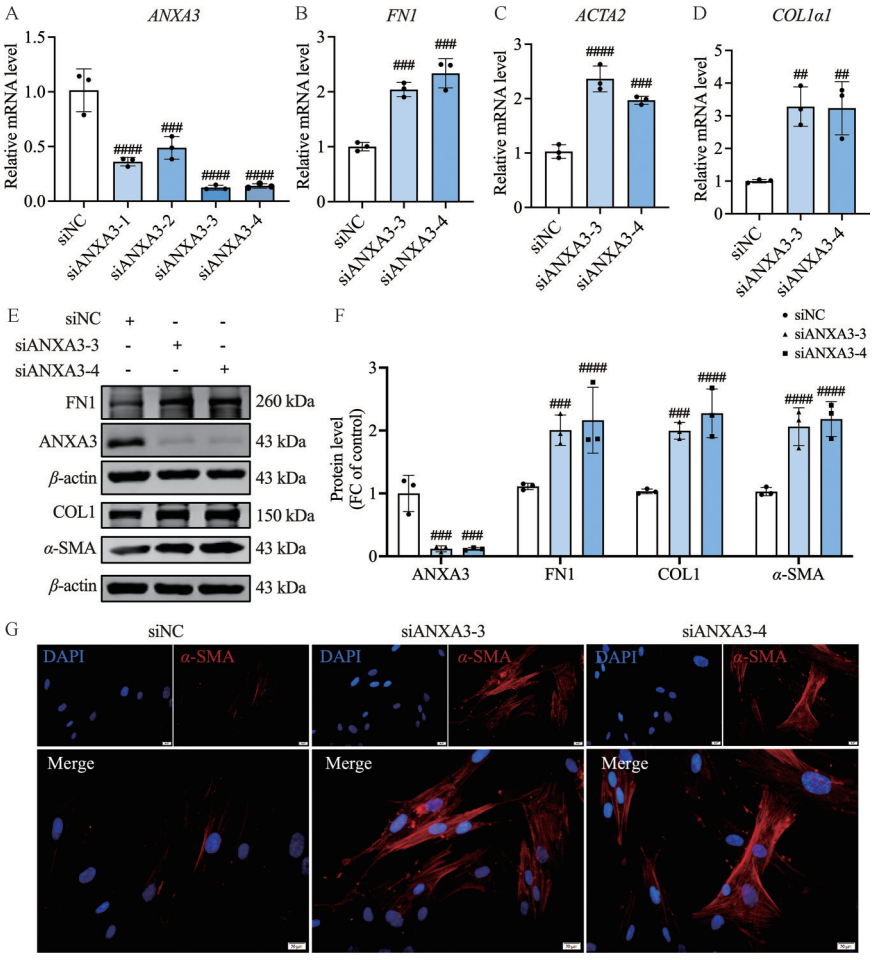


Figure 2 Knockdown of ANXA3 promoted differentiation in MRC-5 cells. A: qRT-PCR was performed to validate the efficiency of ANXA3 knockdown; B−D: To determine the impact of ANXA3 knockdown on profibrotic gene expression, we used qRT-PCR to analyze mRNA levels of key markers, including *FN1*, *ACTA2*, and *COL1α1*; E, F: Western blot analysis was performed to assess the protein expression of the fibrosis marker genes following ANXA3 knockdown in MRC-5 cells; G: Immunofluorescence was performed to examine the expression of α-SMA following ANXA3 knockdown, thereby evaluating the activation status of MRC-5 cells. Scale bar: 20 μm. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. $^{\#\#}P < 0.01$, $^{\#\#\#}P < 0.001$, $^{\#\#\#\#}P < 0.000\ 1$ *vs* siNC group

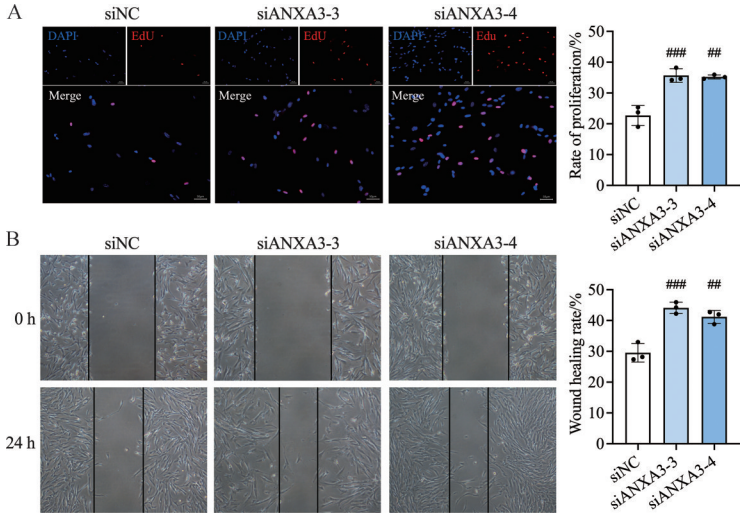


Figure 3 Knockdown of ANXA3 promoted the proliferation and migration of MRC-5 cells. A: The EdU assay showed that ANXA3 knockdown promoted the proliferation of MRC-5 cells. Scale bar: 50 μm; B: The scratch wound healing assay demonstrated that ANXA3 knockdown enhanced the migratory capacity of MRC-5 cells. Scale bar: 200 μm. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. $^{\#\#}P < 0.01$, $^{\#\#\#\#}P < 0.001$ *vs* siNC group

时, 细胞划痕实验结果表明, 与对照组相比, ANXA3缺失显著增强了MRC-5细胞的迁移能力 (图3B)。以上结果表明, 敲减ANXA3能够显著增强MRC-5细胞的增殖能力及迁移能力。

4　过表达ANXA3抑制TGF-β1诱导的MRC-5细胞分化

为了进一步探究ANXA3在肺纤维化中发挥的作用, 本研究构建了ANXA3过表达质粒, 并将其转染于MRC-5细胞中来检测其功能。通过qRT-PCR实验验证了过表达效率 (图4A)。qRT-PCR实验结果表明, 与对照组相比, TGF-β1刺激显著提高了MRC-5细胞中*FN1*、*ACTA2*和*COL1α1*的mRNA水平 (图4B～D), 而过表达ANXA3则可以显著降低TGF-β1处理后的MRC-5细胞中纤维化相关标记基因的mRNA水平。同时, 通过Western blot实验发现, 与对照组相比, 在给予TGF-β1刺激时, 纤维化相关标记基因FN1、COL1及α-SMA的蛋白质水平显著增加, 而过表达ANXA3则可以显著降低TGF-β1处理后的MRC-5细胞中纤维化相关标记基因的蛋白质水平 (图4E、F)。免疫荧光实验结果表明, 与对照组相比, 当TGF-β1刺激时, α-SMA的表达水平显著上调, 而过表达ANXA3则显著抑制了α-SMA的表达 (图4G)。以上结果表明, 过表达

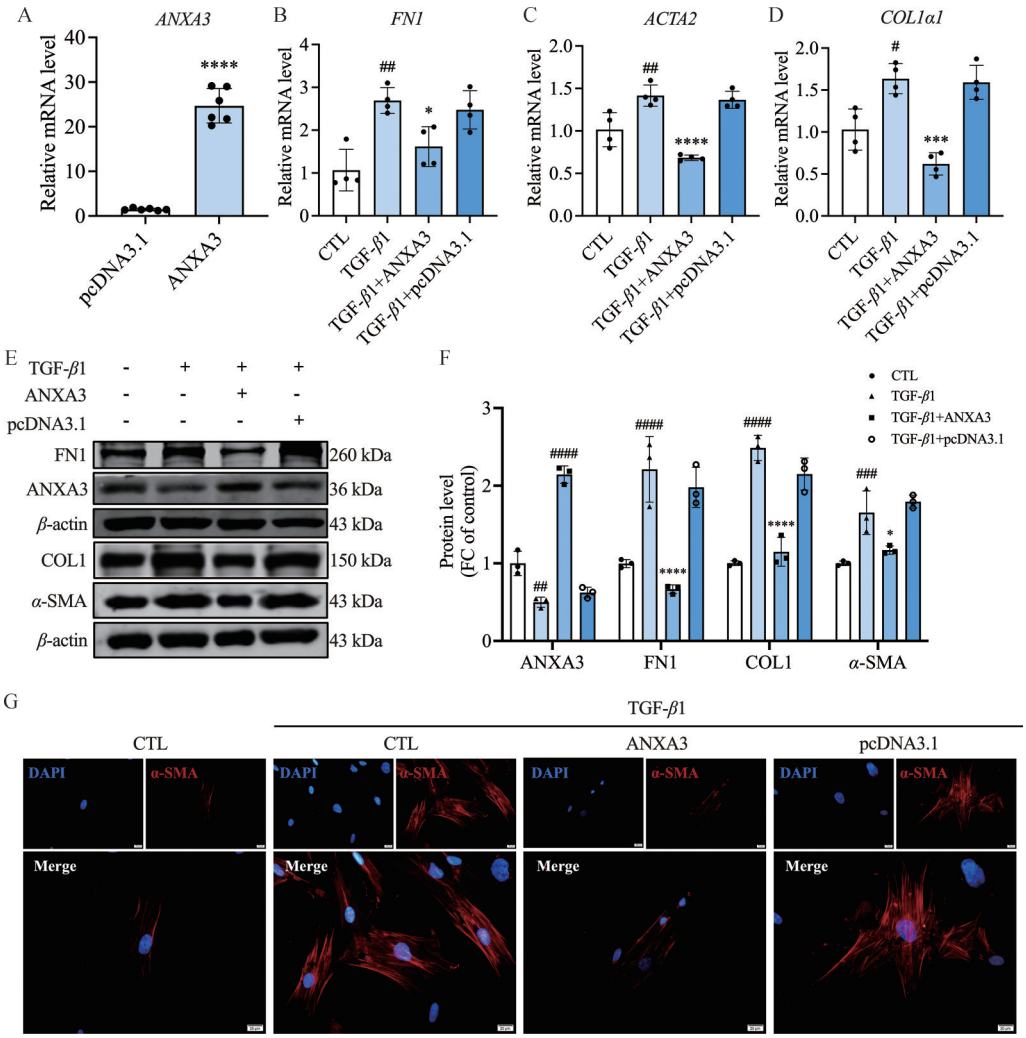


Figure 4　Overexpression of ANXA3 inhibited TGF-β1-induced differentiation in MRC-5 cells. A: qRT-PCR analysis was conducted to assess the transcriptional efficiency of ANXA3 overexpression. n = 6, $\bar{x} \pm s$. $^{****}P < 0.000\ 1$ *vs* pcDNA3.1 group; B−D: Following TGF-β1 induction, MRC-5 cells overexpressing ANXA3 were analyzed by qRT-PCR for mRNA expression of the fibrosis-related markers *FN1*, *ACTA2* and *COL1α1*. n = 4, $\bar{x} \pm s$. $^{\#}P < 0.05$, $^{\#\#}P < 0.01$ *vs* CTL group; $^{*}P < 0.05$, $^{***}P < 0.001$, $^{****}P < 0.000\ 1$ *vs* TGF-β1 group; E, F: Western blot analysis was performed to assess the protein-level expression of the fibrosis-related marker genes following ANXA3 overexpression. n = 3, $\bar{x} \pm s$. $^{\#\#}P < 0.01$, $^{\#\#\#}P < 0.001$, $^{\#\#\#\#}P < 0.000\ 1$ *vs* CTL group; $^{*}P < 0.05$, $^{****}P < 0.000\ 1$ *vs* TGF-β1 group; G: Immunofluorescence was used to detect the effect of overexpression of ANXA3 on α-SMA expression in MRC-5 cells stimulated by TGF-β1. n = 3. Scale bar: 20 μm

ANXA3可以显著抑制由TGF-β1刺激所诱导的MRC-5细胞转分化。

5 过表达ANXA3抑制TGF-β1诱导的MRC-5细胞增殖与迁移

本研究检测了过表达ANXA3对MRC-5细胞增殖与迁移能力的影响，EdU细胞增殖实验结果显示，与对照组相比，TGF-β1刺激可以显著增加MRC-5细胞EdU阳性细胞的数量，而过表达ANXA3显著减少MRC-5细胞EdU阳性细胞的数量 (图5A)。同时，细胞划痕实验结果显示，与对照组相比，TGF-β1刺激可以显著增强MRC-5细胞的迁移能力，而过表达ANXA3则显著抑制了由TGF-β1刺激所引发的MRC-5细胞迁移能力的增加 (图5B)。综上所述，过表达ANXA3可以显著抑制由TGF-β1刺激所引发的MRC-5细胞的异常增殖及迁移。

讨论

IPF作为一种慢性进行性间质性肺病，目前面临难发现、难诊断、难治疗等多重困境。研究表明，IPF患者确诊后的中位生存期仅为3～5年[27]。在IPF初期，多数患者症状表现为干咳并伴随着进行性呼吸困难。最终，伴随着肺纤维化进程的不断发展，肺泡正常结构被不断破坏，从而导致患者出现不可逆的肺功能下降，最终患者出现呼吸衰竭而死亡。然而，关于IPF的确切发病原因与具体的发病机制仍有待研究与阐明[28]。近年来，尤其自新冠肺炎疫情后，IPF的全球患病率呈现显著上升趋势。目前，FDA已批准两种药物作为IPF的首选药物，分别是吡非尼酮及尼达尼布。但两种药物仅能发挥减缓肺功能衰退、减慢肺纤维化发展的作用，且两种药物的使用存在不良反应较多，无法实现对IPF的彻底治愈等局限[29]。因此，深入阐明IPF的病理机制、探寻新的治疗靶点，对于改善其诊断与治疗现状至关重要。

ANXA家族是一类在进化上高度保守的钙依赖性膜结合蛋白，其成员通过特有的结构域与细胞膜中的酸性磷脂相互作用，广泛参与膜运输、损伤修复、炎症调控等关键细胞过程[30]。不同成员在组织中表达具有选择性，且已在多种疾病中显示出重要作用，涵盖炎症、代谢综合征、神经病变及多种恶性肿瘤。已有研究表明，多个ANXA成员参与调控肺相关病理进程。如ANXA1通过结合Formyl肽受体调节炎症消退，在急性肺损伤中发挥保护作用[31]；ANXA2与S100A10形成的复合体影响血管通透性与纤溶平衡，与肺损伤修复相关[32,33]；ANXA5则在凋亡细胞表面形成分子“屏障”，抑制异常凝血反应，并在肺纤维化模型中显示调控作用[34]。这些研究表明，ANXA蛋白家族在肺稳态维持与纤维化响应中具有十分重要的作用。

ANXA3作为钙依赖性膜结合蛋白家族的一员，其

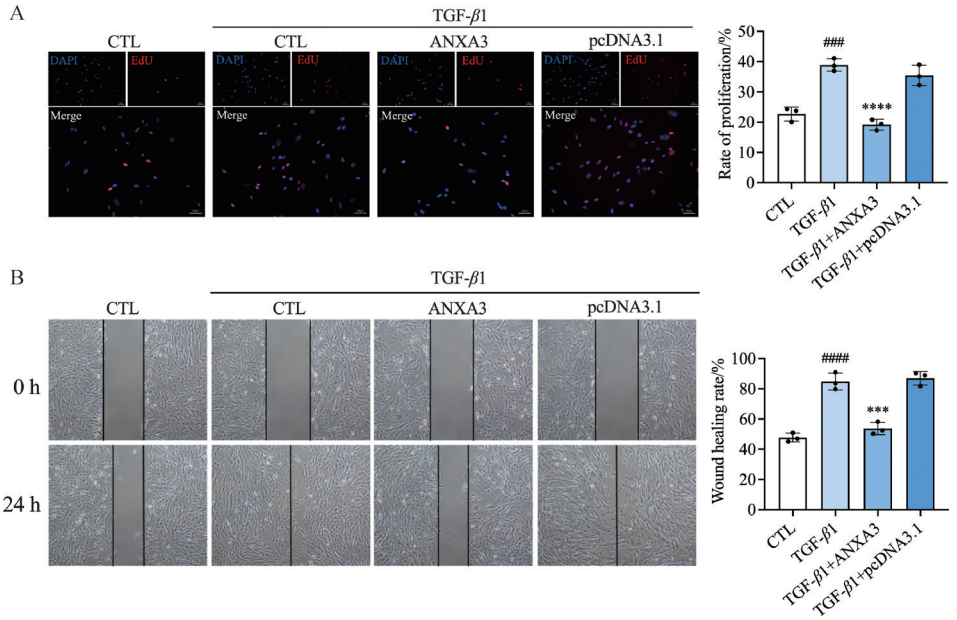


Figure 5 Overexpression of ANXA3 inhibited TGF-β1-induced proliferation and migration of MRC-5 cells. A: The proliferative capacity of TGF-β1-induced MRC-5 cells with ANXA3 overexpression was assessed using an EdU incorporation assay. Scale bar: 50 μm; B: To determine the impact of ANXA3 overexpression on cell migration, a scratch assay was performed on TGF-β1-induced MRC-5 cells with ectopic ANXA3 expression. Scale bar: 200 μm. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. $^{###}P < 0.001$, $^{####}P < 0.000\ 1$ *vs* CTL group; $^{***}P < 0.001$, $^{****}P < 0.000\ 1$ *vs* TGF-β1 group

核心功能依赖于经典的“annexin核心结构域”, 使其能够响应细胞内钙信号变化并与质膜内叶的酸性磷脂结合[22]。现有研究明确揭示了ANXA3与肿瘤进程的密切关联: 它在卵巢癌[35]、乳腺癌[36,37]、胰腺癌[30,38]、肝细胞癌[39]、肺癌[36]及骨肉瘤[40]等多种恶性肿瘤中呈现异常表达, 并参与调控癌细胞的增殖、侵袭及转移。然而, 在非肿瘤性疾病领域, 尤其是组织纤维化进程中, ANXA3的作用机制尚不明确。值得注意的是, ANXA家族的其他成员已被证实广泛参与肺损伤修复与纤维化调控网络。相比之下, ANXA3在IPF的作用及机制仍未被报道。因此, 探究ANXA3是否调控肺成纤维细胞的活化、迁移及细胞外基质分泌, 对阐明IPF的新机制及发现潜在治疗靶点具有重要科学价值。

本研究系统探究了ANXA3在肺纤维化中的功能。结果证实, 在体内纤维化模型及体外TGF-β1刺激下, ANXA3表达显著下调; 功能上, ANXA3在成纤维细胞中扮演了活化抑制因子的角色, 其缺失促进细胞的肌成纤维转分化、增殖、迁移及基质分泌, 而过表达ANXA3则发挥相反作用。本文揭示了ANXA3作为成纤维细胞活化的负向调控因子, 为理解ANXA家族蛋白在组织重塑中的功能多样性提供了新证据; 为肺纤维化治疗提出了一个全新的潜在靶点: 通过上调或模拟ANXA3功能来抑制病理性成纤维细胞活化。

然而, 本研究也存在局限。首先, 本研究主要从功能层面探讨了ANXA3对肺成纤维细胞活化、增殖及迁移的调控作用, 而对其具体的分子调控机制尚未进行系统性解析。肺纤维化的发生发展涉及TGF-β/Smad、PI3K/Akt、MAPK及Wnt/β-catenin等多条经典信号通路, ANXA3可能通过调控相关信号网络参与成纤维细胞活化过程。其次, 本研究主要基于基因敲减与过表达策略验证ANXA3在肺成纤维细胞活化中的功能作用, 尚未开展基于ANXA3特异性抑制剂的在体水平实验。最后, ANXA3与IPF患者临床病程的相关性也有待探索。未来研究中, 本课题组将继续系统探究ANXA3的下游调控通路及其分子作用网络, 更加全面地揭示ANXA3在肺纤维化中的作用机制, 并进一步完善其作为潜在治疗靶点的科学价值。

综上, ANXA3在肺纤维化中表达下调, 敲减ANXA3可以促进MRC-5细胞的活化与增殖, 而过表达ANXA3则可以显著改善由TGF-β1刺激所引发的MRC-5细胞的活化与纤维性变。本研究揭示了其对肺纤维化的调控作用, 提示靶向ANXA3可能成为干预肺纤维化进程的新策略。

作者贡献: 刘阳负责细胞及动物实验、数据分析及文章撰写工作; 牛知慧负责课题设计; 李玮参与部分动物实验; 高慧莹参与部分细胞实验及数据分析; 班涛负责课题设计与指导及论文审阅工作。

利益冲突: 本文所有作者声明不存在利益冲突关系。

References

[1] Yu G, Tzouvelekis A, Wang R, et al. Thyroid hormone inhibits lung fibrosis in mice by improving epithelial mitochondrial function [J]. Nat Med, 2018, 24: 39-49.

[2] She YX, Yu QY, Tang XX. Role of interleukins in the pathogenesis of pulmonary fibrosis [J]. Cell Death Discov, 2021, 7: 52.

[3] Prasad R, Gupta N, Singh A, et al. Diagnosis of idiopathic pulmonary fibrosis: Current issues [J]. Intractable Rare Dis Res, 2015, 4: 65-69.

[4] Hutchinson J, Fogarty A, Hubbard R, et al. Global incidence and mortality of idiopathic pulmonary fibrosis: A systematic review [J]. Eur Respir J, 2015, 46: 795-806.

[5] Kaul B, Lee JS, Zhang N, et al. Epidemiology of idiopathic pulmonary fibrosis among U. S. veterans, 2010-2019 [J]. Ann Am Thorac Soc, 2022, 19: 196-203.

[6] Zhao G, Lei S, Li Y, et al. Health-related quality of life and health state utility value in idiopathic pulmonary fibrosis: A systematic review and meta-analysis [J]. Health Qual Life Outcomes, 2025, 23: 3.

[7] Tahara M, Fujino Y, Yamasaki K, et al. Exposure to $PM_{2.5}$ is a risk factor for acute exacerbation of surgically diagnosed idiopathic pulmonary fibrosis: A case-control study [J]. Respir Res, 2021, 22: 80.

[8] Noble PW, Barkauskas CE, Jiang D. Pulmonary fibrosis: Patterns and perpetrators [J]. J Clin Invest, 2012, 122: 2756-2762.

[9] Kelly BG, Lok SS, Hasleton PS, et al. A rearranged form of Epstein-Barr virus DNA is associated with idiopathic pulmonary fibrosis [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2002, 166: 510-513.

[10] Yagihashi K, Huckleberry J, Colby TV, et al. Radiologic-pathologic discordance in biopsy-proven usual interstitial pneumonia [J]. Eur Respir J, 2016, 47: 1189-1197.

[11] Noble PW, Albera C, Bradford WZ, et al. Pirfenidone in patients with idiopathic pulmonary fibrosis (CAPACITY): Two randomised trials [J]. Lancet, 2011, 377: 1760-1769.

[12] Rangarajan S, Kurundkar A, Kurundkar D, et al. Novel mechanisms for the antifibrotic action of nintedanib [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2016, 54: 51-59.

[13] Riddell P, Kleinerova J, Eaton D, et al. Meaningful survival benefit for single lung transplantation in idiopathic pulmonary fibrosis patients over 65 years of age [J]. Eur Respir J, 2020, 56: 1902413.

[14] Feng M, He Y, Wang H. Role of the annexin A protein family in liver diseases: Insights and therapeutic opportunities [J]. Front

Pharmacol, 2025, 16: 1569927.

[15] Wang K, Zhang T, Lei Y, et al. Identification of ANXA2 (annexin A2) as a specific bleomycin target to induce pulmonary fibrosis by impeding TFEB-mediated autophagic flux [J]. Autophagy, 2018, 14: 269-282.

[16] Yan Z, Cheng X, Wang T, et al. Therapeutic potential for targeting annexin A1 in fibrotic diseases [J]. Genes Dis, 2022, 9: 1493-1505.

[17] Su J, Wang L, Guan X, et al. Knocking-down annexin A3 suppresses inflammation, oxidative stress, apoptosis, and endoplasmic reticulum stress to attenuate sepsis-induced acute kidney injury in HK2 cells [J]. Cytojournal, 2024, 21: 75.

[18] Chen Z, Ye L, Zhu M, et al. Multi-omics analysis identifies S100a10/ANXA2 complex within proximal tubule aggravates acute kidney injury through p-Stat3/Spp1 signaling [J]. Transl Res, 2025, 284: 57-68.

[19] Yu X, Tian W, Bao X, et al. Dissecting the liver inflammation ecosystem identifies annexin A1 as a pro-resolving target for liver failure [J]. Hepatology, 2026, 83: 1174-1191.

[20] Feng Y, Li W, Wang Z, et al. The p-STAT3/ANXA2 axis promotes caspase-1-mediated hepatocyte pyroptosis in non-alcoholic steatohepatitis [J]. J Transl Med, 2022, 20: 497.

[21] Xu F, Guo M, Huang W, et al. Annexin A5 regulates hepatic macrophage polarization *via* directly targeting PKM2 and ameliorates NASH [J]. Redox Biol, 2020, 36: 101634.

[22] Gerke V, Creutz CE, Moss SE. Annexins: Linking Ca^{2+} signalling to membrane dynamics [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2005, 6: 449-461.

[23] Xu L, Li W, Liu D, et al. ANXA3-rich exosomes derived from tumor-associated macrophages regulate ferroptosis and lymphatic metastasis of laryngeal squamous cell carcinoma [J]. Cancer Immunol Res, 2024, 12: 614-630.

[24] Chen Y, Di M, Tang Y, et al. Epstein-Barr virus causes vascular abnormalities in epithelial malignancies through upregulating ANXA3-HIF-1α-VEGF pathway [J]. Oncogene, 2024, 43: 2143-2159.

[25] Liang J, Zhang J, Fan J, et al. ANXA3 interference inactivates ERK/ELK1 pathway to mitigate inflammation and apoptosis in sepsis-associated acute lung injury [J]. Mol Immunol, 2024, 167: 25-33.

[26] Xing M, Liang S, Cao W, et al. Annexin A3 represses endothelial permeability and inflammation during sepsis *via* actin cytoskeleton modulation [J]. Adv Sci (Weinh), 2025, 12: e2416904.

[27] Lederer DJ, Martinez FJ. Idiopathic pulmonary fibrosis [J]. N Engl J Med, 2018, 378: 1811-1823.

[28] Wolters PJ, Collard HR, Jones KD. Pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis [J]. Annu Rev Pathol, 2014, 9: 157-179.

[29] Liu GY, Budinger GRS, Dematte JE. Advances in the management of idiopathic pulmonary fibrosis and progressive pulmonary fibrosis [J]. BMJ, 2022, 377: e066354.

[30] Wan X, Guo D, Zhu Q, et al. MicroRNA-382 suppresses the progression of pancreatic cancer through the PI3K/Akt signaling pathway by inhibition of ANXA3 [J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2020, 319: G309-G322.

[31] Walther A, Riehemann K, Gerke V. A novel ligand of the formyl peptide receptor: Annexin I regulates neutrophil extravasation by interacting with the FPR [J]. Mol Cell, 2000, 5: 831-840.

[32] Fassel H, Chen H, Ruisi M, et al. Reduced expression of annexin A2 is associated with impaired cell surface fibrinolysis and venous thromboembolism [J]. Blood, 2021, 137: 2221-2230.

[33] Huang B, Deora AB, He KL, et al. Hypoxia-inducible factor-1 drives annexin A2 system-mediated perivascular fibrin clearance in oxygen-induced retinopathy in mice [J]. Blood, 2011, 118: 2918-2929.

[34] Cederholm A, Frostegård J. Annexin A5 as a novel player in prevention of atherothrombosis in SLE and in the general population [J]. Ann N Y Acad Sci, 2007, 1108: 96-103.

[35] Li DQ, Lin M, Abdelrahman Z. High expression of the ANXA3 gene promotes immune infiltration and improves tumor prognosis in ovarian serous carcinoma using bioinformatics analyses [J]. Ann Transl Med, 2022, 10: 1055.

[36] Zhou T, Li Y, Yang L, et al. Silencing of ANXA3 expression by RNA interference inhibits the proliferation and invasion of breast cancer cells [J]. Oncol Rep, 2017, 37: 388-398.

[37] Du R, Liu B, Zhou L, et al. Downregulation of annexin A3 inhibits tumor metastasis and decreases drug resistance in breast cancer [J]. Cell Death Dis, 2018, 9: 126.

[38] Wan YCE, Liu J, Zhu L, et al. The H2BG53D oncohistone directly upregulates ANXA3 transcription and enhances cell migration in pancreatic ductal adenocarcinoma [J]. Signal Transduct Target Ther, 2020, 5: 106.

[39] Guo C, Li N, Dong C, et al. 33-kDa ANXA3 isoform contributes to hepatocarcinogenesis *via* modulating ERK, PI3K/Akt-HIF and intrinsic apoptosis pathways [J]. J Adv Res, 2021, 30: 85-102.

[40] Wang S, Zeng X, Gui P, et al. LncRNA EBLN3P facilitates osteosarcoma metastasis by enhancing annexin A3 mRNA stability and recruiting HuR [J]. Ann Surg Oncol, 2023, 30: 8690-8703.