DOI:10.16016/j.2097-0927.202203147

隐丹参酮减轻 LPS 诱导的 ARDS 小鼠早期肺纤维化及机制研究

张人子,李 晟,王导新 重庆 400010,重庆医科大学附属第二医院呼吸与危重症医学科

[摘要] **目的** 探讨隐丹参酮(cryptotanshinone,CTS)对脂多糖(lipopolysaccharide,LPS)诱导的急性呼吸窘迫综合征(acute respiratory distress syndrome,ARDS)小鼠的早期肺纤维化的影响及其可能的作用机制。**方法** 将 40 只 8 周龄雄性 C57BL/6J 小鼠随机分为正常组、模型组、处理组、CTS 组($n=10$)。模型组采用气管滴注 LPS(5 mg/kg)制备 ARDS 模型。处理组在 ARDS 建模前腹腔注射 CTS(60 mg/kg)预处理 3 d,建模后再连续予以 CTS 7 d。正常组和 CTS 组分别注射等体积的无菌磷酸盐缓冲液(phosphate-buffered saline,PBS)或 CTS。末次给药 24 h 后处死小鼠,取支气管肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid,BALF)及肺组织。通过 HE 染色、肺组织湿/干质量(wet-to-dry,W/D)比值、BALF 中蛋白浓度和总细胞计数评估肺组织损伤情况;采用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测 BALF 中炎症因子水平;通过 Masson 染色及羟脯氨酸(hydroxyproline ,HYP)含量检测评估肺组织纤维化程度;利用免疫组化染色或 Western blot 检测 VE-cadherin、CD31、波形蛋白(Vimentin)、α-平滑肌肌动蛋白(α-smooth muscle actin,α-SMA)的蛋白表达。**结果** 与正常组比较,模型组的肺组织 W/D、BALF 中总细胞数胞计数和蛋白浓度升高,BALF 中的 TGF-β1、TNF-α、IL-1β、IL-6 升高,IL-10 降低($P<0.05$),小鼠肺组织出现肺损伤和早期肺纤维化;HYP 含量升高($P<0.05$);Vimentin、α-SMA 的表达升高,而 VE-cadherin、CD31 的表达降低($P<0.05$)。与模型组比较,处理组的肺组织 W/D、BALF 中总细胞计数和蛋白浓度降低,BALF 中的 TGF-β1、TNF-α、IL-1β、IL-6 降低,IL-10 升高($P<0.05$);肺损伤和早期肺纤维化程度明显减轻,肺损伤评分和肺纤维化程度评分降低($P<0.05$);HYP 含量显著降低($P<0.05$);Vimentin、α-SMA 的表达降低,但 VE-cadherin、CD31 的表达增强($P<0.05$)。**结论** CTS 可能通过抑制 LPS 刺激后肺组织中的内皮间质转化(endothelial-to-mesenchymal transition,EndMT)过程从而减轻 ARDS 小鼠早期肺纤维化。

[关键词] 急性呼吸窘迫综合征;急性肺损伤;隐丹参酮;炎症;内皮间质转化
[中图法分类号] R285.5;R363.21;R563.8 [文献标志码] A

Effect and mechanism of cryptotanshinone on early pulmonary fibrosis in LPS-induced acute respiratory distress syndrome in mice

ZHANG Renzi, LI Sheng, WANG Daoxin Department of Respiratory and Critical Care Medicine, the Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400010, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effects and underlying mechanism of cryptotanshinone (CTS) on early pulmonary fibrosis in mice with lipopolysaccharide (LPS)-induced acute respiratory distress syndrome (ARDS). **Methods** Forty male C57BL/6J mice (8 weeks old) were randomly divided into control group, model group, treatment group, and CTS group, with 10 mice in each group. A ARDS model was established by intratracheal instillation of LPS (5 mg/kg). The mice in the treatment group was intraperitoneally pretreated with CTS (60 mg/kg) for 3 d before modeling, followed by CTS adminstion for 7 consecutive days. Similarly, the mice of the control and CTS groups were injected with an equivalent volume

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81670071)
[通信作者] 王导新,E-mail:wangdaoxin0163@163.com

2097-0927/Copyright © 2022, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

of sterile phosphate-buffered saline (PBS) or CTS, respectively. The mice were sacrificed in 24 h after the last challenge, and bronchoalveolar lavage fluid (BALF) and lung tissues were collected. The injury of lung was observed with HE staining, lung wet-to-dry (W/D) ratio, total protein concentration and total cell number in BALF. The levels of inflammatory cytokines in BALF were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The fibrosis of lung was characterized by Masson staining and content of hydroxyproline (HYP). The protein levels of VE-cadherin, CD31, Vimentin and α-smooth muscle actin (α-SMA) were detected by immunohistochemistry or Western blotting. **Results** Obviously increased lung W/D ratio and total protein concentration and total cell number in BALF, elevated contents of TNF-α, TGF-β1, IL-1β and IL-6 while reduced content of IL-10 in BALF were seen in the model group when compared with the control group ($P<0.05$). Compared with the model group, the treatment group had significantly decreased lung W/D ratio and total protein concentration and total cell number in BALF, down-regulated levels of IL-1β, IL-6, TNF-α and TGF-β1 and up-regulated level of IL-10 in BALF ($P<0.05$). In addition, CTS also ameliorated lung injury and early fibrosis, decreased lung injury and fibrosis score, and reduced HYP content in LPS-induced ARDS ($P<0.05$), up-regulated the VE-cadherin and CD31 levels, and suppressed the Vimentin and α-SMA levels ($P<0.05$). **Conclusion** CTS alleviates LPS-induced early pulmonary fibrosis in ARDS mice, and its underlying mechanism may be related to the inhibition of endothelial-to-mesenchymal transition (EndMT).

[**Key words**] acute respiratory distress syndrome; acute lung injury; cryptotanshinone; inflammation; endothelial-to-mesenchymal transition

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81670071). Corresponding author: WANG Daoxin, E-mail: wangdaoxin0163@163.com

急性呼吸窘迫综合征(acute respiratory distress syndrome,ARDS)是急性肺损伤最严重的阶段,其平均病死率为30%~40%[1-2]。在ARDS的晚期,持续性肺泡损伤、修复、重建和过度的细胞外基质沉积导致肺纤维化[3]。有研究表明肺纤维化的程度与ARDS的预后和死亡率密切相关[4-6]。此外,内皮功能障碍导致内皮细胞(endothelial cells,EC)损伤和血管生成受损,也被认为是ARDS发病机制中的重要致病机制。然而,导致纤维增生性ARDS的因素以及这种病理反应的潜在机制仍不清楚。内皮-间质转化(endothelial-to-mesenchymal transition,EndMT)是成纤维细胞的来源之一[7-8]。内皮细胞在此过程中其细胞骨架开始变化,细胞间黏附力下降,最终转化为梭型的成纤维细胞[9]。抑制EndMT、恢复EC功能,可有效缓解ARDS的发病进程。

隐丹参酮(cryptotanshinone,CTS)是从丹参根中提取的一种脂溶性化合物,不仅具有抗氧化、抗炎症和抗纤维化等多种药理活性[10],还能逆转上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition,EMT)过程[11]。EndMT早于EMT发生[12],我们推测CTS可以改善ARDS患者的早期肺纤维化。因此,本研究通过气管滴注脂多糖(lipopolysaccharide,LPS)制作ARDS小鼠模型,以验证CTS是否可通过EndMT减轻ARDS小鼠的早期肺纤维化。

1 材料与方法

1.1 实验动物分组及ARDS模型构建

8周龄SPF级雄性C57BL/6小鼠,体质量18~25 g,购自重庆医科大学实验动物中心。将C57BL/6J小鼠适应性喂养7 d后随机分为①正常组(Control):腹腔注射等量无菌磷酸盐缓冲液(phosphate-buffered saline,PBS);②模型组(LPS):气管滴注LPS(5 mg/kg)造模,7 d后处死小鼠;③处理组(CTS+LPS):LPS建模前腹腔注射CTS(60 mg/kg)预处理3 d,建模完成后连续予以7 d;④CTS组(CTS):腹腔注射等量CTS。每天记录1次每只小鼠的体质量及生存情况。末次给药24 h后处死小鼠,结束实验,并收集支气管肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid,BALF)和肺组织以备后续实验使用。

1.2 主要试剂

隐丹参酮购于美国Med Chem Express公司;脂多糖、BCA试剂盒、羟脯氨酸试剂盒购于北京索莱宝科技有限公司;SDS-PAGE凝胶配制试剂盒、极超敏ECL化学发光试剂盒购于上海碧云天生物技术有限公司;辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔IgG抗体购于武汉三鹰生物技术有限公司;甘油醛-3-磷酸脱氢

(GAPDH)抗体购于南京巴傲得生物科技有限公司;兔抗 CD31、波形蛋白(Vimentin)、α-平滑肌肌动蛋白(α-smooth muscle actin,α-SMA)购于美国 Cell Signaling Technology 公司;兔抗 VE-cadherin 购于美国 Invitrogen 公司。

1.3　肺组织病理学检查

末次给药 24 h 后,腹腔注射 1%戊巴比妥钠(50 mg/kg)麻醉小鼠,充分暴露胸腔,取各组右肺组织,利用 4%多聚甲醛固定 24 h 后包埋在石蜡中,肺组织切片后用 HE 和 Masson 染色,显微镜下观察肺组织的病理变化。参照肺损伤评分和肺纤维化评分标准进行评分[13-14]。

1.4　肺组织湿/干质量(wet-to-dry,W/D)比值

取小鼠右肺称取湿质量,然后将肺组织置于干燥箱中,60 ℃干燥 48 h,称取干质量。根据前后称量结果计算肺组织的 W/D。

1.5　BALF 中总细胞和蛋白浓度以及炎症相关细胞因子检测

经气管注射 1 mL 冰磷酸盐缓冲液(PBS)灌洗左肺,30 s 后缓慢回抽,重复 3 次,将收集到的 BALF,在 4 ℃下以 1 500 r/min 离心 15 min,留取 BALF 离心后的沉淀用于总细胞计数,上清分别应用 BCA 试剂盒检测蛋白浓度和 ELISA 试剂盒测定 BALF 上清中 TNF-α、IL-6、IL-1β、IL-10、TGF-β1 的含量。

1.6　羟脯氨酸(hydroxyproline,HYP)含量测定

将肺组织称重并尽量剪碎以便消化。严格按照试剂盒说明书操作,读取各孔 560 nm 波长处光密度值 $D(560)$,并通过公式计算出待测样品的含量。

1.7　免疫组化(immunocytochemistry,IHC)检测 EndMT 表达

取肺组织石蜡切片,脱蜡、水化、抗原修复、阻断内源性过氧化酶,一抗 4 ℃孵育过夜,二抗室温孵育 50 min,显色、复染、脱水、透明、封片,显微镜下观察,用 Image J 软件分析蛋白的相对表达量。

1.8　Western blot 检测 EndMT 标志蛋白表达

称取适量肺组织制备成组织匀浆,置于冰冷组织裂解液,在 4℃下以 12 000 r/min 离心 10 min,取上清液。采用 BCA 进行蛋白定量,调整蛋白浓度。配置浓缩胶和分离胶,电泳后转膜至 PVDF 膜,封闭 1 h。一抗 4 ℃孵育过夜,二抗常温孵育 1 h。超敏发光液显影曝光,Image J 软件系统对蛋白条带灰度值进行分析。

1.9　统计学方法

应用 GraphPad Prism 9.0 软件进行统计分析,数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,各组间的比较采用单因素方差分析,样本均数间的比较采用 LSD-t 检验。$P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

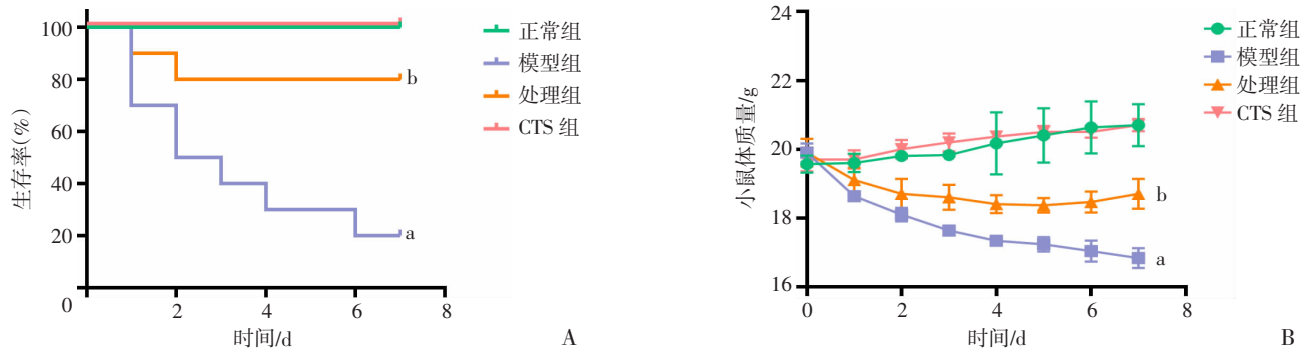
2　结果

2.1　CTS 对 ARDS 小鼠生存曲线及体质量变化的影响

与正常组比较,模型组小鼠的生存率和体质量均在气管滴注 LPS 后均明显下降($P<0.05$);与模型组比较,处理组小鼠的生存率和体质量均明显上升($P<0.05$)。见图 1。

2.2　CTS 对 ARDS 小鼠肺损伤的影响

正常组小鼠肺组织保持正常组织结构,未见明确炎症细胞浸润。与正常组比较,模型组小鼠肺组织大量炎性细胞浸润,肺泡结构广泛破坏,肺泡毛细血管充血扩张,小鼠肺损伤评分、肺组织 W/D、BALF 中细胞总数及蛋白浓度明显升高($P<0.05$);与模型组比较,处理组小鼠的肺组织病变较模型组明显减轻,肺泡结构有所恢复,炎症细胞浸润减少,小鼠肺损伤评分、肺组织 W/D、BALF 中细胞总数及蛋白浓度明显下降($P<0.05$)。见图 2。



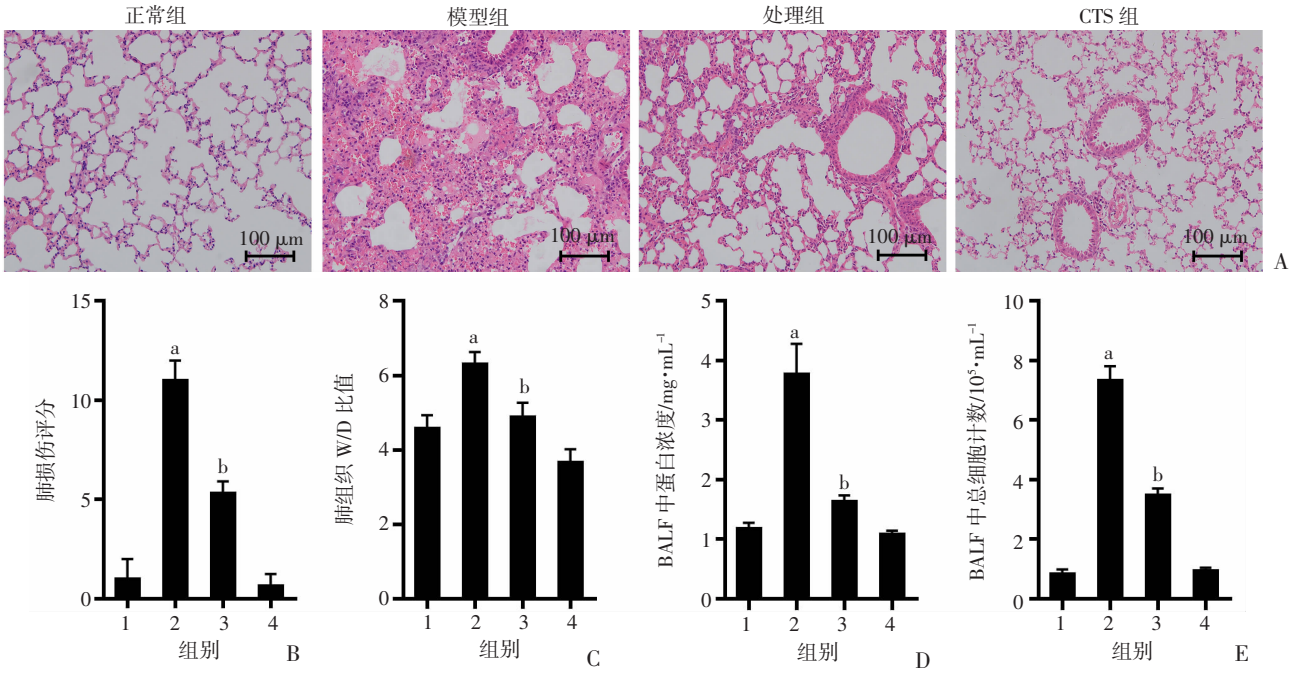
a:$P<0.05$,与正常组比较;b:$P<0.05$,与模型组比较

A:CTS 对 ARDS 小鼠生存率影响;B:CTS 对 ARDS 小鼠体质量影响

图 1　小鼠 7 d 生存率和体质量分析　($n=3,\bar{x}\pm s$)

2.3　CTS 对 ARDS 小鼠 BALF 中炎性细胞因子和促纤维化细胞因子的影响

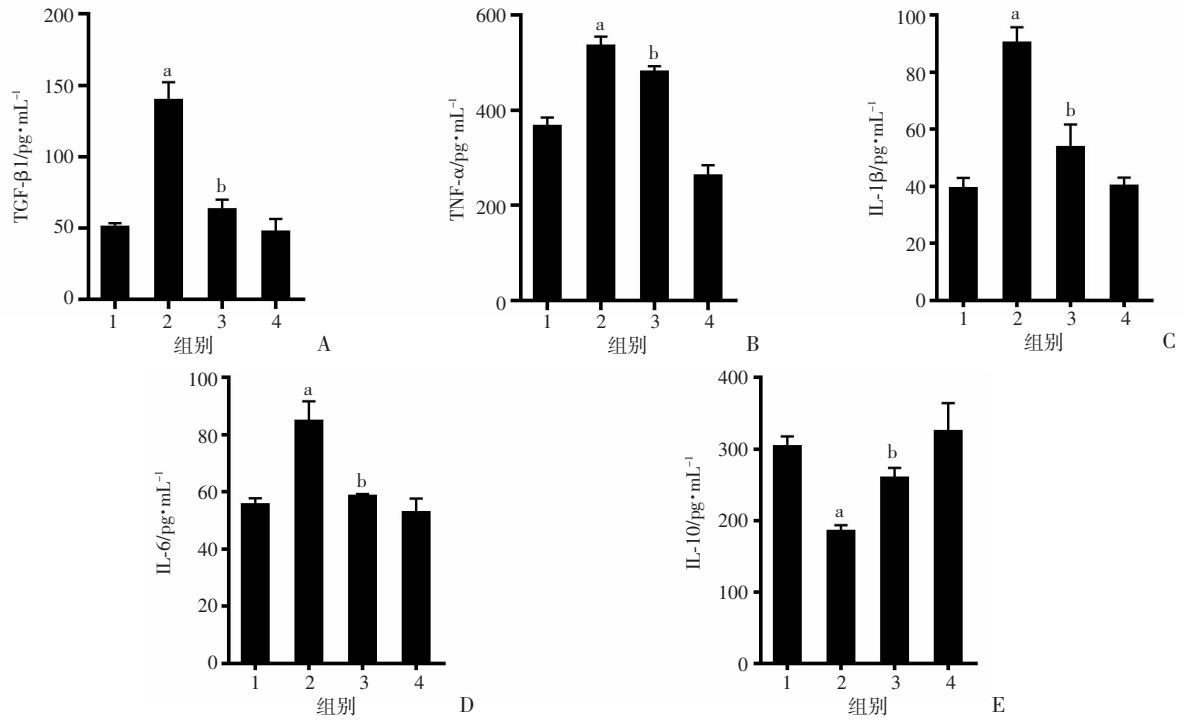
与正常组比较,模型组小鼠 BALF 中促炎因子(TNF-α、IL-6、IL-1β)和促纤维化因子 TGF-β1 分泌量显著升高,抗炎因子(IL-10)分泌量显著减少($P<0.05$);与模型组比较,处理组可明显降低促炎因子(TNF-α、IL-6、IL-1β)和促纤维化因子(TGF-β1),增加抗炎因子(IL-10)的分泌量($P<0.05$)。见图 3。



a:$P<0.05$,与正常组比较;b:$P<0.05$,与模型组比较;1:正常组;2:模型组;3:处理组;4:CTS 组

A:HE 染色观察肺组织病理学改变;B:肺损伤评分;C:肺组织 W/D 比值;D:BALF 中蛋白浓度;E:BALF 中总细胞计数

图 2　CTS 对 ARDS 小鼠肺损伤的影响　($n=3,\bar{x}\pm s$)



a:$P<0.05$,与正常组比较;b:$P<0.05$,与模型组比较;1:正常组;2:模型组;3:处理组;4:CTS 组

A:TGF-β1 水平;B:TNF-α 水平;C:IL-1β 水平;D:IL-6 水平;E:IL-10 水平

图 3　CTS 对 ARDS 小鼠 BALF 中炎症因子和促纤维化因子的影响　($n=3,\bar{x}\pm s$)

2.4　CTS 对 ARDS 小鼠早期肺纤维化的影响

正常组小鼠肺组织保持正常组织结构,未见纤维组织增生性改变。模型组可见纤维组织增生;处理组小鼠的肺组织未见纤维组织增生。见图 4A。

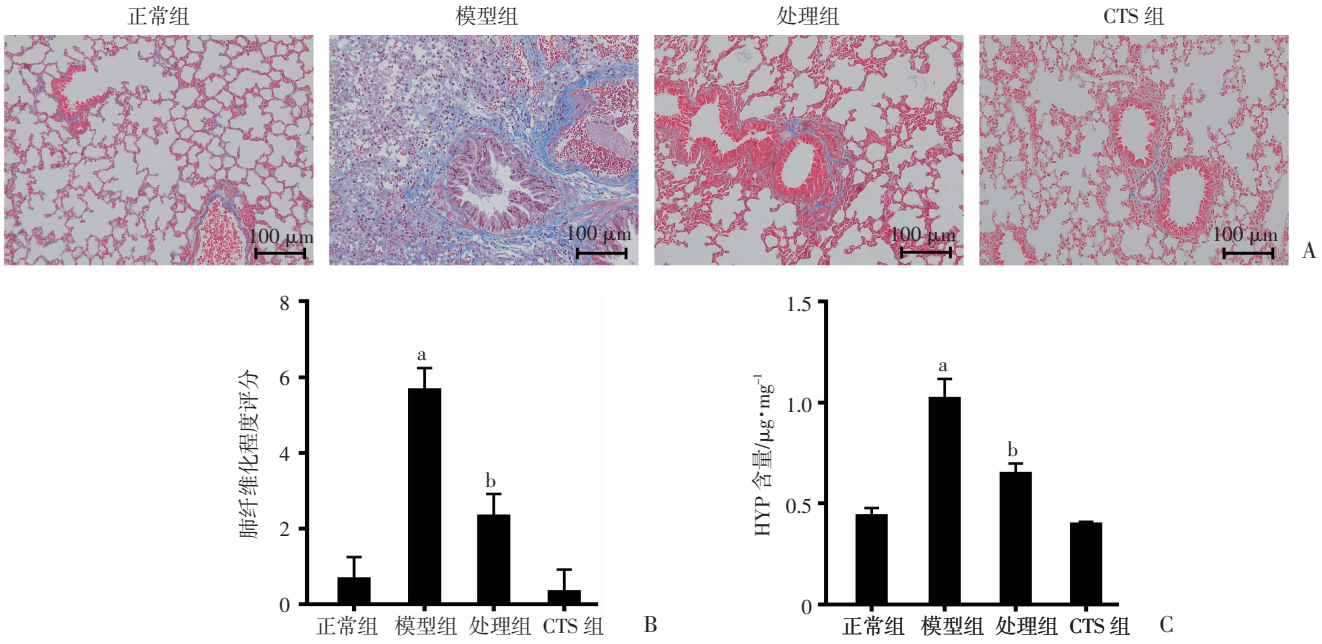
与正常组比较,模型组小鼠纤维化严重程度评分显著升高($P<0.05$);与模型组比较,处理组纤维化严重程度评分显著降低($P<0.05$)。见图 4B。

2.5　CTS 对 ARDS 小鼠肺组织 HYP 含量的影响

与正常组比较,模型组肺组织 HYP 水平均显著升高($P<0.05$);与模型组比较,处理组 HYP 水平均明显下降($P<0.05$)。见图 4C。

2.6　CTS 对 ARDS 小鼠肺组织中 CD31、α-SMA 蛋白表达的影响

与正常组比较,模型组小鼠肺组织中 CD31 阳性表达显著减弱,α-SMA 阳性表达显著增强($P<0.05$);与模型组比较,处理组 CD31 阳性表达出现上调,α-SMA 阳性表达出现下调($P<0.05$),见图 5。



a:$P<0.05$,与正常组比较;b:$P<0.05$,与模型组比较

A:Masson 染色观察小鼠肺组织病理学改变;B:肺纤维化程度评分;C:HYP 含量

图 4　CTS 对 ARDS 小鼠早期肺病理性纤维增生的影响　($n=3,\bar{x}\pm s$)

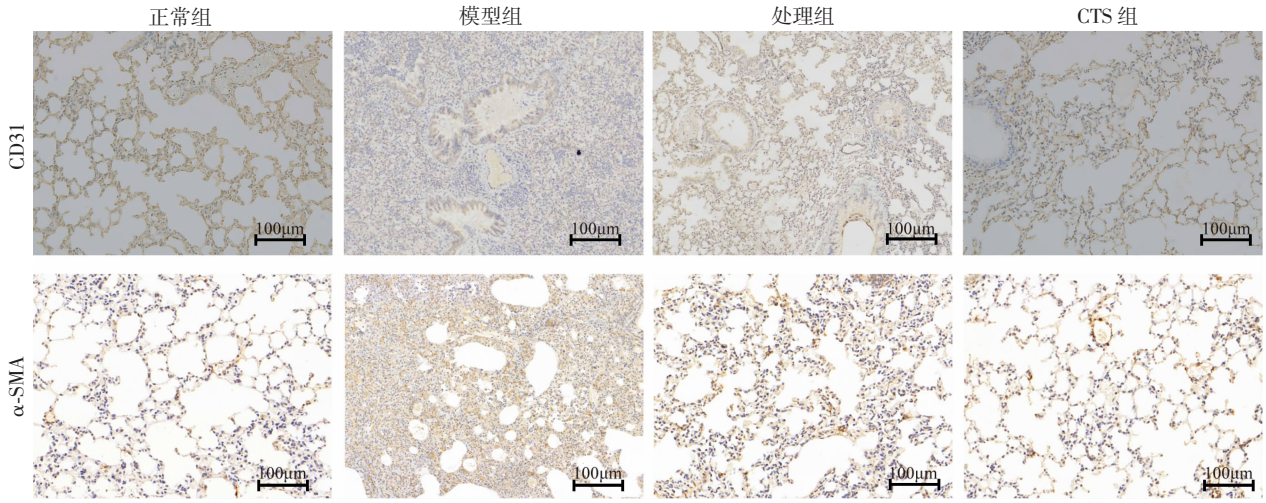
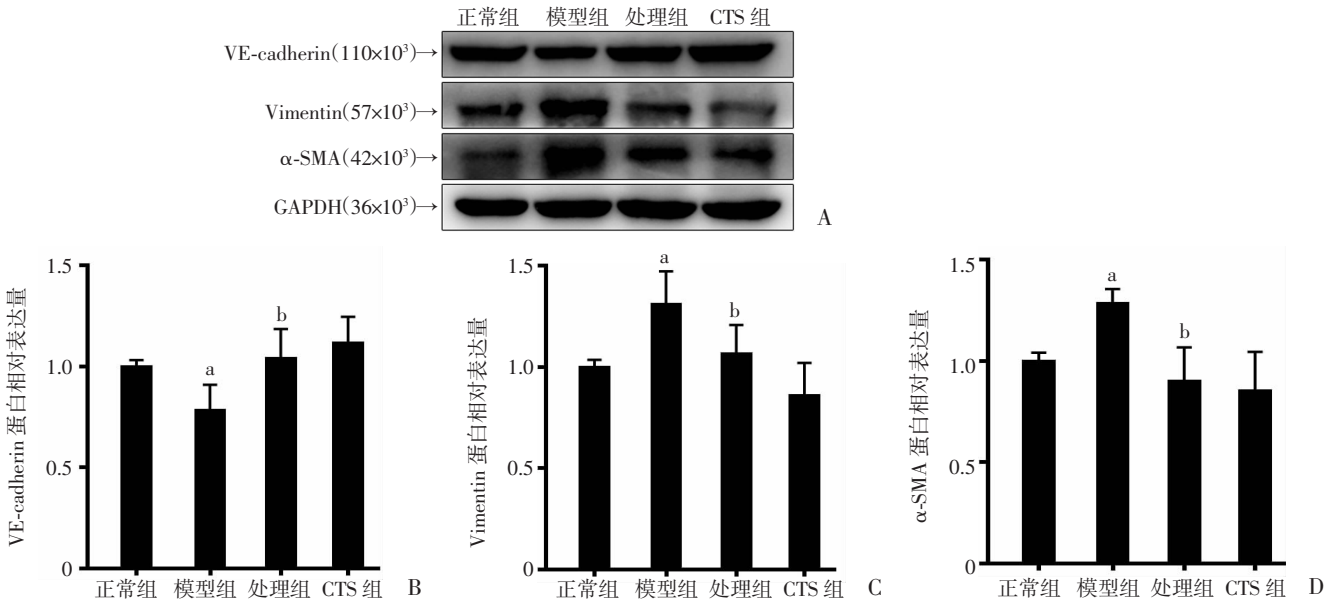


图 5　IHC 观察 CTS 对小鼠肺组织 CD31 和 α-SMA 表达的影响



a: $P<0.05$,与正常组比较;b: $P<0.05$,与 LPS 模型组比较

A:各组小鼠肺组织 Western blot 检测结果;B:VE-cadherin 蛋白相对表达量;C:Vimentin 蛋白相对表达量;D:α-SMA 蛋白相对表达量

图 6 隐丹参酮对内皮间质转化标志物相关蛋白的影响 ($n=3,\bar{x}\pm s$)

2.7 CTS 对 ARDS 小鼠肺组织中 VE-cadherin、Vimentin、α-SMA 蛋白表达的影响

与正常组比较,模型组小鼠肺组织中 Vimentin、α-SMA 蛋白水平均显著升高,VE-cadherin 蛋白水平显著降低($P<0.05$);与模型组比较,处理组均可明显抑制 Vimentin、α-SMA 蛋白水平的表达和减缓 VE-cadherin 蛋白水平的表达($P<0.05$),见图 6。

3 讨论

2019 冠状病毒疾病(Corona Virus Disease 2019,COVID-19)在全球范围内相继爆发,其感染人数不断上升,其中重症患者最终发展为 ARDS[15]。尽管许多患者在 ARDS 的急性病程中幸存下来,但仍有部分患者死于进行性肺纤维化[16]。此外,ARDS 患者早期出现肺纤维增生性改变已成为与患者预后不良、高死亡率和患者长期生命质量相关的关键因素[17]。然而,目前的研究中仍缺乏特异性治疗来减少 ARDS 肺部炎症反应和降低肺部病理性纤维化。

丹参及其有效成分在治疗间质性肺病方面已被广泛研究。例如,丹参酮ⅡA 可减少小鼠因脂多糖诱导引起的炎症反应和胶原沉积[18]。除此之外,丹酚酸 B 可阻断 TGF-β1 诱导的成纤维细胞增殖和肌成纤维细胞分化[2]。但丹参及其有效成分是否在 ARDS 中发挥治疗作用,尚未见报道。CTS 是从丹参根中提取的一种脂溶性化合物,在心血管疾病尤其是动脉粥样硬化[19]和心脏纤维化[20-21]中具有广泛的治疗作用。在本研究中,我们成功地在小鼠体内构建了 LPS 诱导的 ARDS 模型[22],在 LPS 诱导后,肺组织充满大量炎症细胞,纤维组织增生,W/D 重量比、BALF 中蛋白质浓度和总细胞计数以及促炎因子分泌增加,抗炎因子分泌减少。本研究结果中促纤维化因子的增加和各实验组羟脯氨酸(HYP)浓度的显著差异也表明 LPS 诱导小鼠 ARDS 后出现早期肺纤维化。我们的研究结果进一步表明,CTS 可以通过调节肺损伤、炎症反应、早期肺纤维化、羟脯氨酸(HYP)含量来改善 LPS 诱导的 ARDS。因此,CTS 对 ARDS 小鼠的炎症反应和早期肺纤维化具有一定的保护性作用。

ARDS 的致病特点是内皮异常激活和损伤[23]。在 ARDS 的早期,肺微血管内皮细胞首先受到影响。ARDS 的重要发病机制是内皮受损导致内皮修复和血管生成功能障碍[1]。新近研究认为 ARDS 急性病程中肺内皮细胞的抵抗力低于肺上皮细胞[24],并且肺内皮细胞是成纤维细胞的主要来源之一[25-26]。因此,我们认为在 ARDS 早期进行修复肺血管内皮功能障碍的治疗对患者而言更有价值。本研究结果表明,经 LPS 诱导后,小鼠内皮细胞标志物(CD31、VE-cadherin)水平显著降低,间质细胞标志物(Vimentin、α-SMA)水平升高;而 CTS 的治疗有效改善了这一过程,提示 CTS 可

以通过抑制 EndMT 过程以减轻 ARDS 后的肺纤维化。

综上所述,我们发现 ARDS 小鼠的体质量曲线和生存率在 CTS 治疗后有了显著的上升,其次 CTS 可以通过抑制 EndMT 过程减缓肺纤维化的进展,并显著降低 ARDS 小鼠早期的死亡率。这些发现可能为治疗 ARDS 和预防 ARDS 后早期肺纤维化提供新的治疗方法。

参考文献:

[1] MATTHAYM A, ZEMANS R L, ZIMMERMAN G A, *et al*. Acute respiratory distress syndrome[J]. Nat Rev Dis Primers, 2019, 5(1): 18. DOI: 10.1038/s41572-019-0069-0.

[2] LIUQ M, CHU H Y, MA Y Y, *et al*. Salvianolic acid B attenuates experimental pulmonary fibrosis through inhibition of the TGF-β signaling pathway[J]. Sci Rep, 2016, 6: 27610. DOI: 10.1038/srep27610.

[3] HAMACHER J, LUCAS R, LIJNENH R, *et al*. Tumor necrosis factor-alpha and angiostatin are mediators of endothelial cytotoxicity in bronchoalveolar lavages of patients with acute respiratory distress syndrome[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2002, 166(5): 651-656. DOI: 10.1164/rccm.2109004.

[4] RAGHU G, COLLARDH R, EGAN J J, *et al*. An official ATS/ERS/JRS/ALAT statement: idiopathic pulmonary fibrosis: evidence-based guidelines for diagnosis and management[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2011, 183(6): 788-824. DOI: 10.1164/rccm.2009-040GL.

[5] MARSHALL R, BELLINGAN G, LAURENT G. The acute respiratory distress syndrome: fibrosis in the fast lane[J]. Thorax, 1998, 53(10): 815-817. DOI: 10.1136/thx.53.10.815.

[6] DHAINAUTJ F, CHARPENTIER J, CHICHE J D. Transforming growth factor-beta: a mediator of cell regulation in acute respiratory distress syndrome[J]. Crit Care Med, 2003, 31(4 Suppl): S258-S264. DOI: 10.1097/01.CCM.0000057901.92381.75.

[7] MAN S, SANCHEZ DUFFHUES G, TEN DIJKE P, *et al*. The therapeutic potential of targeting the endothelial-to-mesenchymal transition[J]. Angiogenesis, 2019, 22(1): 3-13. DOI: 10.1007/s10456-018-9639-0.

[8] MAK X, LI C L, XU J B, *et al*. LncRNA Gm16410 regulates PM 2.5-induced lung endothelial-mesenchymal transition via the TGF-β1/Smad3/p-Smad3 pathway[J]. Ecotoxicol Environ Saf, 2020, 205: 111327. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2020.111327.

[9] SUZUKI T, TADA Y J, NISHIMURA R, *et al*. Endothelial-to-mesenchymal transition in lipopolysaccharide-induced acute lung injury drives a progenitor cell-like phenotype[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2016, 310(11): L1185-L1198. DOI: 10.1152/ajplung.00074.2016.

[10] TANG Y, CHENY L, CHU Z, *et al*. Protective effect of cryptotanshinone on lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice[J]. Eur J Pharmacol, 2014, 723: 494-500. DOI: 10.1016/j.ejphar.2013.10.019.

[11] ZHANG Q Y, GAN C L, LIU H Y, *et al*. Cryptotanshinone reverses the epithelial-mesenchymal transformation process and attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis[J]. Phytother Res, 2020, 34(10): 2685-2696. DOI: 10.1002/ptr.6699.

[12] ZHAO J L, PATEL J, KAUR S, *et al*. Sox9 and Rbpj differentially regulate endothelial to mesenchymal transition and wound scarring in murine endovascular progenitors[J]. Nat Commun, 2021, 12(1): 2564. DOI: 10.1038/s41467-021-22717-9.

[13] LIU D, ZENGB X, ZHANG S H, *et al*. Rosiglitazone, a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist, reduces acute lung injury in endotoxemic rats[J]. Crit Care Med, 2005, 33(10): 2309-2316. DOI: 10.1097/01.ccm.0000183161.81503.7d.

[14] ASHCROFT T, SIMPSONJ M, TIMBRELL V. Simple method of estimating severity of pulmonary fibrosis on a numerical scale[J]. J Clin Pathol, 1988, 41(4): 467-470. DOI: 10.1136/jcp.41.4.467.

[15] BONAVENTURA A, VECCHIÉ A, DAGNA L, *et al*. Endothelial dysfunction and immunothrombosis as key pathogenic mechanisms in COVID-19[J]. Nat Rev Immunol, 2021, 21(5): 319-329. DOI: 10.1038/s41577-021-00536-9.

[16] GEORGEP M, WELLS A U, JENKINS R G. Pulmonary fibrosis and COVID-19: the potential role for antifibrotic therapy[J]. Lancet Respir Med, 2020, 8(8): 807-815. DOI: 10.1016/S2213-2600(20)30225-3.

[17] BURNHAME L, JANSSEN W J, RICHES D W H, *et al*. The fibroproliferative response in acute respiratory distress syndrome: mechanisms and clinical significance[J]. Eur Respir J, 2014, 43(1): 276-285. DOI: 10.1183/09031936.00196412.

[18] LI J, ZHENG Y, LI M X, *et al*. Tanshinone IIA alleviates lipopolysaccharide-induced acute lung injury by downregulating TRPM7 and pro-inflammatory factors[J]. J Cell Mol Med, 2018, 22(1): 646-654. DOI: 10.1111/jcmm.13350.

(下转 1834 页)

Biol, 2021, 40(1): 406-413. DOI: 10.13417/j.gab.040.000406.

[17] 刘芳, 杨晓兰, 廖飞. GSTM 潜抑制剂双依他尼酰乙二胺对人耐顺铂卵巢癌细胞 COC1/DDP 的抗肿瘤活性[J]. 基因组学与应用生物学, 2016, 35(6): 1266-1271. DOI: 10.13417/j.gab.035.001266.
LIU F, YANG X L, LIAO F. Anti-tumor activity of short divalent ethacrynic amide on human ovarian cancer cell line COC_1/DDP[J]. Genom Appl Biol, 2016, 35(6): 1266-1271. DOI: 10.13417/j.gab.035.001266.

[18] HOU J F, LIU F X, WU N, *et al*. Efficient biodegradation of chlorophenols in aqueous phase by magnetically immobilized aniline-degrading *Rhodococcus rhodochrous* strain[J]. J Nanobiotechnology, 2016, 14: 5. DOI: 10.1186/s12951-016-0158-0.

[19] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Anal Biochem, 1976, 72: 248-254. DOI: 10.1006/abio.1976.9999.

[20] HABIG W H, PABST M J, JAKOBY W B. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation[J]. J Biol Chem, 1974, 249(22): 7130-7139.

[21] LIAO F, LI J C, KANG G F, *et al*. Measurement of mouse liver glutathione S-transferase activity by the integrated method[J]. J Med Coll PLA, 2003, 18(5): 295-300.

[22] YANG X L, DU Z Y, PU J, *et al*. Classification of difference between inhibition constants of an inhibitor to facilitate identifying the inhibition type[J]. J Enzyme Inhib Med Chem, 2013, 28(1): 205-213. DOI: 10.3109/147563 66.2011.645240.

[23] 许金钩, 王尊本. 荧光分析法[M]. 第 3 版. 北京: 科学出版社, 2006: 68-69.
XU J G, WANG Z B. Fluorescence analysis[M]. 3rd ed. Beijing: Science Press, 2006: 68-69.

[24] XU B T, TONG T T, WANG X, *et al*. Short divalent ethacrynic amides as pro-inhibitors of glutathione S-transferase isozyme Mu and potent sensitisers of cisplatin-resistant ovarian cancers[J]. J Enzyme Inhib Med Chem, 2022, 37(1): 728-742. DOI: 10.1080/14756366.2022.2038591.

(收稿:2022-04-19;修回:2022-05-20)
(编辑 张艺霖)

(上接 1825 页)

[19] LIU Z P, XU S W, HUANG X Y, *et al*. Cryptotanshinone, an orally bioactive herbal compound from Danshen, attenuates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice: role of lectin-like oxidized LDL receptor-1 (LOX-1)[J]. Br J Pharmacol, 2015, 172(23): 5661-5675. DOI: 10.1111/bph.13068.

[20] LO S H, HSU C T, NIU H S, *et al*. Cryptotanshinone inhibits STAT3 signaling to alleviate cardiac fibrosis in type 1-like diabetic rats[J]. Phytother Res, 2017, 31(4): 638-646. DOI: 10.1002/ptr.5777.

[21] MA Y Z, LI H, YUE Z B, *et al*. Cryptotanshinone attenuates cardiac fibrosis *via* downregulation of COX-2, NOX-2, and NOX-4[J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2014, 64(1): 28-37. DOI: 10.1097/FJC.0000000000000086.

[22] GOODMANR B, PUGIN J, LEE J S, *et al*. Cytokine-mediated inflammation in acute lung injury[J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2003, 14(6): 523-535. DOI: 10.1016/S1359-6101(03)00059-5.

[23] ORFANOSS E, MAVROMMATI I, KOROVESI I, *et al*. Pulmonary endothelium in acute lung injury: from basic science to the critically ill[J]. Intens Care Med, 2004, 30(9): 1702-1714. DOI: 10.1007/s00134-004-2370-x.

[24] WIENER-KRONISHJ P, ALBERTINE K H, MATTHAY M A. Differential responses of the endothelial and epithelial barriers of the lung in sheep to *Escherichia coli* endotoxin[J]. J Clin Invest, 1991, 88(3): 864-875. DOI: 10.1172/JCI115388.

[25] HASHIMOTO N, PHANS H, IMAIZUMI K, *et al*. Endothelial-mesenchymal transition in bleomycin-induced pulmonary fibrosis[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2010, 43(2): 161-172. DOI: 10.1165/rcmb.2009-0031OC

[26] SOHALS S. Endothelial to mesenchymal transition (End-MT): an active process in chronic obstructive pulmonary disease (COPD)?[J]. Respir Res, 2016, 17: 20. DOI: 10.1186/s12931-016-0337-4.

(收稿:2022-03-17;修回:2022-04-26)
(编辑 栾 嘉)