



中国比较医学杂志
Chinese Journal of Comparative Medicine
ISSN 1671-7856, CN 11-4822/R

《中国比较医学杂志》网络首发论文

题目: VEGF 介导 p38 MAPK 通路重塑肺泡壁的机制研究
作者: 徐芳菲, 邹慧娟, 吴嘉莉, 艾凌云, 易丽君
收稿日期: 2025-10-17
网络首发日期: 2026-07-07
引用格式: 徐芳菲, 邹慧娟, 吴嘉莉, 艾凌云, 易丽君. VEGF 介导 p38 MAPK 通路重塑肺泡壁的机制研究[J/OL]. 中国比较医学杂志.
<https://link.cnki.net/urlid/11.4822.R.20260707.1405.002>



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。

VEGF 介导 p38 MAPK 通路重塑肺泡壁的机制研究

徐芳菲, 邹慧娟[✉], 吴嘉莉, 艾凌云, 易丽君

(江西省儿童医院, 江西省南昌市, 330018)

摘要 目的 本研究旨在探讨血管内皮生长因子 (VEGF) 通过 p38 丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 信号通路介导的肺泡壁重塑机制, 以揭示其在肺部疾病中的潜在作用。方法 使用不同浓度 VEGF (2.5、5、10、20、40 ng/mL) 处理人肺泡上皮 HPAEpiC 细胞。CCK-8 检测细胞活力, 免疫荧光检测细胞凋亡及细胞外基质 (ECM) 蛋白水平, RT-qPCR 分析 p38 MAPK、ERK 及 JNK mRNA 水平。采用博来霉素构建小鼠纤维化模型, 在此基础上使用 VEGF 处理。检测小鼠肺组织羟脯氨酸含量, HE 和 Masson 染色观察肺组织结构, Western blot 分析 p38 MAPK、ERK 及 JNK 蛋白水平。结果 在细胞实验中, 中、高剂量 VEGF 处理可显著抑制 HPAEpiC 细胞活力 ($P<0.01$, $P<0.001$); 低、中、高剂量 VEGF 处理后, HPAEpiC 细胞 Caspase-3 蛋白表达显著上升 ($P<0.05$, $P<0.05$, $P<0.001$), Collagen 蛋白表达显著上升 ($P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.001$), Elastin 蛋白表达显著上升 ($P<0.05$, $P<0.001$, $P<0.001$), 而 E-cadherin 蛋白表达显著下降 ($P<0.05$, $P<0.001$, $P<0.001$), 在高剂量 VEGF 处理基础上, 使用 p38 MAPK 通路抑制剂干预后, 细胞 Caspase-3、Collagen、Elastin 蛋白表达显著降低 ($P<0.001$, $P<0.001$, $P<0.001$), E-cadherin 蛋白表达显著增加 ($P<0.01$); 低、中、高剂量 VEGF 干预均能够上调细胞 p38 MAPK、ERK、JNK mRNA 水平 ($P<0.05$, $P<0.001$, $P<0.001$), p38 MAPK 通路抑制剂干预则可以下调 p38 MAPK、ERK、JNK mRNA 表达 ($P<0.001$, $P<0.001$, $P<0.001$)。在小鼠实验中, VEGF 处理可加重小鼠肺纤维化程度, 显著提高羟脯氨酸含量 ($P<0.001$), p38 MAPK 通路抑制剂显著降低羟脯氨酸含量 ($P<0.01$); VEGF 干预还能够提升小鼠肺组织 p-p38 MAPK、ERK 及 JNK 蛋白表达 ($P<0.01$, $P<0.01$, $P<0.05$), p38 MAPK 通路抑制剂则抑制 p-p38 MAPK、ERK 及 JNK 蛋白表达 ($P<0.01$, $P<0.05$, $P<0.05$)。结论 VEGF 可能通过激活 p38 MAPK 信号通路的表达调控肺泡壁中 ECM 蛋白的合成, 促进肺泡壁的重塑。

关键词 VEGF; p38 MAPK 通路; 肺泡壁重塑

中图分类号 R563.8; R322.3; R364.5

文献标志码 A

Mechanism of VEGF-mediated p38 MAPK pathway remodeling of the alveolar wall

XU Fangfei, ZOU Huijuan[✉], WU Jiali, AI Lingyun, YI Lijun

(Jiangxi Provincial Children's Hospital, Nanchang 330018, China)

Abstract Objective To explore the mechanism by which vascular endothelial growth factor (VEGF) mediates alveolar wall remodeling through the p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathway and to determine its potential role in lung diseases. Methods Human pulmonary alveolar epithelial cells (HPAEpiCs) were treated with different doses of VEGF (2.5, 5, 10, 20, and 40 ng/mL). Cell viability was assessed using the CCK-8 assay. Cell apoptosis and extracellular matrix protein levels were detected by immunofluorescence. The mRNA levels of p38 MAPK, ERK, and JNK were analyzed by reverse transcription-quantitative PCR. A mouse model of pulmonary fibrosis was established using bleomycin, and the mice were subsequently treated with VEGF. The hydroxyproline content in lung tissues was measured, lung tissue structure was observed using H&E and Masson's staining, and the protein levels of p38 MAPK, ERK, and JNK were analyzed by Western blot. Results In the cell experiments, medium and high doses of VEGF treatment significantly inhibited the viability of HPAEpiC cells ($P<0.01$, $P<0.001$); after low, medium, and high doses of VEGF treatment, the expression of Caspase-3 protein in HPAEpiC cells significantly increased ($P<0.05$, $P<0.05$, $P<0.001$), the expression of Collagen protein significantly increased ($P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.001$), the expression of Elastin protein significantly increased ($P<0.05$, $P<0.001$, $P<0.001$),

while the expression of E-cadherin protein significantly decreased ($P<0.05$, $P<0.001$, $P<0.001$). After high-dose VEGF treatment, the intervention with p38 MAPK pathway inhibitor significantly reduced the expression of Caspase-3, Collagen, and Elastin proteins ($P<0.001$, $P<0.001$, $P<0.001$), and the expression of E-cadherin protein significantly increased ($P<0.01$); low, medium, and high doses of VEGF intervention could all up-regulate the mRNA levels of p38 MAPK, ERK, and JNK in cells ($P<0.05$, $P<0.001$, $P<0.001$), while the intervention with p38 MAPK pathway inhibitor could down-regulate the mRNA expression of p38 MAPK, ERK, and JNK ($P<0.001$, $P<0.001$, $P<0.001$). In the mouse experiments, VEGF treatment could aggravate the degree of pulmonary fibrosis in mice and significantly increase the content of hydroxyproline ($P<0.001$), while the p38 MAPK pathway inhibitor significantly reduced the content of hydroxyproline ($P<0.01$); VEGF intervention could also enhance the protein expression of p-p38 MAPK, ERK, and JNK in mouse lung tissue ($P<0.01$, $P<0.01$, $P<0.05$), and the p38 MAPK pathway inhibitor could inhibit the protein expression of p-p38 MAPK, ERK, and JNK ($P<0.01$, $P<0.05$, $P<0.05$). Conclusions VEGF may regulate the synthesis of extracellular matrix proteins in alveolar walls and promote alveolar wall remodeling by activating the p38 MAPK signaling pathway.

Key words VEGF; p38 MAPK pathway; alveolar wall remodeling

肺泡壁重塑是指在病理状态下, 肺泡壁的结构和功能发生变化。这一过程包括肺泡上皮细胞的损伤、细胞外基质 (extracellular matrix protein, ECM) 的异常沉积、基质金属蛋白酶活性的改变以及成纤维细胞的激活和转化, 最终导致肺泡壁的增厚、弹性降低和气体交换功能的障碍^[1]。血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 是调控内皮细胞功能的重要因子, 广泛表达在血管丰富的组织与器官中, 在肺中浓度较高, 由气道微血管附近的细胞分泌, 对于肺泡结构的维持具有关键作用^[2]。VEGF 可参与气道慢性炎症反应过程, 其水平降低可导致肺部微血管与肺泡壁被破坏^[3]。有研究认为, 在慢性阻塞性肺疾病等慢性气道炎症性疾病的发生、发展过程中均有 VEGF 参与^[4]。还有研究表明, VEGF 及其受体的表达失调可能导致肺细胞凋亡, 同时增加肺气肿的发生率^[5]。

丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 是介导细胞反应的重要信号系统, 通过传递细胞外信号来调节不同的细胞活动, 包括细胞增殖、凋亡和迁移等过程^[6]。研究表明, MAPK 信号活化与肺功能损害程度及肺泡壁炎症相关^[7]。MAPK 通路主要包括 p38 MAPK、胞外信号调节激酶 (extracellular regulated protein kinase, ERK)、c-Jun 氨基末端激酶 (c-Jun N-terminal kinase, JNK) 几个亚族^[8]。p38 MAPK 是 MAPK 通路中研究最广泛的亚型, 外界有毒物质的刺激能够激活 p38 MAPK 信号通路, 损伤气道上皮细胞及上皮屏障功能^[9]。研究显示, 香烟烟雾提取物能够诱导肺泡上皮细胞凋亡, 同时提升细胞中 MAPK 信号通路相关因子的磷酸化水平, 表明 MAPK 通路的激活可能在细胞凋亡的调控中起关键作用^[10]。此外, 本团队前期研究已证实, VEGF 能够介导 p38 MAPK 通路在慢性高氧肺损伤早产大鼠中的激活, 提示 VEGF 及 p38 MAPK 通路在肺泡壁重塑中具有重要影响^[11]。

因此, 本研究旨在探讨 VEGF 介导 p38 MAPK 信号通路在肺泡壁重塑中的作用及机制。通过本研究, 期望能够为肺部疾病提供新的病理机制视角, 并为潜在的治疗靶点提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

8 周龄雄性 SPF 级 C57BL/6 小鼠 40 只, 体质量 18~20 g, 购自武汉华联科生物技术有限公司 [SCXK(鄂)2023-0033]。饲养于武汉贝赛模式生物科技有限公司 [SYXK(鄂)2023-0003], 维持温度 22~24 °C、湿度 50%~60%、12 h/12 h 光/暗交替环境。实验方案通过江西省儿童医院动物伦理委员会审核 (HLK-20230118-001)。实验过程中严格遵循 3R 原则, 对实验操作与饲养管理均进行优化, 实验操作前对操作人员进行专业培训, 饲养环境符合 SPF 级标准。

1.1.2 细胞

人肺泡上皮 HPAEpiC 细胞购自美国 ATCC, 批号: YS1744C。

1.2 主要试剂与仪器

VEGF、E-钙黏蛋白 (epithelial cadherin, E-cadherin)、Elastin、Collagen、半胱氨酸蛋白酶 3

(cysteine-dependent aspartate-specific protease-3, Caspase-3)、ERK、JNK、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)抗体购自英国 Abcam 贸易有限公司(批号: ab32152、ab231303、ab21610、ab184996、ab184787、ab184699、ab179461、ab6276); 博来霉素(bleomycin, BLM)购自 Selleck(批号: S121422); 转化生长因子- β 1(transforming growth factor-beta 1, TGF- β 1)和地塞米松(dexamethasone, DEX)购自美国 MedChemExpress 生物科技公司,(批号: 252971、HY-14648); SB203580(p38 MAPK 通路抑制剂)购自上海 Selleck 生物科技公司(批号: S107611); DMEM 培养基、青霉素-链霉素购自美国 Gibco 生物技术公司(批号: 8123646、15140-122); PBS 购自大连美仑生物技术有限公司(批号: MA0015); Masson 染液套装、牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)购自北京索莱宝科技有限公司(批号: 6002003-2、1218Q0525); DAPI 染色液、BCA 蛋白试剂盒、CCK-8 试剂盒、4%多聚甲醛、RIPA 裂解液购自上海碧云天生物技术有限公司(批号: 061819191015、P0010、C0037、P0099、P0013); Trizol 试剂购自美国 Thermo Fisher 科技公司(批号: 15596018); RNA 逆转录试剂盒、qPCR 试剂盒购自日本 Takara 生物工程株式会社(批号: RR036A、RR420A); 羟脯氨酸检测试剂盒购自上海茁彩生物技术有限公司(批号: ZC-S0383); p-p38 MAPK 抗体购自美国 Cell Signaling Technology 生物科技公司(批号: 4511T)。

HERAcell 150i CO₂ 培养箱、NanoDrop 2000 超微量分光光度计、QuantStudio 5qPCR 仪购自美国 Thermo Scientific 科技公司; BD FACSVerse 流式细胞仪和 Synergy H1 酶标仪购自美国 BioTek 仪器有限公司; IX83 倒置荧光显微镜购自 Olympus; Mini-PROTEAN Tetra Western blot 电泳系统购自中国伯乐生命医学产品(上海)有限公司; 5200T Western blot 成像仪购自中国上海天能科技有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 动物培养与分组

40 只 C57BL/6 雄性小鼠随机分为 5 组, 每组各 8 只, 分别为对照 1 组、博来霉素组、地塞米松组、血管内皮生长因子(VEGF)组和丝裂原活化蛋白激酶抑制剂(MAPK inhibitor)组。除对照 1 组外, 剩余小鼠进行肺纤维化造模。将小鼠用戊巴比妥钠麻醉后, 通过气管内注射 5 mg/kg 博来霉素建立肺纤维化模型^[12]。造模后, 地塞米松组予地塞米松混悬液 5 mg/kg 腹腔注射^[13], 丝裂原活化蛋白激酶抑制剂组给予 1 mg/kg SB203580 灌胃^[14]。VEGF 在小鼠体内的循环生理浓度通常为 50~400 pg/mL^[15,16]。基于 100 ng VEGF 处理小鼠时, 其 24 h 内血药浓度高于正常生理状态, 且在 24 h 时能够代谢至正常水平, 本研究选择对 VEGF 组小鼠给予每天 2 mL、100 ng/d VEGF 灌胃。对照 1 组、博来霉素组每天灌胃等体积 0.9%氯化钠溶液, 每天给药 1 次, 持续 1 周。1 周后处死小鼠, 取其肺组织用于后续实验。

1.3.2 CCK-8 实验

设置浓度分别为 0、2.5、5、10、20、40 ng/mL 的血管内皮生长因子组, 筛选在后续实验中使用的 VEGF 的低、中、高剂量。取对数生长期 HPAEpiC 细胞, 经胰蛋白酶消化离心后用 DMEM 培养基调整细胞密度为 1×10^4 /mL, 接种于 96 孔板, 每孔 100 μ L, 每组实验设置 8 个复孔, 常规培养 24 h。分别向各孔加入药物, 对照组分别加入等量的 DMEM 培养基。药物干预 24 h 后, 根据 CCK-8 试剂盒说明书, 每孔中各添加 10 μ L CCK-8 试剂后于 37 $^{\circ}$ C 培养箱中孵育 1 h, 利用酶标仪记录各孔细胞在 450 nm 波长处的吸光度值, 计算细胞存活率。

1.3.3 细胞培养及分组

HPAEpiC 细胞株用含有 10% FBS 和 1%青霉素-链霉素的 DMEM 培养基, 于 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 下中培养并传代, 待细胞处于对数生长期进行后续实验。待细胞贴壁后, 将细胞分为对照 2 组、模型组、血管内皮生长因子低剂量(VEGF-L)组、血管内皮生长因子中剂量(VEGF-M)组、血管内皮生长因子高剂量(VEGF-H)组、血管内皮生长因子+抑制剂(VEGF-I)组。除对照 2 组以外的细胞, 采用 5 μ g/mL 博来霉素处理 48 h 构建模型^[17]。选择 10 ng/mL VEGF 作为低剂量, 20 ng/mL VEGF 作为中剂量, 40 ng/mL VEGF 作为高剂量, VEGF+抑制剂组则采用 40 ng/mL VEGF+10 μ mol/L

SB203580 处理^[18]，并于培养箱中孵育 48 h。

1.3.4 免疫荧光实验检测 HPAEpiC 细胞凋亡蛋白及 ECM 蛋白的表达情况

将 HPAEpiC 细胞以 2×10^4 /孔接种至 24 孔板，按 1.3.2 分组干预 24 h，经 4% 多聚甲醛固定后，每孔加入 200 μ L 0.2% Triton X-100 溶液进行细胞透化，使用 BSA 室温下封闭 1 h，分别加入 E-cadherin、Elastin、Collagen 及 Caspase-3 一抗（稀释比 1: 1 000），4 $^{\circ}$ C 孵育过夜；次日 PBS 清洗 3 次后加入 FITC 标记山羊抗兔 IgG（稀释比 1: 1 000）避光孵育 1 h，PBS 清洗后加入 DAPI，避光孵育 2 min，PBS 清洗 3 次，滴加荧光淬灭剂，倒置荧光显微镜下观察。

1.3.5 RT-qPCR 实验检测 HPAEpiC 细胞中 MAPK 信号通路相关基因的表达水平

使用 Trizol 试剂提取各组细胞中总 RNA，随后按照反转录试剂盒操作说明反转录合成 cDNA，以 cDNA 为模板，加入相应引物，使用 Fast Start Universal SYBR Green Master (Rox) 试剂盒进行 *p38 MAPK*、*ERK*、*JNK* 和 β -actin 基因的扩增。每个样本重复 3 次。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法对目标基因表达水平进行相对定量分析。引物由北京天一辉远科技有限公司合成，具体引物序列见表 1。

表1 引物序列
Table 1 Primer sequence

基因 Gene	引物序列 Primer sequence	长度/bp Length/bp	编号 No.
<i>p38 MAPK</i>	F: 5'-CGAAATGACCGGCTACGTGG-3' R: 5'-CACTTCATCGTAGGTCAGGC-3'	505	NM_001168513.1
<i>ERK</i>	F: 5'-TCCGCCATGAGAATGTTATAGGC-3' R: 5'-GGTGTGATAAGCAGATTGG-3'	245	NM_011952.2
<i>JNK</i>	F: 5'-ACGACCTTCTACGACGATGC-3' R: 5'-GGGTCGGTGTAGTGGTGATG-3'	262	NM_010591.2
β -actin	F: 5'-CTGTCCCTGTATGCCTCTG-3' R: 5'-ATGTCACGCACGATTCC-3'	218	NM_007393.5

1.3.6 小鼠肺组织 HE、Masson 染色

取小鼠肺组织，经 4% 多聚甲醛固定 24 h，制作石蜡切片。切片经二甲苯脱蜡，梯度乙醇溶液水化后，分别进行 HE 和 Masson 染色，显微镜下观察肺泡结构及胶原蛋白沉积情况。

1.3.7 Western blot 实验检测小鼠肺组织 MAPK 信号通路相关蛋白的表达水平

RIPA 裂解液提取小鼠肺组织中蛋白，用 BCA 法测定蛋白浓度。利用 SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白，将分离的蛋白转移至 PVDF 膜上，使用 BSA 封闭，TBST 洗 4 次，每次 5 min。分别加入 p-p38 MAPK、ERK、JNK、GAPDH 一抗（稀释比为 1: 1 000），4 $^{\circ}$ C 孵育过夜，次日加入相应二抗（稀释比为 1: 1 000）室温孵育 1 h。使用显影液显影，以 GAPDH 为内参蛋白，ImageJ v1.54 软件分析 OD 值后进行统计分析。

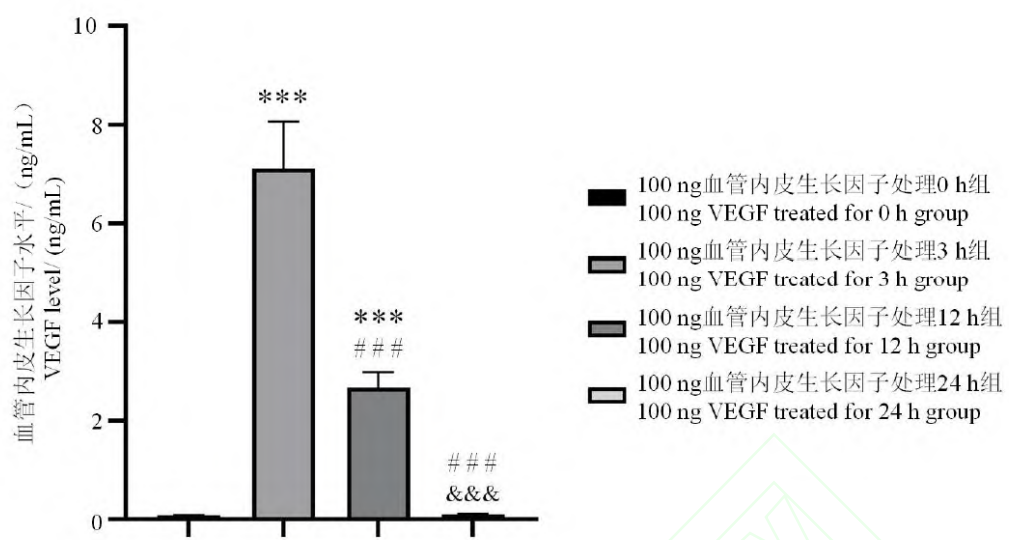
1.4 统计学方法

应用 SPSS 23.0 软件对数据进行处理，GraphPad Prism 8.0 进行数据分析及绘图，计量资料进行正态性检验，符合正态分布的检测结果用平均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示，两组间比较采用 *t* 检验，多组间比较采用单因素方差分析，以 $P < 0.05$ 为有显著性差异。

2 结果

2.1 VEGF 在小鼠中的血药浓度

如图 1 所示，给予 100 ng VEGF 处理后，小鼠血药浓度在 3 h 和 12 h 极显著高于正常生理状态 ($P < 0.001$, $P < 0.001$)，并在 24 h 时代谢至正常水平，因此在后续试验中选择 100 ng VEGF 对小鼠进行 24 h 的处理。



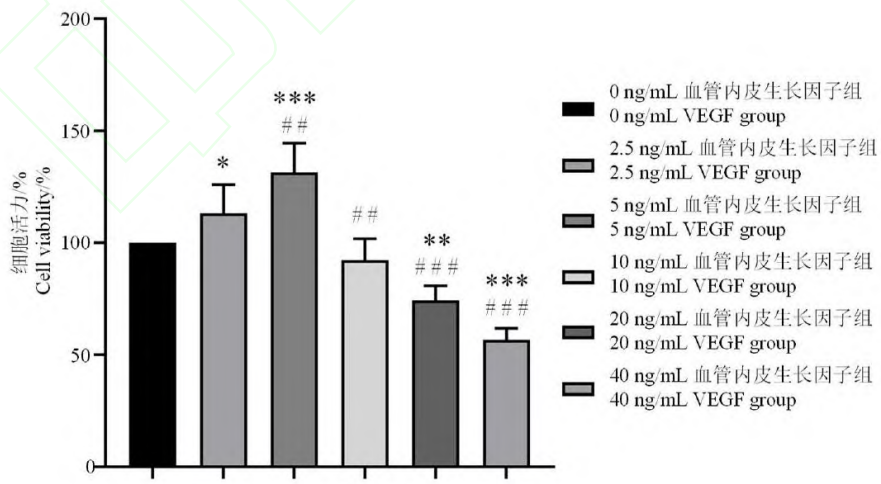
注：与 100 ng 血管内皮生长因子处理 0 h 组相比，*** $P<0.001$ ；与 100 ng 血管内皮生长因子处理 3 h 组相比，### $P<0.001$ ；与 100 ng 血管内皮生长因子处理 12 h 组相比，&&& $P<0.001$ 。

图 1 给予 100 ng VEGF 后小鼠血药浓度 ($\bar{x}\pm s$, $n=8$)
Note. Compared with 100 ng VEGF treated for 0 h group, *** $P<0.001$. Compared with 100 ng VEGF treated for 3 h group, ### $P<0.001$. Compared with 100 ng VEGF treated for 12 h group, &&& $P<0.001$.

Figure 1 Blood drug concentration of mice after administration of 100 ng VEGF ($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

2.2 VEGF 对细胞活力的影响

如图 2 所示，与 0 ng/mL 血管内皮生长因子组比较，2.5、5 ng/mL VEGF 干预细胞 24 h 后，细胞活力均明显提高 ($P<0.05$, $P<0.001$)，而在 20、40 ng/mL VEGF 处理后，细胞活力显著降低 ($P<0.01$, $P<0.001$)；与 2.5 ng/mL 血管内皮生长因子组比较，10、20、40 ng/mL VEGF 处理后，细胞活力均显著降低 ($P<0.01$, $P<0.001$, $P<0.001$)。基于此，血管内皮生长因子低剂量组采用 10 ng/mL 作为实验浓度，血管内皮生长因子中剂量组采用 20 ng/mL 作为实验浓度，血管内皮生长因子高剂量组采用 40 ng/mL 作为实验浓度，进行后续实验。



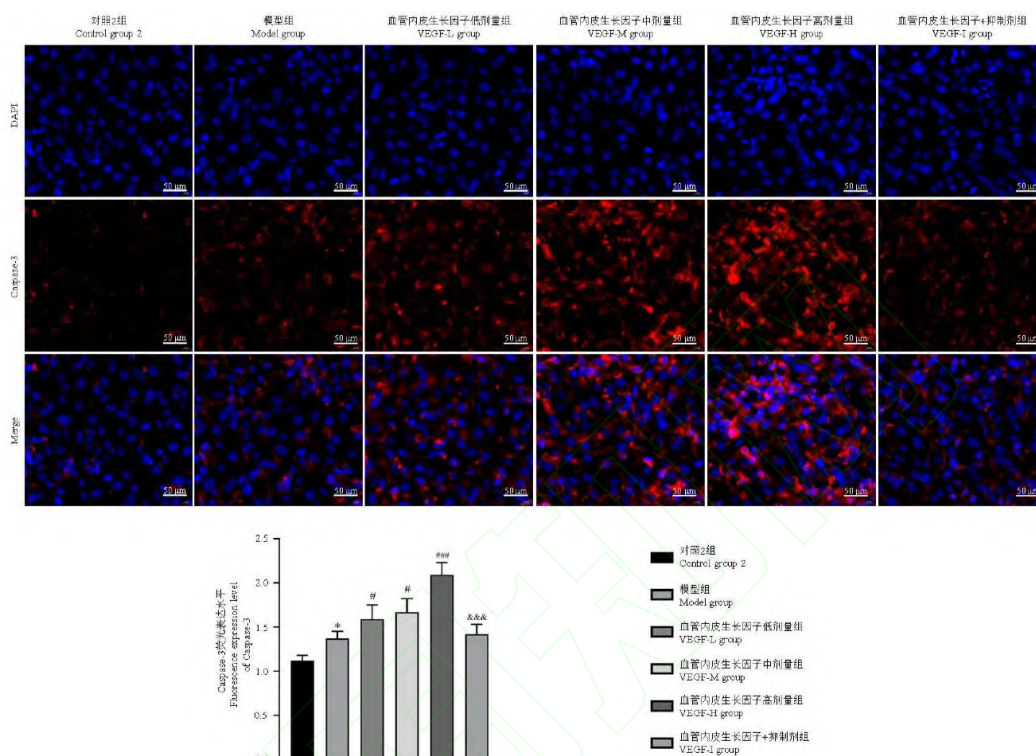
注：与 0 ng/mL 血管内皮生长因子组相比，* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ ；与 2.5 ng/mL 血管内皮生长因子组相比，## $P<0.01$, ### $P<0.001$ 。

图 2 不同浓度 VEGF 对 HPAEpiC 细胞活力的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=8$)
Note. Compared with 0 ng/mL VEGF group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$. Compared with 2.5 ng/mL VEGF group, ## $P<0.01$, ### $P<0.001$.

Figure 2 Effects of different concentrations of VEGF on HPAEpiC cell viability ($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

2.3 VEGF 对细胞凋亡相关蛋白 Caspase-3 表达的影响

如图 3 所示, 与对照 2 组相比, 在模型组中, Caspase-3 的表达显著上升 ($P<0.05$); 与模型组相比, 血管内皮生长因子低剂量组、血管内皮生长因子中剂量组、血管内皮生长因子高剂量组 Caspase-3 蛋白含量均增加 ($P<0.05$, $P<0.05$, $P<0.001$); 与血管内皮生长因子高剂量组相比, 血管内皮生长因子+抑制剂组 Caspase-3 蛋白含量显著下降 ($P<0.001$)。



注: 与对照 2 组相比, * $P<0.05$; 与模型组相比, # $P<0.05$, ### $P<0.001$; 与血管内皮生长因子高剂量组相比, &&& $P<0.001$ 。

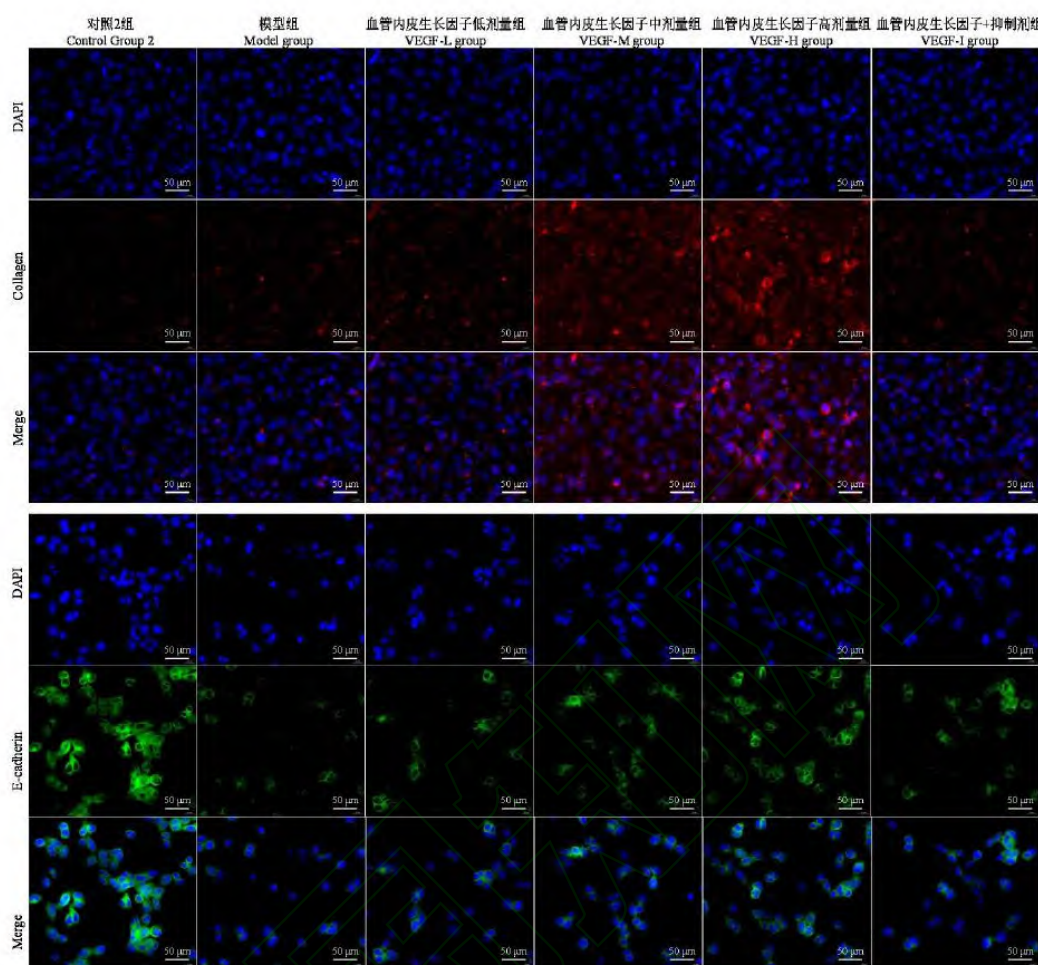
图 3 VEGF 对 HPAEpiC 细胞凋亡相关蛋白 Caspase-3 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

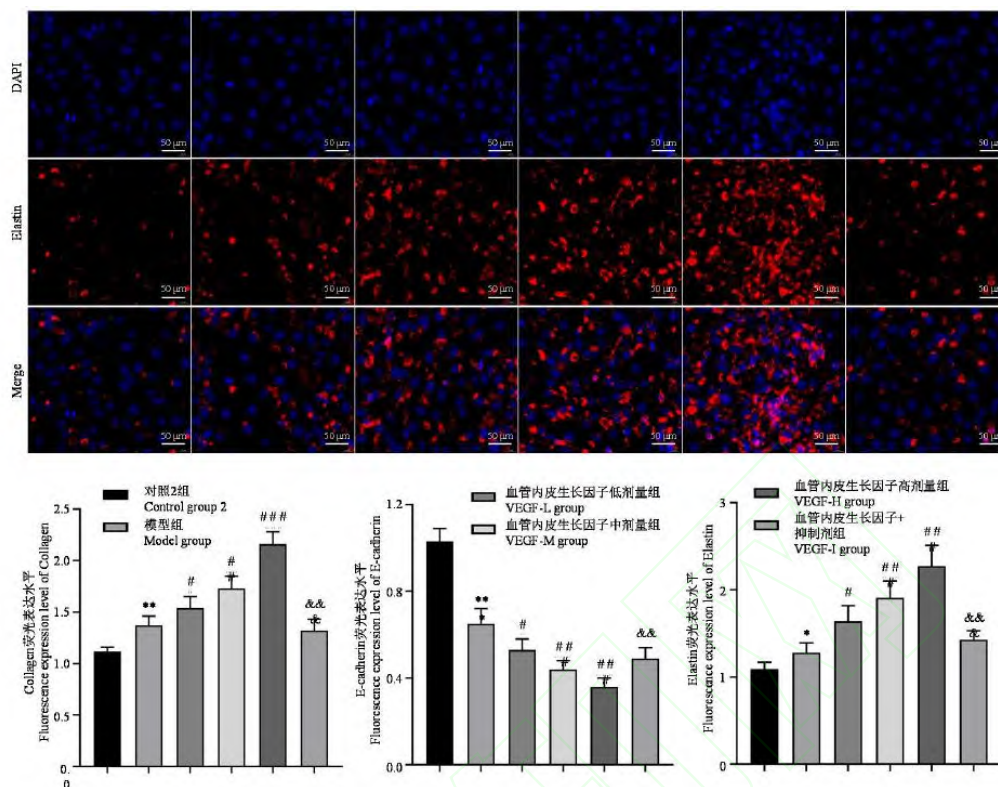
Note. Compared with control group 2, * $P<0.05$. Compared with model group, # $P<0.05$, ### $P<0.001$. Compared with VEGF-H group, &&& $P<0.001$.

Figure 3 Effect of VEGF on the expression of apoptosis-related protein Caspase-3 in HPAEpiC cells ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

2.4 VEGF 对细胞中 ECM 蛋白的影响

如图 4 所示, 与对照 2 组相比, 在模型组中, E-cadherin 表达明显减少 ($P<0.001$), Collagen 和 Elastin 的表达显著上升 ($P<0.05$, $P<0.01$), 表明肺纤维化细胞中 ECM 蛋白异常增加。与模型组相比, 血管内皮生长因子低剂量组、血管内皮生长因子中剂量组、血管内皮生长因子高剂量组 E-cadherin 蛋白含量进一步减少 ($P<0.05$, $P<0.001$, $P<0.001$), Collagen 蛋白含量进一步增加 ($P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.001$), Elastin 蛋白含量也进一步增加 ($P<0.05$, $P<0.001$, $P<0.001$); 与血管内皮生长因子高剂量组相比, 血管内皮生长因子+抑制剂组 E-cadherin 表达增加 ($P<0.01$), Collagen 和 Elastin 的表达减少 ($P<0.001$, $P<0.001$)。





注：与对照2组相比，* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ ，*** $P<0.001$ ；与模型组相比，# $P<0.05$ ，## $P<0.01$ ，### $P<0.001$ ；与血管内皮生长因子高剂量组相比，&& $P<0.01$ ，&&& $P<0.001$ 。

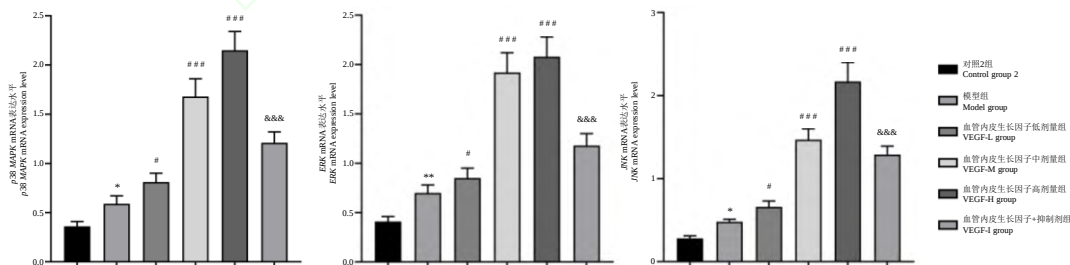
图4 VEGF对HPAEpiC细胞ECM蛋白荧光强度的影响($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Note. Compared with control group 2, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$. Compared with model group, # $P<0.05$, ## $P<0.01$, ### $P<0.001$. Compared with VEGF-H group, && $P<0.01$, &&& $P<0.001$.

Figure 4 Effect of VEGF on ECM protein content of HPAEpiC cells($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

2.5 VEGF对细胞p38 MAPK信号通路的影响

如图5所示，与对照2组相比，模型组中p38 MAPK、ERK和JNK的表达显著增加($P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.05$)；与模型组相比，血管内皮生长因子低剂量组、血管内皮生长因子中剂量组、血管内皮生长因子高剂量组的p38 MAPK、ERK及JNK的mRNA水平均进一步提升($P<0.05$, $P<0.001$, $P<0.001$)；与血管内皮生长因子高剂量组相比，血管内皮生长因子+抑制剂组中p38 MAPK、ERK和JNK的表达量显著降低($P<0.001$, $P<0.001$, $P<0.001$)。



注：与对照2组相比，* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ ；与模型组相比，# $P<0.05$ ，### $P<0.001$ ；与血管内皮生长因子高剂量组相比，&&& $P<0.001$ 。

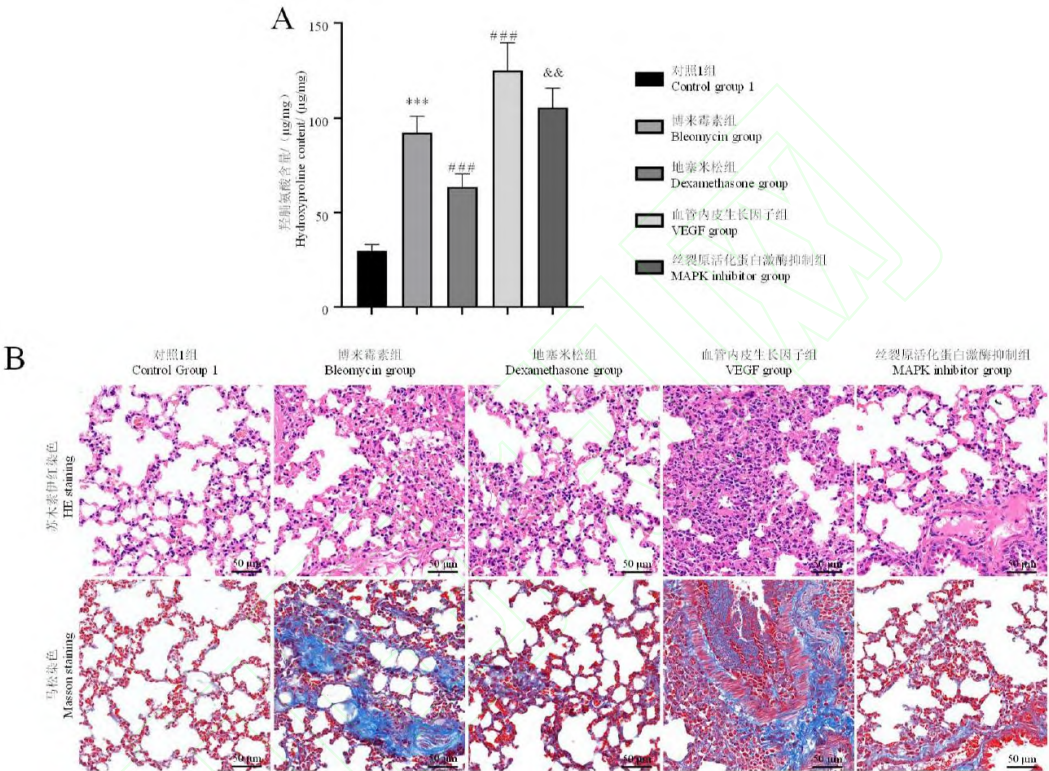
图5 VEGF对HPAEpiC细胞p38 MAPK、ERK及JNK mRNA表达的影响($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Note. Compared with control group 2, * $P<0.05$, ** $P<0.01$. Compared with model group, # $P<0.05$, ### $P<0.001$. Compared with VEGF-H group, &&& $P<0.001$.

Figure 5 Effects of VEGF on the mRNA expressions of p38 MAPK, ERK and JNK in HPAEpiC cells($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

2.6 VEGF 对小鼠肺纤维化的影响

如图 6A 所示，博来霉素处理使得小鼠肺组织羟脯氨酸含量相比对照 1 组显著升高（ $P<0.001$ ），在此基础上的地塞米松处理能够降低羟脯氨酸含量（ $P<0.001$ ），而 VEGF 处理进一步提升羟脯氨酸水平（ $P<0.001$ ）。丝裂原活化蛋白激酶抑制剂组相比血管内皮生长因子组小鼠肺组织羟脯氨酸含量则显著降低（ $P<0.01$ ）。如图 6B 所示，HE 染色与 Masson 染色结果表明，对照 1 组小鼠肺组织结构完整，无炎症及胶原蛋白沉积。与之相比，博来霉素组肺泡结构破坏明显，肺泡间隔增宽肺泡壁增厚、水肿，伴有炎性浸润和胶原纤维沉积。地塞米松组上述症状改善显著，血管内皮生长因子组小鼠肺纤维化情况加重，而丝裂原活化蛋白激酶抑制剂组小鼠肺纤维化情况有所好转。



注：A：小鼠肺组织羟脯氨酸含量；B：小鼠肺组织 HE 和 Masson 染色（40×）。与对照 1 组相比，*** $P<0.001$ ；与博来霉素组相比，### $P<0.001$ ；与血管内皮生长因子组相比，&& $P<0.01$ 。

图 6 VEGF 对小鼠肺纤维化的影响（ $\bar{x}\pm s$, $n=8$ ）
Note. A: Hydroxyproline content in mice lung tissue. B: HE and Masson staining of mice lung tissue (40×). Compared with control group 1, *** $P<0.001$. Compared with bleomycin group, ### $P<0.001$. Compared with VEGF group, && $P<0.01$.

Figure 6 Effects of VEGF on pulmonary fibrosis in mice($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

2.7 VEGF 在体内对 p38 MAPK 信号通路的影响

如图 7 所示，与对照 1 组相比，博来霉素组中 p-p38 MAPK、ERK 和 JNK 的表达显著增加（ $P<0.001$, $P<0.01$, $P<0.001$ ）；与博来霉素组相比，血管内皮生长因子组的 p-p38 MAPK、ERK 及 JNK 蛋白水平均进一步提升（ $P<0.01$, $P<0.01$, $P<0.05$ ），地塞米松组上述蛋白含量减少（ $P<0.05$, $P<0.05$, $P<0.05$ ）；与血管内皮生长因子组相比，丝裂原活化蛋白激酶抑制剂组中 p-p38 MAPK、ERK 和 JNK 的表达量显著降低（ $P<0.01$, $P<0.05$, $P<0.05$ ）。

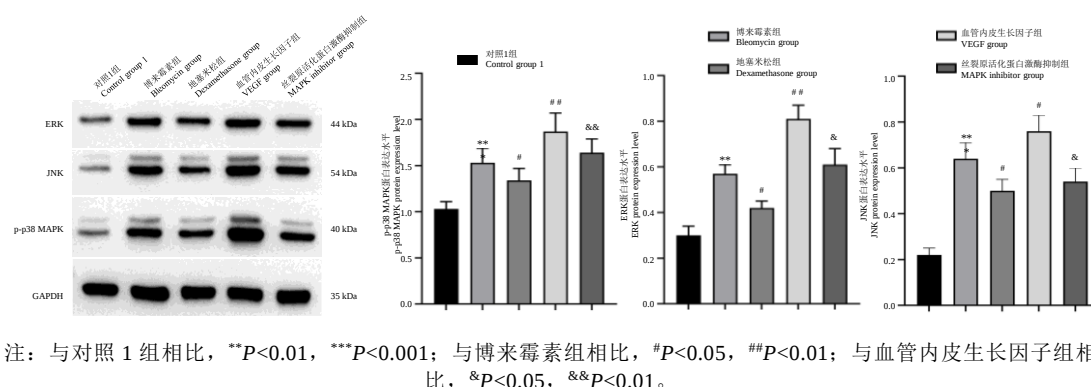


图 7 VEGF 对小鼠肺组织 p-p38 MAPK、ERK 及 JNK 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Note. Compared with control group 1, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$. Compared with bleomycin group, # $P<0.05$, ## $P<0.01$. Compared with VEGF group, & $P<0.05$, && $P<0.01$.

Figure 7 Effects of VEGF on the protein expressions of p-p38 MAPK, ERK and JNK in mouse lung tissue($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

3 讨论

肺泡壁重塑的发生不仅涉及肺泡的结构变化，还与气道的纤维化及血管重构等并发症密切相关。VEGF 是一种重要的促血管生成因子，在肺部疾病中通过调节肺血管的结构和功能影响气道炎症^[19]，还可能参与慢性阻塞性肺疾病的气道重塑过程，是导致患者肺功能降低的影响因子之一^[20]。本研究首先发现 VEGF 对肺泡上皮细胞存活率呈现明显的剂量依赖性效应，低剂量 VEGF (2.5~5 ng/mL) 显著提高细胞存活率，而高剂量 VEGF (20~40 ng/mL) 则明显抑制细胞活性。这一发现与既往研究相吻合，即 VEGF 在生理浓度下对内皮细胞具有保护作用，但过度表达可能导致细胞功能紊乱^[21]。本研究结果进一步显示，高浓度 VEGF 诱导 HPAEpiC 细胞 Caspase-3 水平升高。Caspase-3 是细胞凋亡过程中的主要终末剪切酶，常用作检测细胞凋亡的标志蛋白^[22]。以上内容提示高浓度 VEGF 可能诱导细胞凋亡，结合本研究肺纤维化背景，提示病理状态下补充低剂量 VEGF 可能改善细胞存活微环境，而高剂量 VEGF 则可能打破细胞信号平衡，反而加剧细胞损伤，其具体作用可能受疾病状态影响。

在肺泡壁重塑的机制中，ECM 的重塑扮演着核心角色。正常情况下，肺部 ECM 由大分子紧密连接蛋白如黏附蛋白、纤维蛋白和胶原蛋白组成，维持肺稳态及其细胞间相互作用^[23]。有研究指出，E-cadherin 直接参与肺泡 I 型上皮细胞向 II 型上皮细胞的转化，在肺纤维化中通常呈低表达水平^[24]。Elastin 是最稳定的 ECM 蛋白之一，其纤维比例的变化或被 Caspase 家族降解可能导致肺部血管疾病、肺动脉高压甚至肺动脉硬化^[25]。Collagen 则是肺组织 ECM 中胶原的主要成分^[26]。肺组织 ECM 与肺纤维化关系最为密切，肺组织损伤后，ECM 过量沉积于肺间质，使肺结构破坏，肺泡膜增厚，最终发生呼吸衰竭^[27]。本研究体内试验结果表明，VEGF 处理显著加重了博来霉素诱导的肺纤维化，表现为更严重的羟脯氨酸含量升高、肺泡结构破坏和胶原沉积，和以上发现一致。体外结果显示，VEGF 能够促进 ECM 蛋白的生成，抑制 p38 MAPK 通路后 ECM 蛋白减少。进一步实验结果发现，VEGF 能够激活 p38 MAPK 通路，促进该通路相关蛋白及 mRNA 的产生。在体内 VEGF 也可通过激活 p38 MAPK 通路，加重小鼠肺纤维化情况。

MAPK 家族包括 ERK, JNK 和 p38 MAPK，可被多种促炎细胞因子激活，调控下游转录因子、信号转导蛋白和功能酶^[28]。p38 是 MAPK 信号家族的主要成员之一，其水平升高与肺部血管收缩和重塑有关，通常伴随气道上皮细胞结构的破坏和炎症形成^[29]。多项研究表明，p38 MAPK 信号通路参与了哮喘的炎症反应和气道重塑，并与肺组织 ROS 水平升高和炎性浸润直接相关^[30, 31]。本研究通过 RT-qPCR 和 Western blot 实验共同证实 VEGF 能够显著激活 p38 MAPK、ERK 和 JNK 通路，和前人的研究结果相符。尤其值得注意的是，VEGF 对 p38 MAPK 的激活效应最为显著，这与本团队前期在慢性高氧肺损伤模型中的发现形成呼应^[11]。本研究还发现，p38 MAPK 抑制剂处理后各通路蛋白表达表现出同步下降现象，提示 VEGF 可能通过上游共同节点调控 MAPK 家族多个成员。同时，p38

MAPK 抑制剂部分逆转了本研究中 VEGF 诱导的变化,表明 p38 MAPK 可能是 MAPK 家族中和肺泡壁重塑最为相关的调控因子,但其具体作用仍需进一步探究。

本研究仍存在一定局限性,未深入探究 VEGF 与其特异性受体在 p38 MAPK 通路激活中的具体分子机制,也未进一步阐明其与 ERK/JNK 是否存在交叉干扰关系。未来研究可结合临床样本,深入解析 p38 MAPK 与 ERK、JNK 或其他潜在信号通路的交互作用,并开展更全面的体内功能验证实验。

综上所述,本研究阐明了 VEGF 调控 p38 MAPK 通路介导肺泡壁重塑的分子机制,为深入了解 VEGF 在肺部纤维化及其他相关疾病中的作用机制提供了新的思路,也为未来开发针对 VEGF 通路的治疗策略提供了理论依据。

徐芳菲, 邹慧娟, 吴嘉莉, 等. VEGF 介导 p38 MAPK 通路重塑肺泡壁的机制研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2026, 36(13): 00 – 00.

Xu FF, Zou HJ, Wu JL, et al. Mechanism of VEGF mediated p38 MAPK pathway remodeling of the alveolar wall [J]. Chin J Comp Med, 2026, 36(13): 00 – 00.

参考文献:

- [1] Suki B, Bates J H T, Bartolák-Suki E. Remodeling of the aged and emphysematous lungs: roles of microenvironmental cues [J]. Compr Physiol, 2022, 12(3): 3559-3574.
- [2] Fang Y, Qiu J, Xu Y, et al. Ophiopogonin D alleviates sepsis-induced acute lung injury through improving microvascular endothelial barrier dysfunction via inhibition of HIF-1 α -VEGF pathway [J]. Cell Biochem Biophys, 2025, 83(2): 2519-2531.
- [3] Poto R, Loffredo S, Palestra F, et al. Angiogenesis, lymphangiogenesis, and inflammation in chronic obstructive pulmonary disease (COPD): few certainties and many outstanding questions [J]. Cells, 2022, 11(10): 1720.
- [4] 何雪, 曾慧卉, 陈燕. 内皮祖细胞与慢性阻塞性肺疾病: 从基础研究到临床应用 [J]. 中南大学学报(医学版), 2024, 49(12): 1966-1972.
He X, Zeng H H, Chen Y. Endothelial progenitor cells and chronic obstructive pulmonary disease: From basic research to clinical application [J]. J Cent South Univ Med Sci, 2024, 49(12): 1966-1972.
- [5] 靳雅蒙, 石艳玺, 刘新锋. 先天性肺气道畸形肺形态发育过程及相关因子的研究进展 [J]. 中国优生与遗传杂志, 2022, 30(6): 1088-1091.
Jin Y M, Shi Y X, Liu X F. Research progress on morphological development and related factors of congenital pulmonary airway malformation [J]. Chin J Birth Heal Hered, 2022, 30(6): 1088-1091.
- [6] Shi A, Liu L, Li S, et al. Natural products targeting the MAPK-signaling pathway in cancer: overview [J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2024, 150(1): 6.
- [7] 张榕华, 潘妍, 廖乔浪, 等. 基于网络药理学及实验验证探讨清金化痰汤治疗慢性阻塞性肺疾病的作用机制 [J]. 环球中医药, 2025, 18(8): 1591-1600.
Zhang R H, Pan Y, Liao Q L, et al. To explore the mechanism of Qingjin Huatan Decoction in treating COPD based on network pharmacology and experimental verification [J]. Glob Tradit Chin Med, 2025, 18(8): 1591-1600.
- [8] Wang Y, Yu Y, Yu W, et al. IL-35 inhibits cell pyroptosis and attenuates cell injury in TNF- α -induced bronchial epithelial cells via p38 MAPK signaling pathway [J]. Bioengineered, 2022, 13(1): 1758-1766.
- [9] Ahmadi A, Ahrari S, Salimian J, et al. p38 MAPK signaling in chronic obstructive pulmonary disease pathogenesis and inhibitor therapeutics [J]. Cell Commun Signal, 2023, 21(1): 314.
- [10] Zhang S, Lu X, Fang X, et al. Cigarette smoke extract combined with LPS reduces ABCA3 expression in chronic pulmonary inflammation may be related to PPAR γ /P38 MAPK signaling pathway [J]. Ecotoxicol Environ Saf, 2022, 244: 114086.
- [11] 徐芳菲, 吴嘉莉, 邹慧娟, 等. 血管内皮细胞生长因子介导 p38 丝裂原激活蛋白激酶通路对慢性高氧肺损伤早产大鼠的影响 [J]. 中国当代医药, 2025, 32(18): 16-20.
Xu F F, Wu J L, Zou H J, et al. Effect of vascular endothelial growth factor-mediated p38 mitogen-activated protein kinase pathway on chronic hyperoxia-induced lung injury in premature rats [J]. China Mod Med, 2025, 32(18): 16-20.
- [12] Pan L, Cheng Y J, Yang W T, et al. Nintedanib ameliorates bleomycin-induced pulmonary fibrosis, inflammation, apoptosis, and oxidative stress by modulating PI3K/Akt/mTOR pathway in mice [J]. Inflammation, 2023, 46(4): 1531-1542.
- [13] Abdelmawgood I A, Mohamed A S, Mahana N A, et al. Chrysin-loaded PLGA nanoparticle attenuates ferroptosis in lipopolysaccharide-induced indirect acute lung injury by upregulating Nrf2-dependent antioxidant responses [J]. Respir Physiol Neurobiol, 2025, 336: 104451.
- [14] Yang F, Luo G, Liu M N, et al. Network pharmacology and experimental validation to investigate the mechanism of action of Zhilong Huoxue Tongyu capsule in the prevention and treatment of diabetic cardiomyopathy [J]. PLoS One, 2025, 20(5): e0323745.
- [15] 叶大强, 赵文飞, 王晓玲, 等. 基于 VEGF/VEGFR2 信号通路研究阿帕替尼对子宫腺肌病模型小鼠血管生成的影响及作用机制 [J]. 妇儿健康导刊, 2025, 4(12): 189-193, 199.
Ye D Q, Zhao W F, Wang X L, et al. Effect and mechanism of Apatinib on angiogenesis in adenomyosis model mice based on VEGF/VEGFR2 signaling pathway [J]. J Women Children's Heal Guide, 2025, 4(12): 189-193, 199.
- [16] Feng X T, Du M, Li S J, et al. Hydroxysafflor yellow A regulates lymphangiogenesis and inflammation via the inhibition of PI3K on regulating AKT/mTOR and NF- κ B pathway in macrophages to reduce atherosclerosis in ApoE^{-/-} mice [J]. Phytomedicine, 2023, 112: 154684.
- [17] Qi Z, Yang W, Xue B, et al. ROS-mediated lysosomal membrane permeabilization and autophagy inhibition regulate bleomycin-induced cellular senescence [J]. Autophagy, 2024, 20(9): 2000-2016.
- [18] Hua B, Liu Q, Gao S, et al. Protective role of activating PPAR γ in advanced glycation end products-induced impairment of coronary artery vasodilation via inhibiting p38 phosphorylation and reactive oxygen species production [J]. Biomed Pharmacother, 2022, 147: 112641.
- [19] Ma W, Jin Q, Guo H, et al. Metformin ameliorates inflammation and airway remodeling of experimental allergic asthma in mice by restoring

- AMPK α activity [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 780148.
- [20] Chis A F, Răjnoveanu R M, Man M A, et al. Increased vascular endothelial growth factor serum level and the role of +936C/T gene polymorphism in chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Medicina (Kaunas)*, 2021, 57(12): 1351.
- [21] Konopka J, Kołodziejek D, Flont M, et al. Exploring endothelial expansion on a chip [J]. *Sensors*, 2022, 22(23): 9414.
- [22] Allam M, Amin Y A, Fouad S S, et al. Mesenchymal stem cells reduce the genotoxic effect of lead acetate in the testis of male rats and induce testicular cellular proliferation indicated by 16S rRNA sequence, increase the proliferation marker Ki-67 and a reduction in the apoptosis marker caspase-3 [J]. *Biol Res*, 2025, 58(1): 29.
- [23] Janulaityte I, Januskevicius A, Rimkunas A, et al. Asthmatic eosinophils alter the gene expression of extracellular matrix proteins in airway smooth muscle cells and pulmonary fibroblasts [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(8): 4086.
- [24] Huang C W, Liang C M, Tong J Z, et al. Soluble E-cadherin participates in BLM-induced pulmonary fibrosis by promoting EMT and lung fibroblast migration [J]. *Environ Toxicol*, 2023, 39(1): 435-443.
- [25] Kucherenko M M, Sang P, Yao J, et al. Elastin stabilization prevents impaired biomechanics in human pulmonary arteries and pulmonary hypertension in rats with left heart disease [J]. *Nat Commun*, 2023, 14(1): 4416.
- [26] Tang J, Ramis-Cabrer D, Curull V, et al. Markers of stroma in lung cancer: influence of COPD [J]. *Arch De Bronconeumología Engl Ed*, 2021, 57(2): 130-137.
- [27] Jessen H, Hoyer N, Prior T S, et al. Turnover of type I and III collagen predicts progression of idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Respir Res*, 2021, 22(1): 205.
- [28] 李春颖, 尹燕燕, 季梦垚, 等. 基于 MAPK/NF- κ B 信号通路探讨调气止咳方对咳嗽变异性哮喘大鼠气道炎症的影响及机制 [J]. *中药新药与临床药理*, 2024, 35 (7): 1008-1015.
- Li C Y, Yin Y Y, Ji M Y, et al. Exploration of the effect and mechanism of tiaopi Zhike prescription on airway inflammation in rats with cough variant asthma based on MAPK/NF- κ B signalling pathway [J]. *Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol*, 2024, 35(7): 1008-1015.
- [29] Bai D, Sun Y, Li Q, et al. Leonurine attenuates OVA-induced asthma via p38 MAPK/NF- κ B signaling pathway [J]. *Int Immunopharmacol*, 2023, 114: 109483.
- [30] 宋栋, 李慧聪, 高雪歌, 等. 基于转录组学与网络药理学分析射麻止喘液治疗嗜酸性粒细胞型哮喘的分子机制 [J]. *中药新药与临床药理*, 2024, 35 (12): 1886-1894.
- Song D, Li H C, Gao X G, et al. Integrative transcriptomics and network pharmacology to analyze the molecular mechanism of Shema Zhichuan liquid in treating eosinophilic asthma [J]. *Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol*, 2024, 35(12): 1886-1894.
- [31] Lertnimitphun P, Zhang W, Fu W, et al. Safranal alleviated OVA-induced asthma model and inhibits mast cell activation [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 585595.