

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2022.17.002

活性维生素 D 缺乏诱发与衰老相关的特发性肺纤维化*

徐芙蓉 刘轶宁 杨翠翠 王晶 陆劲红 苗登顺[△]

(南京医科大学基础医学院人体解剖与组织胚胎学系 骨与干细胞研究中心 江苏南京 211100)

摘要 目的:研究活性维生素 D 缺乏致小鼠肺纤维化的作用与机制。**方法:**取 7 周龄同窝野生型(Wild Type, WT)小鼠,维生素 D 缺乏($1\alpha(\text{OH})\text{ase}^{-/}$)小鼠置于肺功能检测仪器中,对其吸气时间,最大吸气流速、呼出 50%气量时对应的呼气流速、潮气量、分钟通气量,呼吸频率等指标进行分析。培养小鼠原代肺成纤维细胞,按基因型分为对照组、活性维生素 D 缺乏组,之后分组检测细胞 SA- β -gal 阳性率。另外取小鼠肺组织样本多聚甲醛固定后脱水浸蜡以制作石蜡组织切片,对各组切片进行 HE、Masson 染色以观察肺的组织学形态的变化,使用免疫组织化学观察肺组织中的衰老相关蛋白(p16, p53)的表达量差异。**结果:**相较于同窝 WT 小鼠, $1\alpha(\text{OH})\text{ase}^{-/}$ 小鼠通气功能显著减弱,肺成纤维细胞衰老程度和肺组织纤维化程度均有不同程度增加,且免疫组化结果显示肺组织中衰老相关的 p53 及 p16 阳性的细胞也显著增加。**结论:**活性维生素 D 的缺乏能够诱发与衰老相关的特发性肺纤维化,可能的机制是通过激活 p53/p16 信号引发肺成纤维细胞提前衰老,继而引起肺组织异常纤维化。

关键词:衰老;活性维生素 D;肺纤维化

中图分类号:Q565;Q339.38;R563 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2022)17-3208-06

Active Vitamin D Deficiency Induces Aging-related Idiopathic Pulmonary Fibrosis*

XU Fang-rong, LIU Yi-ning, YANG Cui-cui, WANG Jing, LU Jin-hong, MIAO Deng-shun[△]

(Department of Anatomy, Histology and Embryology, Nanjing Medical University, Nanjing, Jiangsu, 211100, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect and mechanism of vitamin D deficiency on pulmonary fibrosis in mice. **Methods:** The 7-week-old of wild type (WT) mice and vitamin D deficiency ($1\alpha(\text{OH})\text{ase}^{-/}$) mice were used in this study. They were mechanically ventilated at an initial baseline challenge using the pulmonary function testing instrument(WBP-8MR, TOW-INT TECH, Shanghai, China) to directly evaluate lung ventilatory resistance and compliance, including inspiration time, peak inspiratory flow, expiration time, frequency, tidal volume, minute volume. The lungs were separated, minced, and digested to culture pulmonary fibroblasts, and then analyzing the percentages of SA- β -gal-positive cells or areas. The pathological changes of lung tissues and the distribution collagen fibers were observed by HE and Masson staining. The expression of p53, p16 of lung tissues were detected by immunohistochemistry staining. **Results:** Compared with WT littermates, the ventilation function of $1\alpha(\text{OH})\text{ase}^{-/}$ mice was significantly weakened, and the degree of senescence of lung fibroblasts and the degree of lung tissue fibrosis were increased to varying degrees, and immunohistochemical results showed that the number of p53 and p16 positive cells associated with senescence also increased significantly. **Conclusions:** Lack of vitamin D can promote pulmonary fibrosis, and the possible mechanism is that the activation of p53/p16 signaling pathway induces premature senescence of lung fibroblasts, which in turn causes abnormal fibrosis of lung tissue.

Key words: Aging; Vitamin D; Pulmonary Fibrosis

Chinese Library Classification(CLC): Q565; Q339.38; R563 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2022)17-3208-06

前言

特发性肺纤维化 (Idiopathic Pulmonary Fibrosis, IPF) 是一种以肺间质异常重塑为特征的致命性疾病,可导致肺功能严重受损^[1]。随着人们对 IPF 的关注和研究逐渐增多,越来越多的研究表明肺上皮细胞的异常衰老参与了肺纤维化的发生发展并在其中起到了举足轻重的作用^[2,3]。因此延缓肺上皮细胞的衰老

进程日渐成为治疗 IPF 的新方向。同时越来越多的研究阐明了维生素 D 与衰老之间愈加强烈的关系,既往对维生素 D 的研究着重于其与内分泌系统相关的钙稳态和骨代谢之间的关系,揭示了其参与诱导细胞分化、抑制细胞生长、免疫调节和控制其他激素系统等多种生物学作用^[4]。此外,多项与临床治疗相关的流行病学研究结果表明维生素 D 缺乏与包括哮喘、慢性阻塞性肺病(COPD)、囊性纤维化和呼吸道感染在内的多种呼吸

* 基金项目:国家自然科学基金重点项目(81730066);江苏省研究生创新计划项目(KYCX20_1381)

作者简介:徐芙蓉(1997-),女,硕士,主要研究方向:维生素 D 缺乏引起相关疾病,电话:18771826344, E-mail: 302826945@qq.com

[△] 通讯作者:苗登顺,教授,主要研究方向:维生素 D 与衰老, E-mail: dsmiao@njmu.edu.cn

(收稿日期:2022-02-25 接受日期:2022-03-21)

道疾病的患病风险之间存在紧密联系^[5]。但截至目前揭示维生素 D 与肺相关纤维增生性疾病之间关系的研究依旧较少。虽然已有研究表明在小鼠饲料中加入预防性剂量的维生素 D 可减轻博莱霉素诱导的肺纤维化,但其中的机制尚未被阐明^[6]。为了评估活性维生素 D 在预防肺纤维化的潜在作用,我们比较了 1α -羟化酶基因敲除小鼠($1\alpha(\text{OH})\text{ase}^{-/-}$ 小鼠)与 7 周的野生型同窝小鼠的肺表型,以求进一步阐明两者间的关系。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 实验动物 实验所涉及到的动物模型为用 7 周龄 WT, $1\alpha(\text{OH})\text{ase}^{-/-}$ 小鼠(1α -羟化酶基因敲除鼠),所有实验步骤均严格按照南京医科大学实验动物研究所的指导方针进行。该实验计划已获得南京医科大学动物实验伦理委员会批准(许可证号: IACUC-1802007)。

1.1.2 主要实验仪器 从中国上海 TOW-INT TECH 公司购得小动物肺功能检测仪;从 Thermo Fisher Scientific 公司购得恒温 CO_2 细胞培养箱;从日本 Olympus 株式会社购得倒置光学显微镜。

1.1.3 药物和主要试剂 从美国 Cell Signaling Technology 公司购买 p53 抗体(货号 #2524);从美国 Abcam 公司购得 p16 抗体(货号 ab51243)。

1.2 方 法

1.2.1 小鼠肺组织样本制备 7 周龄小鼠麻醉后立即行颈椎脱臼处死,所有小鼠均左肺作为实验样本,并将其切成小块,然后浸入足量的多聚甲醛 (PLP) 固定液中在 4°C 条件下固定过夜。固定完成后将组织按照梯度浓度酒精、二甲苯溶液和石蜡溶液的顺序完成脱蜡水化,在包埋机(Leica Biosystems, 德国)上完成包埋操作以便于后续切片。使用旋转切片机(Leica Biosystems, 德国)切成 $5\ \mu\text{m}$ 切片,并将切好的成片置如 37°C 烘箱中烘干过夜以去除多余的水分,以便保存及进一步的操作。

1.2.2 肺成纤维细胞提取及培养 同 1.2.1 中提到的方式将 7 周龄小鼠安乐死后,将小鼠的整个躯干完全浸在 75%乙醇溶液中 5 min 以完成充分的消毒,之后在超净台中使用无菌手术器械将小鼠的右肺完整取出并切碎,之后将组织平铺至 10 mm 直径的培养皿中。右肺分离、切碎,之后向装有组织的培养皿中加入适量的胰酶(Gibco, 美国)并将皿置入 37°C 细胞培养箱内 20 min 以完成充分消化。在显微镜下确认消化情况,当观察到视野中出现大量悬浮细胞时,立即向皿中加入培养基以终止消化进程,并将消化产物收集至无菌 15 mL 离心管内,以 $1500\ \text{rpm}\times 5\ \text{min}$ 离心 3 次,每次离心结束后弃上层清液并加入 2 mL PBS 缓冲液轻柔吹打以充分混匀沉淀,第三次离心洗涤结束后,用 8 mL 配制好的完全培养基(10%胎牛血清+1%双抗的 α -MEM)充分混匀细胞,并移至加入一个新的培养皿中,之后置于 37°C 培养箱中培养若干天,直至细胞贴壁且不出 现悬浮状态的细胞,培养期间多次半换液以保持细胞正常功能。

1.2.3 小鼠肺功能检测 将小鼠在腔室内驯化 15 分钟后,再将其置于全身体积描记器(WBP-8MR, TOW-INT TECH, 中国上海)的体积描记室中。在 15 min 内,对未受限制的小鼠进行监测相关肺功能指标。吸气时间、最大吸气流量、频率、潮气量、

分钟容积、呼气流量 50(50%容积时的呼气流量)均由由软件(RESMASS 1.4.2.8, To-It Teo, 中国)测定。

1.2.4 HE 染色 将烘干的石蜡切片在梯度酒精和二甲苯溶液中进行常规脱蜡水化,之后使用自来水长时间冲洗切片以清洗掉载玻片上残留的乙醇。接着组织切片完全浸入苏木素染色液(南京建成生物工程研究所,中国江苏南京)中 120 s,染色结束后迅速浸入 1%盐酸酒精中完成分化,再植入流水中冲洗返蓝,接着浸入伊红染色液中复染,然后采用常规脱水程序以使切片透明,最后使用中性树胶完成封片。

1.2.5 Masson 染色 石蜡切片在 37°C 气浴箱中脱蜡水化,之后使用温热水漂洗以除去残留的酒精,之后使用 Masson 检测试剂盒(#D026, 南京建成生物工程研究所,中国江苏南京)对组织切片进行 Masson 染色,并严格参照制造商给出的说明,首先使用试剂盒中提供的核染液进行染色 60 s,将核染液弃掉后,用流水冲洗 30 s,接着胞浆染液滴加在组织上染色 30 s,弃掉染液后流水冲洗 30 s,紧接着将组织浸入 1%盐酸酒精中进行分化 3 s,分化后彻底冲洗以去除残留的酒精,之后置入蓝色复染液内继续复染 5 min,染色完成后将切片置于无水乙醇中冲洗干净残留染料后,使用中性树胶完成封片,并在显微镜下及时观察拍照。

1.2.6 免疫组织化学 石蜡切片常规脱蜡水化,使用 5% H_2O_2 处理 30 min 以消除内源性过氧化氢酶的活性,之后将切片在柠檬酸钠缓冲液中高温孵育以修复抗原并暴露抗原决定簇。结束后 PBS 缓冲液洗涤三次,每次五分钟。洗涤结束后加入适量 5% BSA 溶液并在 37°C 烘箱内孵育 1 h 以封闭非特异性抗原结合位点,孵育结束后 PBS 缓冲液洗涤三次,每次五分钟。之后向组织表面滴加 p16 或 p53 抗体(稀释浓度 1:200),并确保每片组织都完全浸润在液体中,之后将切片置入装有蒸馏水的湿盒内,并在 4°C 冰箱内孵育过夜。孵育结束后弃掉组织表面抗体,并用 PBS 缓冲液洗涤切片 3 次,擦干组织周围水渍后,向组织表面滴加 HRP 标记的山羊抗兔抗体(稀释浓度 1:200),之后在室温孵育 1 h,孵育结束后再用 PBS 溶液洗涤切片 3 次,最后用二氨基联苯胺(3,3'-diaminobenzidine, DAB)试剂盒进行显色,显色时间 1-3 min,时长与检测指标有关。显色完成后用流水长时间冲洗以排除假阳性的可能性,然后滴加苏木素染色液染色 30 s 后,浸入 1%盐酸酒精进行分化,接着用流水冲洗切片以返蓝,最后在梯度酒精和二甲苯溶液中按常规程序进行脱水以透明组织,再滴加中性树胶以完成封片。

1.2.7 SA- β -gal 细胞染色 将从步骤 1.2.2 中提取的小鼠肺成纤维细胞在倒置显微镜下进行细胞计数后,按 3×10^4 个细胞每孔的密度均匀的接种于六孔板中,之后使用衰老 β -半乳糖苷酶染色试剂盒(#C0602, 碧云天)进行染色,根据制造商的说明,弃去细胞培养液,向孔中加入 PBS 充分洗涤,弃掉 PBS 后,再加入 1 mL β -半乳糖苷酶染色固定液进行固定 30 min,固定完成后弃掉固定液,再向孔中加入 PBS 洗涤 3 次,每次 5 min。随后按试剂商给出的说明书上标记的配比配制染色工作液,之后在 37°C 的避光条件下进行孵育过夜。孵育结束后,将六孔板置于倒置光学显微镜下观察并计数。

1.3 统计 学分析

所有分析均使用 SPSS 软件 15.0 版(SPSS 公司,美国)进

行差异性分析,所有统计图均使用 GraphPad Prism8 软件(GraphPad Software,美国)进行绘制。使用定性数据的单向方差分析进行统计比较,以比较组之间的差异。 $P < 0.05$ 被认为具有统计学意义。 P 值标注于图中,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$ 为差异显著。

2 结果

2.1 活性维生素 D 缺乏引起肺功能障碍

先前研究表明,活性维生素 D 除了一小部分被肠道和皮

肤吸收,大部分经过一系列反应在肾脏中通过 1α -羟化酶转化为活性维生素 D。为了研究活性维生素 D 缺乏引起的肺纤维化,我们使用 7 周龄 WT 小鼠和 $1\alpha(\text{OH})ase^{-/-}$ 小鼠。为了评估肺功能,我们利用全身体积扫描仪对两种小鼠进行检测。结果表明,与 WT 小鼠相比, $1\alpha(\text{OH})ase^{-/-}$ 小鼠的吸气时间增加,最大吸气流速、呼出 50%气量时对应的呼气流速、潮气量、分钟通气量显著降低,而呼吸频率没有明显改变。以上结果表明活性维生素 D 缺乏小鼠呼吸功能明显下降。

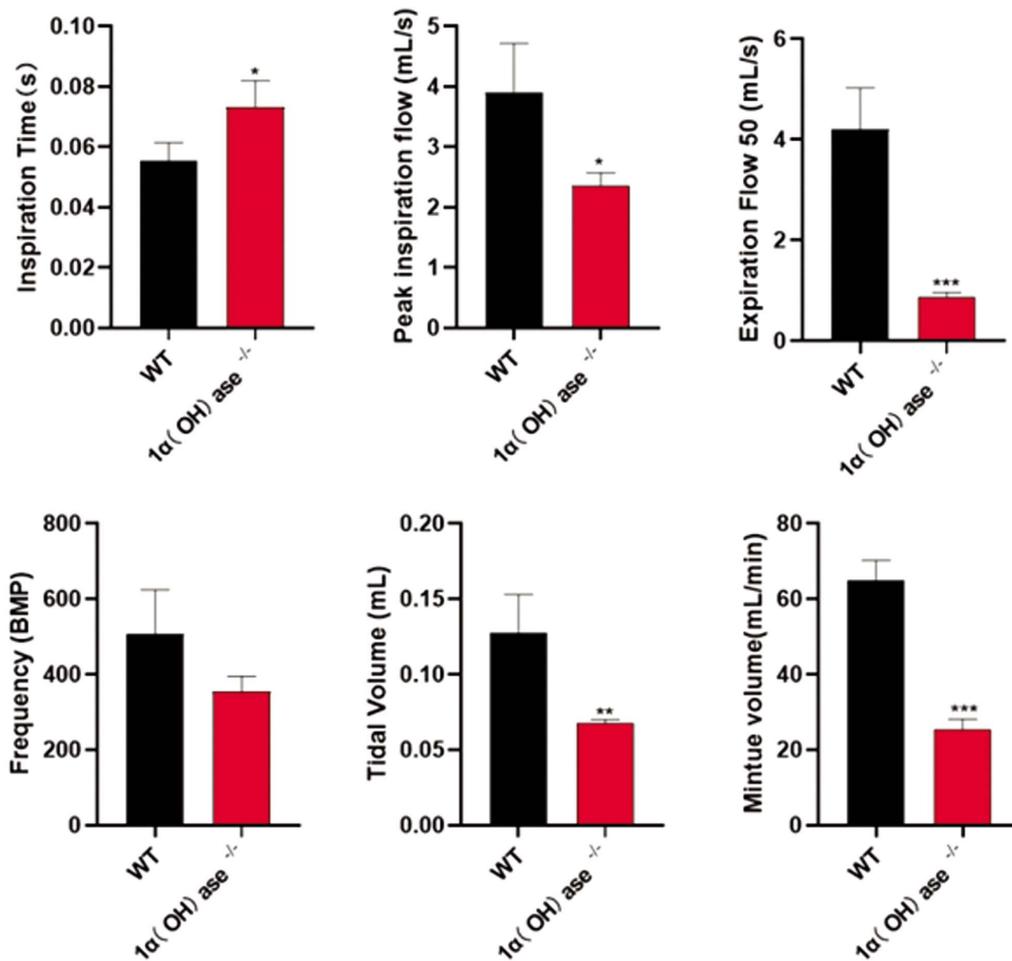


图 1 WT, $1\alpha(\text{OH})ase^{-/-}$ 小鼠肺功能检测水平

Fig.1 The levels of pulmonary function of WT and $1\alpha(\text{OH})ase^{-/-}$ mice

2.2 活性维生素 D 缺乏引起肺组织纤维化

为了进一步研究组织学形态,我们使用 HE 染色和 Masson 染色这两种染色方式观察肺组织的病理学形态和胶原纤维变化情况。如图二所示,WT 小鼠肺组织肺泡结构完整,细小支气管清晰可见,而活性维生素 D 缺乏小鼠的肺组织肺泡壁呈现明显增厚断裂,部分肺泡结构消失,表明活性维生素 D 缺乏会对肺组织造成严重破坏。与野生型小鼠肺组织切片对比,活性维生素 D 缺乏的小鼠肺组织切片经过 Masson 染色后,被染成蓝色的胶原纤维显著增多,表明活性维生素 D 缺乏造成了小鼠肺组织纤维化程度显著加深。

2.3 活性维生素 D 缺乏引起肺细胞衰老

先前的实验证明,活性维生素 D 缺乏可直接引起 ROS 水平异常升高,DNA 损伤增加,p53/p16 信号通路激活。为了研究肺纤维化是否是由于细胞衰老,DNA 损伤和 SASP 引起的,首先提取两种基因型小鼠的肺成纤维细胞,并检测其 SA- β -gal 水平。如图三所示, $1\alpha(\text{OH})ase^{-/-}$ 小鼠肺成纤维细胞 SA- β -gal 阳性细胞或面积的百分比与 WT 细胞相比显著增加。为了明确活性维生素 D 缺乏小鼠致使肺纤维化可能的机制,我们对 p53/p16 衰老信号通路进行了探究。如图四所示, $1\alpha(\text{OH})ase^{-/-}$ 小鼠,无论是肺泡还是支气管,衰老和 SASP 相关指标 p53 和 p16 的阳性细胞百分率均显著增加。

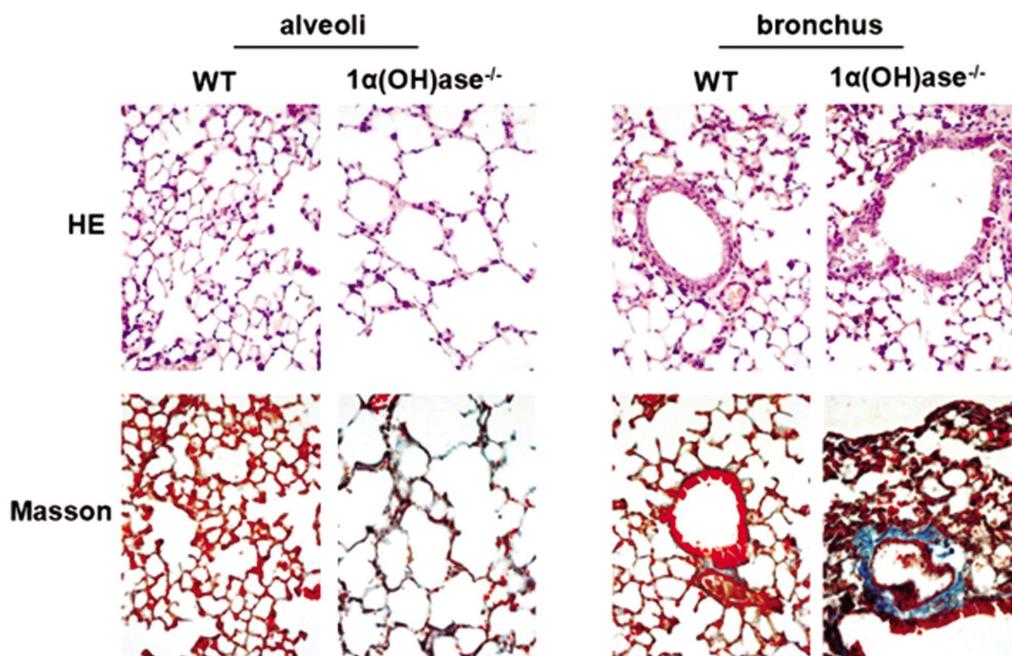


图2 WT, 1 α (OH)ase^{-/-} 小鼠肺组织病理学切片 HE 及 Masson 染色
Fig.2 HE and Masson staining of lung histopathological sections of WT, 1 α (OH)ase^{-/-} mice

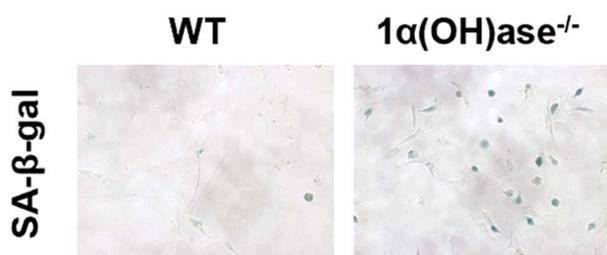


图3 SA- β -gal 细胞化学染色
Fig.3 Representative micrographs of cells stained cytochemical for SA- β -gal

3 讨论

特发性肺纤维化是一种渐进性的、不可逆的、病因尚未阐明的严重致命性肺部纤维化疾病,主要发生在老年人身上^[7]。其特征是肺纤维化病灶周围胶原蛋白和细胞外基质 (Extracellular Matrix, ECM) 的大量沉积,随之导致肺胸膜下层和基底区域的纤维化及蜂窝样变化。随着疾病的进展,患者的肺功能会逐步丧失并且经常发生呼吸疲劳现象^[8]。患者被确诊后的预估生存期通常为 3-5 年 (中位数),且患者通常死于呼吸衰竭。近 10 年来随着人口老龄化的不断加重,IPF 的发病率也在逐年攀

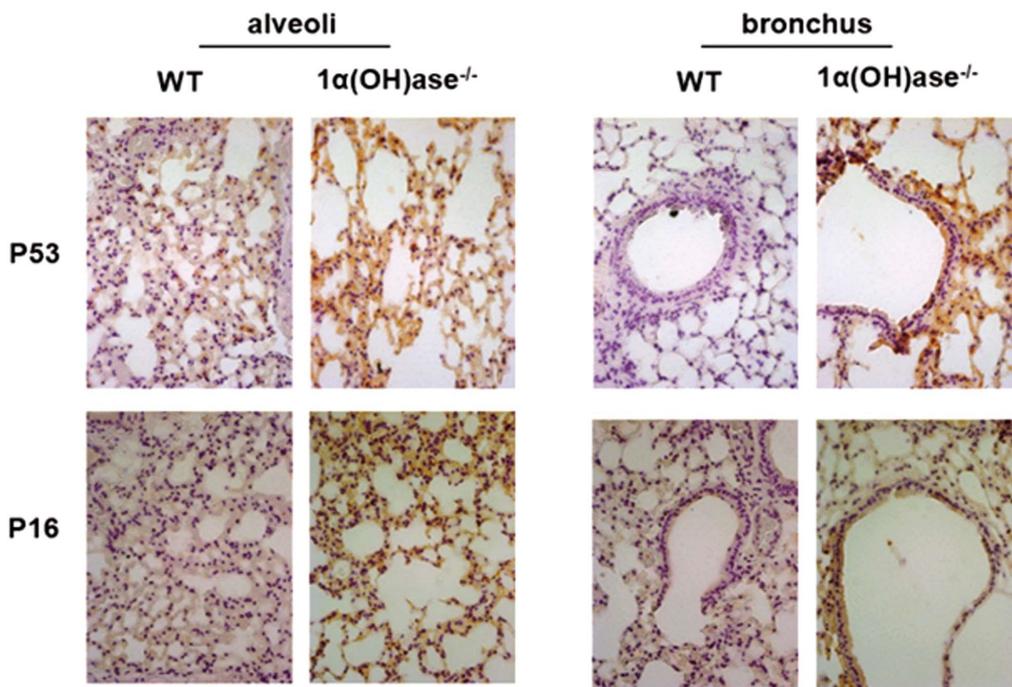


图4 肺组织切片免疫组化染色
Fig.4 Representative micrographs of immunohistochemically for p53, p16

升^[9]。流行病学和大量临床数据表明,IPF 是一种与衰老相关的疾病,并且在老年人中普遍存在,并且 IPF 的发病率和死亡率常与年龄的大小呈现正相关关系^[1,10]。IPF 的发病机制复杂,因此尽管对 IPF 的深入研究已经持续了超过 25 年,但目前针对 IPF 的治疗方式仍旧仅限于吡非尼酮及尼达尼布这两种药物^[10-13],而且这两种药物对患者的病情也仅仅能起到减缓其进展速度的作用。因此,我们迫切的需要找到更可靠的能够参与到 IPF 发生发展过程的生物标志物,从而识别 IPF 疾病的新治疗靶点以开发新的治疗方式,并对这种致命的肺部疾病展开强有力的预防工作。

目前已探明的肺纤维化的主要发病机制涉及 II 型肺泡上皮细胞(Type II alveolar epithelial cells, AEC II)的损伤,其释放大量炎症因子激活肺成纤维细胞并诱导大量 ECM 的分泌,最终导致肺瘢痕形成和重塑^[14,15]。研究表明,衰老在 IPF 发生发展过程中起到了关键性的作用,其中 AEC II 的衰老与 IPF 的发生发展的关系尤为密切^[1,14-16]。已探明的参与 IPF 疾病发展和进展的机制有包括肺上皮的重复性损伤、肌成纤维细胞的激活和增殖以及 ECM 产生量发生改变在内的多种原因,它们共同造成了肺的结构及其功能的损坏。流行病学调查表明,IPF 主要发生在 60 岁以上的人群中^[16]。此外,大量的研究结果表明,当 AEC IIs/ASCs 衰老时,由于这些衰老的细胞占据着干细胞生态位,导致机体不能正常新陈代谢以产生新的 AEC 去维持肺泡上皮的稳态和修复损伤的上皮组织^[17-19]。并且衰老的 AEC II 可以通过引发氧化应激和炎症反应来启动异常组织修复过程和继发性衰老的恶性循环^[20,21]。这反过来导致正常组织结构和功能的进一步被破坏,还会通过产生活性氧和衰老相关分泌表型(SASP),最终导致肺纤维化。

细胞衰老受复杂的信号转导通路调控,其中 p53/p16 轴是现阶段最受关注的信号通路之一^[22,23]。P53 作为中心环节,它的活性常常会影响着下游多个基因的转录调控和转录后调控,如 p21、p16 等^[24,25]。有学者发现,与正常人的肺上皮细胞相比,IPF 患者的肺上皮细胞中 p53、p21 和 p16 的表达水平显著升高,且伴随着衰老相关 β -半乳糖苷酶(SA- β -gal)的活性增加,表明 IPF 的发生发展与 p53/p16 轴的活性息息相关^[2,26-28]。我们先前的研究证明了活性维生素 D 在预防衰老相关骨质疏松症中起到重要作用,其主要方式是活性维生素 D 通过 VDR 介导转录上调 Ezh2 表达,使 H3K27me3 富集,抑制 p16 的转录水平,以达到促进骨髓间充质干细胞增殖和成骨作用的目的,揭示了其在预防老年性骨质疏松症中的重要作用^[29-31]。

维生素 D 缺乏自发现以来,一直是一个困扰全世界医疗工作者的公共卫生问题。据统计截止目前全世界约有 10 亿人患有维生素 D 缺乏症^[32]。众所周知,维生素 D 与骨代谢平衡有着密不可分的关系,除此之外,也有多项研究表明维生素 D 缺乏与急性肾损伤^[33]、心血管疾病^[34]、阿尔兹海默症^[35]、甚至癌症^[36]、COVID-19^[36-38]有着密不可分的关系。维生素 D 的重要性可见一斑。

而最近的几项流行病学研究也表明维生素 D 缺乏与哮喘、慢性阻塞性肺病(COPD)、囊性纤维化和呼吸道感染等呼吸道疾病的发生风险之间存在联系^[33,39-41]。有一项研究表明,当研究者对小鼠全身施用预防性剂量的维生素 D 时,可显著减轻博莱霉素导致的小鼠肺纤维化^[5]。根据这些研究结果,我们提出

合理猜想:维生素 D 缺乏与 IPF 发生发展过程息息相关。但通过查阅文献,我们发现目前关于维生素 D 在肺纤维增生性疾病中的作用的数据较少。因此为了评估活性维生素 D 在预防肺纤维化中的潜在作用,我们比较了 7 周龄活性维生素 D 缺乏小鼠($1\alpha(\text{OH})\text{ase}^{-/-}$ 小鼠)与 7 周龄的野生型同窝小鼠的肺表型,以求进一步阐明两者间的关系。

我们通过不同组小鼠的肺功能结果发现 VDR 缺乏会导致小鼠肺通气阻力和通气顺应性降低,通过 HE 染色发现,在 1α -羟化酶基因敲除敲除后,聚集在气囊壁周围的间质空间中的炎症细胞数量也逐渐增多,这可能与维生素 D 缺乏会导致细胞衰老过程加速并造成 DNA 损伤程度累积有关。之后我们通过免疫组化染色发现 $1\alpha(\text{OH})\text{ase}^{-/-}$ 小鼠肺组织 p53、p16 阳性细胞明显增多,这与我们之前的猜测是一致的,说明在小鼠肺组织中活性维生素 D 可能通过灭活 p53 和 p16 信号通路,发挥抑制细胞衰老的作用,从而保护肺组织正常行使功能。本文没有采用上下调 p53 的方式或其它类似的拯救实验去进一步探究活性维生素 D 通过调节 p53/p16 信号通路,抑制细胞衰老在防治肺纤维化中的作用,后续试验将涉及到这一方面的研究。

参考文献(References)

- King T E, Jr., Pardo A, Selman M. Idiopathic pulmonary fibrosis[J]. *Lancet*, 2011, 378: 1949-1961
- Faner R, Rojas M, Macnee W, et al. Abnormal lung aging in chronic obstructive pulmonary disease and idiopathic pulmonary fibrosis[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2012, 186: 306-313
- Schafer M J, White T A, Iijima K, et al. Cellular senescence mediates fibrotic pulmonary disease[J]. *Nat Commun*, 2017, 8: 14532
- Dusso A S, Brown A J, Slatopolsky E. Vitamin D [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2005, 289: F8-28
- Tzilias V, Bouros E, Barbayianni I, et al. Vitamin D prevents experimental lung fibrosis and predicts survival in patients with idiopathic pulmonary fibrosis[J]. *Pulm Pharmacol Ther*, 2019, 55: 17-24
- Tian Y, Li H, Qiu T, et al. Loss of PTEN induces lung fibrosis via alveolar epithelial cell senescence depending on NF-kappaB activation[J]. *Aging Cell*, 2019, 18: e12858
- Upagupta C, Shimbori C, Alsilmi R, et al. Matrix abnormalities in pulmonary fibrosis[J]. *Eur Respir Rev*, 2018: 27
- Moimas S, Salton F, Kosmider B, et al. miR-200 family members reduce senescence and restore idiopathic pulmonary fibrosis type II alveolar epithelial cell transdifferentiation[J]. *ERJ Open Res*, 2019: 5
- Lederer D J, Martinez F J. Idiopathic Pulmonary Fibrosis[J]. *N Engl J Med*, 2018, 378: 1811-1823
- Olson A L, Gifford A H, Inase N, et al. The epidemiology of idiopathic pulmonary fibrosis and interstitial lung diseases at risk of a progressive-fibrosing phenotype[J]. *Eur Respir Rev*, 2018: 27
- Meiners S, Eickelberg O, Konigshoff M. Hallmarks of the ageing lung[J]. *Eur Respir J*, 2015, 45: 807-827
- Richeldi L, du Bois R M, Raghu G, et al. Efficacy and safety of nintedanib in idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *N Engl J Med*, 2014, 370: 2071-2082
- Noble P W, Albera C, Bradford W Z, et al. Pirfenidone in patients with idiopathic pulmonary fibrosis (CAPACITY): two randomised trials[J]. *Lancet*, 2011, 377: 1760-1769

- [14] Wolters P J, Collard H R, Jones K D. Pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis[J]. *Annu Rev Pathol*, 2014, 9: 157-179
- [15] Bagnato G, Harari S. Cellular interactions in the pathogenesis of interstitial lung diseases[J]. *Eur Respir Rev*, 2015, 24: 102-114
- [16] He Y, Thummuri D, Zheng G, et al. Cellular senescence and radiation-induced pulmonary fibrosis[J]. *Transl Res*, 2019, 209: 14-21
- [17] Citrin D E, Shankavaram U, Horton J A, et al. Role of type II pneumocyte senescence in radiation-induced lung fibrosis [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2013, 105: 1474-1484
- [18] Mailleux A A, Crestani B. Licence to kill senescent cells in idiopathic pulmonary fibrosis[J]. *Eur Respir J*, 2017: 50
- [19] Oda T, Sekimoto T, Kurashima K, et al. Acute HSF1 depletion induces cellular senescence through the MDM2-p53-p21 pathway in human diploid fibroblasts[J]. *J Cell Sci*, 2018: 131
- [20] Yu W, Dong X, Dan G, et al. Vitamin D3 protects against nitrogen mustard-induced apoptosis of the bronchial epithelial cells via activating the VDR/Nrf2/Sirt3 pathway[J]. *Toxicol Lett*, 2022, 354: 14-23
- [21] Liu N, Li X, Fu Y, et al. Inhibition of lung cancer by vitamin D depends on downregulation of histidine-rich calcium-binding protein[J]. *J Adv Res*, 2021, 29: 13-22
- [22] Eckner R. p53-dependent growth arrest and induction of p21: a critical role for PCAF-mediated histone acetylation[J]. *Cell Cycle*, 2012, 11: 2591-2592
- [23] Lomas N J, Watts K L, Akram K M, et al. Idiopathic pulmonary fibrosis: immunohistochemical analysis provides fresh insights into lung tissue remodelling with implications for novel prognostic markers[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2012, 5: 58-71
- [24] Lehmann M, Hu Q, Hu Y, et al. Chronic WNT/beta-catenin signaling induces cellular senescence in lung epithelial cells [J]. *Cell Signal*, 2020, 70: 109588
- [25] Dao K H, Rotelli M D, Petersen C L, et al. FANCL ubiquitinates beta-catenin and enhances its nuclear function [J]. *Blood*, 2012, 120: 323-334
- [26] Wu Q, Zhou Y, Feng F C, et al. Probing into the Mechanism of Alkaline Citrus Extract Promoted Apoptosis in Pulmonary Fibroblasts of Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis Mice [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2018, 2018: 9658950
- [27] Yang Y, Li Q, Wei S, et al. STAT6/VDR Axis Mitigates Lung Inflammatory Injury by Promoting Nrf2 Signaling Pathway [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2022, 2022: 2485250
- [28] Chauss D, Freiwald T, McGregor R, et al. Autocrine vitamin D signaling switches off pro-inflammatory programs of TH1 cells [J]. *Nat Immunol*, 2022, 23: 62-74
- [29] Barnes P J, Baker J, Donnelly L E. Cellular Senescence as a Mechanism and Target in Chronic Lung Diseases [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2019, 200: 556-564
- [30] Brandenberger C, Muhlfeld C. Mechanisms of lung aging [J]. *Cell Tissue Res*, 2017, 367: 469-480
- [31] Yang R, Zhang J, Li J, et al. Inhibition of Nrf2 degradation alleviates age-related osteoporosis induced by 1,25-Dihydroxyvitamin D deficiency[J]. *Free Radic Biol Med*, 2022, 178: 246-261
- [32] Pfothner K M, Shubrook J H. Vitamin D Deficiency, Its Role in Health and Disease, and Current Supplementation Recommendations [J]. *J Am Osteopath Assoc*, 2017, 117: 301-305
- [33] Jiang S, Huang L, Zhang W, et al. Vitamin D/VDR in Acute Kidney Injury: A Potential Therapeutic Target[J]. *Curr Med Chem*, 2021, 28: 3865-3876
- [34] Morita H, Komuro I. Heart Failure as an Aging-Related Phenotype[J]. *Int Heart J*, 2018, 59: 6-13
- [35] Lai R H, Hsu Y Y, Shie F S, et al. Non-genomic rewiring of vitamin D receptor to p53 as a key to Alzheimer's disease [J]. *Aging Cell*, 2021, 20: e13509
- [36] Gayan-Ramirez G, Janssens W. Vitamin D Actions: The Lung Is a Major Target for Vitamin D, FGF23, and Klotho [J]. *JBM R Plus*, 2021, 5: e10569
- [37] Mogal M R, Sompal S A, Junayed A, et al. Common genetic aspects between COVID-19 and sarcoidosis: A network-based approach using gene expression data[J]. *Biochem Biophys Rep*, 2022, 29: 101219
- [38] Kolls J K, Garry R F. Role of the T cell vitamin D receptor in severe COVID-19[J]. *Nat Immunol*, 2022, 23: 5-6
- [39] Uhl F E, Vierkotten S, Wagner D E, et al. Preclinical validation and imaging of Wnt-induced repair in human 3D lung tissue cultures[J]. *Eur Respir J*, 2015, 46: 1150-1166
- [40] Basit S. Vitamin D in health and disease: a literature review [J]. *Br J Biomed Sci*, 2013, 70: 161-172
- [41] Holick M F. Vitamin D deficiency[J]. *N Engl J Med*, 2007, 357: 266-281