文章编号:1000-5404(2013)05-0431-04

论著

百合多糖联合BMSCs移植减轻小鼠肺纤维化的实验研究

骆亚莉[1],王雅莉[1],潘 政[2],李能莲[1],李 屹[3],闫 旭[4],张 立[1] (730000 兰州,甘肃中医学院:基础部病理学教研室[1],药学系[4];730030 兰州,兰州大学第二医院急诊ICU[2]; 730000 兰州,兰州大学基础医学院[3])

[摘要] **目的** 观察百合多糖联合BMSCs移植是否影响小鼠肺纤维化的形成。**方法** 培养小鼠BMSCs做移植备用。90只SPF小鼠按随机数字表法分为对照组(C)、模型组(M)、百合多糖联合BMSCs组(A)、BMSCs组(B)、百合多糖组(L),每组18只。建立肺纤维化小鼠模型,24 h后各组给予相应处理。第7、14、28天行肺组织病理评分。第28天观察各组肺系数、肺组织胶原沉积、羟脯氨酸(HYP)含量、Western blot检测肺组织TNF-α和NF-κB蛋白表达情况。**结果** 与C组相比,M组肺系数、病理形态评分、HYP含量、肺组织TNF-α、NF-κB表达均增高($P<0.05$)。与M组相比,A组、L组各指标均降低($P<0.05$),B组第28天病理评分降低($P<0.05$)。M组有大量胶原沉积,各干预组胶原沉积均较轻。**结论** 百合多糖联合BMSCs移植后抑制肺纤维化小鼠肺组织的TNF-α、NF-κB的表达,减轻肺纤维化的病理损伤,联合干预的效果强于单用百合多糖或单用BMSCs移植。

[关键词] 肺纤维化;百合多糖;骨髓间充质干细胞;肿瘤坏死因子-α;核转录因子-κB
[中图法分类号] R285.5; R329.2; R563.9 [文献标志码] A

Effect of lily polysaccharides combined with BMSCs transplantation on expression of TNF-α and NF-κB in bleomycin-induced pulmonary fibrosis mice

Luo Yali[1], Wang Yali[1], Pan Zheng[2], Li Nenglian[1], Li Yi[3], Yan Xu[4], Zhang Li[1] ([1]Department of Pathology, College of Basic Medicine, [4]Faculty of Pharmacy, Gansu College of Tradition Chinese Medicine, Lanzhou, Gansu Province, 730000; [2]Department of Emergency ICU, Second Hospital, Lanzhou University, Lanzhou, Gansu Province, 730030; [3]Medicine College, Lanzhou University, Lanzhou, Gansu Province, 730000, China)

[**Abstract**] Objective To determine the effect of lily polysaccharides combined with bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) transplantation on bleomycin-induced pulmonary fibrosis mice. Methods BMSCs of mice were cultured *in vitro*. Ninety healthy SPF mice were randomly divided into a control group (C), a model group (M), a bleomycin + lily polysaccharides combined with BMSCs transplantation group (A), a bleomycin + BMSCs transplantation group (B), and a bleomycin + lily polysaccharides group (L). The mice of each group were treated with the corresponding measures at 24 h after the mouse models of pulmonary fibrosis were constructed by bleomycin. On the 7th, 14th and 28th day, the mice were sacrificed and the pathological scores of lung tissues were determined by HE staining. On the 28th day, the lung coefficient (LC) and hydroxyproline (HYP) content were determined, lung collagen deposition was observed by Masson trichrome staining, and the expression levels of TNF-α and NF-κB in lung tissues was measured by Western blot analysis. Results There were significant differences in the LC, HYP content, pathological score, and the expression levels of TNF-α and NF-κB in lung tissues between group C and group M ($P<0.05$). Compared with group M, those indices significantly decreased in group A and group L ($P<0.05$), and the pathological score on the 28th day significantly decreased in group B ($P<0.05$). The collagen deposition in group M was greater than that in group A, group L and group B. Conclusion Lily polysaccharides combined with BMSCs transplantation can reduce the expression levels of TNF-α and NF-κB in lung tissues and pulmonary pathological changes in bleomycin-induced pulmonary fibrosis mice. The effect of combined intervention is better than that of lily polysaccharides or BMSCs transplantation alone.

[**Key words**] pulmonary fibrosis; lily polysaccharides; BMSCs; TNF-α; NF-κB

Supported by the Foundation for Young and Middle-aged Scholars of Gansu College of Tradition Chinese Medicine (ZQ09-10). Corresponding author: Luo Yali, Tel: 86-931-8760091, E-mail: mailoflyl@126.com

[基金项目] 甘肃中医学院中青年基金(ZQ09-10)
[通信作者] 骆亚莉,电话:(0931)8760091,E-mail:mailoflyl@126.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20121219.1739.011.html(2012-12-19)

目前对肺纤维化临床疗效有限患者的病死率高[1]。骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)在肺纤维化修复中可能起积极作用。百合常用于治疗慢性支气管炎,鲜见对肺纤维化治疗的报道。研究[2]发现 TNF-α、NF-κB 与肺纤维化的形成密切相关。本实验利用博莱霉素建立肺纤维化小鼠模型,Western blot 检测肺组织 TNF-α、NF-κB 的变化,探讨百合多糖联合 BMSCs 移植对肺纤维化的干预作用。

1 材料与方法

1.1 实验材料

SPF 级昆明种小鼠 90 只,4~5 周龄,体质量 18~22 g,雌雄各半。购自甘肃中医学院实验动物中心,质量合格证号:SCXK(甘)2011-0001。

小鼠 BMSCs 株由兰州军区总医院骨研所赵红斌博士馈赠,购自美国 ATCC 公司(CRL-10925)。

博来霉素(bleomycin,BLM)粉针剂购于哈尔滨莱博通药业,批号 110424。生理盐水配制浓度为 1.6 g/L。百合饮片购自甘肃兰州惠特药业。水提醇沉法提取百合多糖(lily polysaccharide,LP)。剂量按照临床用量换算,蒸馏水配制浓度为 10 g/L。兔抗小鼠 TNF-α 单克隆抗体购于美国 Cst 公司,兔抗小鼠 NF-κB 单克隆抗体购于英国 Abcam 公司,羟脯氨酸试剂盒购于南京建成生物工程有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 小鼠 BMSCs 的培养 将小鼠 BMSCs 株细胞按照密度为 1×10^6/mL 接种于中培养瓶,37 ℃、5% CO_2 培养箱中静置培养。细胞长至 80%~90% 融合时,D-Hanks 洗涤,0.25% 胰酶消化,传代培养。从原代起各代细胞依次记作:F0、F1、F2、F3。倒置相差显微镜下动态观察生长情况及形态特征。移植前 3 d 用 DAPI 标记。

1.2.2 小鼠肺纤维化模型制备与分组 动物适应性饲养 1 周,按随机数字表法分为 5 组:百合多糖组(L)、模型组(M)、百合多糖联合 BMSCs 组(A)、BMSCs 组(B)、对照组(C),每组 18 只。

乙醚麻醉小鼠,颈正中切口暴露气管。模型组和各干预组经气管软骨环间隙向心端穿刺注入博莱霉素 0.05 mL(含药 0.08 mg),对照组注入等体积生理盐水,严格无菌操作。24 h 后,A 组及 L 组均给予百合多糖 0.5 mL 灌胃,C 组生理盐水灌胃,连续 28 d。同时 A、B 组均经尾静脉一次性移植 DAPI 提前标记的 BMSCs 2.5×10^6个(溶于生理盐水 1 mL),L 组同法注射生理盐水。第 7、14、28 天分批将小鼠做相应处理后,检测相关指标。

1.2.3 标本采集 小鼠摘除眼球放血处死后取出肺脏。计算肺系数:肺系数 = 肺质量(mg)/体质量(g)。左肺上叶福尔马林液固定待制备病理切片及 HE、Masson 染色。左肺下叶、右肺液氮冷冻待行肺组织羟脯氨酸含量(hydroxyproline,HYP)测定及 Western blot 检测 TNF-α、NF-κB 的表达。

1.2.4 HE 染色 石蜡包埋,常规切片,HE 染色,光镜观察。参照 Szaopiel 等[3]方法将肺泡炎和肺纤维化程度分为 4 级:0 级无明显改变;1 级轻度,病变范围 <20%;2 级中度,病变范围占 20%~50%;3 级重度,病变范围 >50%。两名病理教研室教师对每组 6 只动物分别评分,0 级计 0 分,1 级计 1 分,依此类推,求均值。

1.2.5 Masson 三色法染色 石蜡切片脱蜡至水,苏木精液染核。Masson 丽春红酸性复红液染色,磷钼酸处理,苯胺蓝复染,冰醋酸浸洗。胶原纤维呈蓝色,若光绿液染色为绿色。

1.2.6 肺组织 HYP 含量测定 参照试剂盒说明采用碱水法测定。HYP 含量能反映结缔组织中的胶原蛋白含量和肺纤维化程度。

1.2.7 Western blot 检测 TNF-α、NF-κB 的表达 提取肺组织总蛋白,用牛血清白蛋白制作标准曲线,检测蛋白含量。制胶,样品变性,上样,电泳,转膜。将封闭后的膜依次放入稀释的一抗、二抗工作液中孵育。TBST 漂洗。显影,凝胶成像系统进行扫描、拍照。β-actin 蛋白作为内参,将 TNF-α/β-actin 和 NF-κB /β-actin 的灰度比值分别作为 TNF-α、NF-κB 的相对表达水平进行比较。

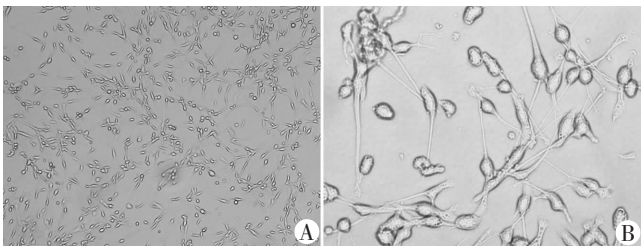
1.3 统计学方法

计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示,SPSS 14.0 统计软件行单因素方差分析,组间两两比较用 t 检验。

2 结果

2.1 小鼠 BMSCs 培养情况

接种后细胞呈圆形、椭圆形,大小不一。换液后,贴壁细胞数量增多,形态均一,排列紧密,多呈长梭形,相互融合成片状。经胰酶消化后呈圆形,2~3 h 后开始贴壁伸展,逐渐恢复为长梭形、多角形。传代后 72 h 基本铺满瓶底,形态均匀,融合后呈典型的漩涡状生长。见图 1。取 F3 代细胞做移植备用。



A:100 倍;B:400 倍

图 1 倒置相差显微镜观察传代 72 h(F3)小鼠 BMSCs 的形态变化

2.2 第 28 天肺系数、肺组织 HYP 含量比较

各组与对照组相比肺系数均增高($P<0.05$,$P<0.01$)。与模型组比较,联合组($P<0.01$)及百合多糖组($P<0.05$)肺系数均降低,BMSCs 组肺系数无明显变化($P>0.05$)。见表 1。

模型组、百合多糖组及 BMSCs 组 HYP 含量均比对照组增高($P<0.05$,$P<0.01$)。联合组及百合多糖组 HYP 含量均低于模型组($P<0.05$),BMSCs 组 HYP 含量与模型组相比无明显变化($P>0.05$)。见表 1。

表 1　各组小鼠肺系数、肺组织 HYP 含量结果($n=6, \bar{x}\pm s$)

组别	肺系数(mg/g)	HYP 含量(μg/mg)
C 组	8.03 ±0.96	0.51 ±0.09
M 组	16.99 ±3.88[b]	1.15 ±0.23[b]
A 组	11.84 ±1.60[ad]	0.68 ±0.03[c]
B 组	14.48 ±2.15[a]	1.04 ±0.16[a]
L 组	13.09 ±2.76[ac]	0.73 ±0.05[ac]

a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与 C 组比较;c:$P<0.05$,d:$P<0.01$,与 M 组比较

2.3　不同时间点肺组织病理形态评分比较

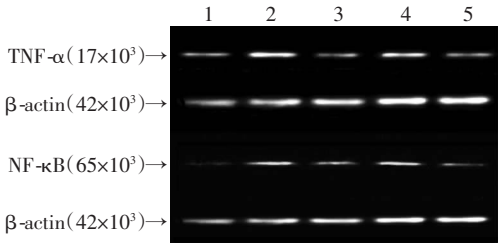
第 7 天,各组与对照组相比肺泡炎表现均增强($P<0.05$,$P<0.01$),无明显肺纤维化表现。第 14、28 天,各组与对照组相比肺泡炎及肺纤维化表现均增强($P<0.05$,$P<0.01$)。与同时间点模型组比较,联合组肺泡炎及肺纤维化表现均减弱($P<0.05$),第 7 天百合多糖组肺泡炎表现减弱($P<0.05$),第 28 天 BMSCs 组肺泡炎及肺纤维化表现均减弱($P<0.05$)。见图 2、表 2。

2.4　第 28 天胶原沉积情况

模型组支气管黏膜下、血管壁及周围、肺泡壁、肺间质均有大量胶原沉积。对照组胶原沉积不明显。联合组、百合多糖组、BMSCs 组与模型组相比胶原沉积均较轻。见图 3。

2.5　第 28 天 TNF-α、NF-κB 在肺组织内的表达

与对照组比较,模型组肺组织 TNF-α、NF-κB 蛋白表达均明显增高($P<0.01$)。与模型组比较,联合组、百合多糖组 TNF-α、NF-κB 蛋白表达均明显降低($P<0.05$,$P<0.01$),BMSCs 组蛋白表达变化不明显($P>0.05$)。见图 4、表 3。



1:C 组;2:M 组;3:A 组;4:B 组;5:L 组

图 4　Western blot 检测各组小鼠肺组织 TNF-α、NF-κB 蛋白的表达

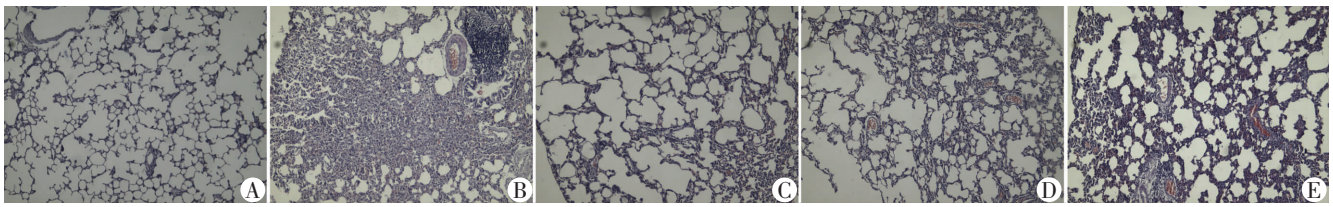
表 3　各组小鼠 TNF-α、NF-κB 平均灰度表达水平比较($n=6, \bar{x}\pm s$)

组别	TNF-α	NF-κB
C 组	0.29 ±0.03	0.11 ±0.02
M 组	0.74 ±0.06[b]	0.68 ±0.05[b]
A 组	0.33 ±0.04[d]	0.37 ±0.03[ac]
B 组	0.61 ±0.09[b]	0.56 ±0.07[b]
L 组	0.46 ±0.07[ac]	0.35 ±0.05[ac]

a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与 C 组比较;c:$P<0.05$,d:$P<0.01$,与 M 组比较

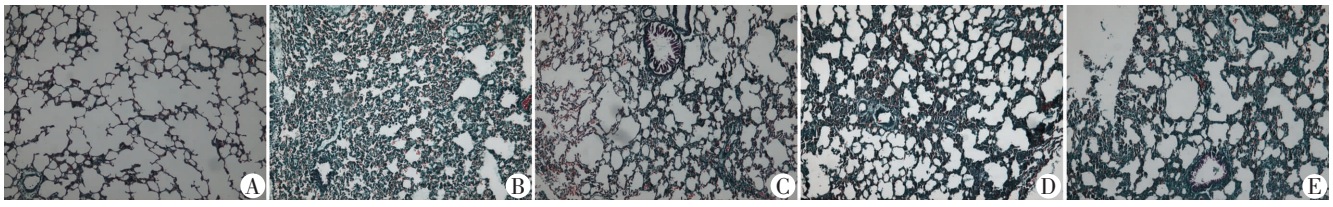
3　讨论

研究[4]发现,BMSCs 移植可减轻甚至部分逆转肺纤维化病理状态,对肺损伤动物模型具有一定的保护意义,BMSCs 可在体外诱导分化为Ⅱ型肺泡上皮细胞[5],在肺纤维化治疗中可能存在潜在应用价值。本实验单用 BMSC 移植干预后仅病理形态评分与模型组



A: C 组;B: M 组;C: A 组;D: B 组;E: L 组

图 2　第 28 天各组小鼠肺组织病理学变化　(HE ×100)



A: C 组;B: M 组;C: A 组;D: B 组;E: L 组

图 3　第 28 天各组小鼠肺组织胶原沉积表现　(Masson ×100)

表 2　各组小鼠不同时相点病理形态评分结果($n=6, \bar{x}\pm s$)

组别	7 d		14 d		28 d	
	肺泡炎	肺纤维化	肺泡炎	肺纤维化	肺泡炎	肺纤维化
C 组	0.33 ±0.02	0.36 ±0.03	0.35 ±0.02	0.33 ±0.02	0.31 ±0.03	0.29 ±0.01
M 组	2.15 ±0.07[b]	0.51 ±0.09	2.59 ±0.25[b]	1.76 ±0.14[a]	1.31 ±0.14[b]	2.72 0.37[b]
A 组	1.47 ±0.05[ad]	0.45 ±0.05	1.95 ±0.08[bc]	1.28 ±0.04[ac]	0.72 ±0.09[ac]	1.72 ±0.17[bc]
B 组	2.01 ±0.05[b]	0.48 ±0.06	2.41 ±0.07[b]	1.69 ±0.16[a]	0.89 ±0.05[ac]	2.09 ±0.13[bc]
L 组	1.76 ±0.04[bc]	0.47 ±0.08	2.22 ±0.26[b]	1.52 ±0.05[a]	1.18 ±0.27[b]	2.55 ±0. 41[b]

a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与 C 组比较;c:$P<0.05$,d:$P<0.01$,与 M 组比较

相比差异显著,其他指标无明显变化,提示单用BMSCs移植对肺纤维化损伤的保护意义有限。

现代药理研究[6]表明,百合具有润肺、补肺气、止咳、消炎、增强免疫等功效。百合多糖具有抗氧化、抗肿瘤等多方面药理作用[7]。本实验中单用百合多糖对动物进行干预后与模型组比较,肺系数及肺组织HYP含量下降,病理损伤变化减轻、胶原沉积减少,提示有一定抗肺纤维化损伤效果,这与本课题组前期实验结果相符。百合多糖联合BMSCs移植干预后与模型组比较各指标变化更加显著,提示单用百合多糖不如联合BMSCs移植的综合干预效果明显。

TNF-α可诱导一系列细胞因子的产生,激活和促进其他炎性因子合成及分泌。病毒转染TNF-α的cDNA后,小鼠肺内炎性细胞聚集增加,成纤维细胞聚集且细胞外基质沉积[8]。肺纤维化大鼠肺泡区TNF-α的mRNA表达增加,以博来霉素处理转基因TNF-α缺陷小鼠,其肺纤维化的程度较对照组明显减轻[9]。本实验结果显示模型组肺组织中TNF-α表达比对照组明显增高。百合多糖联合BMSCs移植干预后TNF-α的表达均比模型组显著下降,提示联合干预发挥抗肺纤维化的作用可能与抑制TNF-α的活化相关。

肺纤维化发生过程中,当细胞外信号作用于肺细胞,可能通过激活细胞质中多种信号转导通路,激活核转录因子调控多种与纤维化相关的基因表达,形成瀑布效应[10]。核转录因子NF-κB在肺纤维化形成过程中能与多种基因启动子或增强子κB序列位点发生特异性结合并促进其转录[11],在炎症和免疫反应中起枢纽作用[12],通过调控炎性分子基因的表达而参与肺纤维化的发生过程。本实验结果显示,模型组肺组织NF-κB表达比对照组明显增高。与上述研究结果一致。百合多糖联合BMSCs移植干预后肺组织NF-κB的表达比模型组显著下降,符合文献[13]报道下调NF-κB的转录活性可能抑制肺损伤和肺纤维化。提示联合干预可能与抑制NF-κB的活化相关。

有研究[14]发现TNF-α可能通过促进NF-κB抑制蛋白(IκB)磷酸化激活NF-κB信号通路,TNF-α可能是NF-κB活化的始动因素之一。如何通过调节TNF-α、NF-κB信号传导途径从而干预肺纤维化形成还有待进一步研究。

参考文献:

[1] Lee J S, McLaughlln S, Collard H R. Comprehensive care of the patient with idiopathic pulmonary fibrosis[J]. Curr Opin Pulm Med, 2011, 17(5): 348-354.

[2] 田莉, 王献华, 马小兵, 等. TNF-α介导的NF-κB信号通路在肺纤维化中的作用[J]. 现代预防医学, 2011, 38(2): 361-363, 365.

[3] Szapiel S V, Elson N A, Fulmer J D, *et al*. Bleomycin-induced interstitial pulmonary disease in the nude, athymic mouse[J]. Am Rev Respir Dis, 1979, 120(4): 893-899.

[4] Zhang X, Wang H, Shi Y, *et al*. Role of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in the prevention of hyperoxia-induced lung injury in newborn mice[J]. Cell Biol Int, 2012, 36(6): 589-594.

[5] Ma N, Gai H, Mei J, *et al*. Bone marrow mesenchymal stem cells can differentiate into type II alveolar epithelial cells *in vitro*[J]. Cell Biol Int, 2011, 35(12): 1261-1266.

[6] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 88.

[7] 赵国华, 李志孝, 陈宗道. 百合多糖的化学结构及抗肿瘤活性[J]. 食品与生物技术, 2002, 21(1): 62-66.

[8] Adamali H, Armstrong M E, McLaughlin A M, *et al*. Macrophage migration inhibitory factor enzymatic activity, lung inflammation, and cystic fibrosis[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2012, 186(2): 162-169.

[9] Madtes D K, Elston A L, Hackman R C, *et al*. Transforming growth factor-alpha deficiency reduced pulmonary fibrosis in transgenic mice[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 1999, 20(5): 924-934.

[10] Bhattacharyya S, Wu M, Fang F, *et al*. Early growth response transcription factors: key mediators of fibrosis and novel targets for anti-fibrotic therapy[J]. Matrix Biol, 2011, 30(4): 235-242.

[11] El-Khouly D, El-Bakly W M, Awad A S, *et al*. Thymoquinone blocks lung injury and fibrosis by attenuating bleomycin-induced oxidative stress and activation of nuclear factor Kappa-B in rats[J]. Toxicology, 2012, 302(2/3): 106-113.

[12] Bodas M, Vij N. The NF-kappaB signaling in cystic fibrosis lung disease: pathophysiology and therapeutic potential[J]. Discov Med, 2010, 9(47): 346-356.

[13] 张晓晔, 周妍, 刘卫青, 等. 核因子κB反义寡核苷酸对博莱霉素致小鼠肺间质纤维化形成及白细胞介素4表达的影响[J]. 中华医学杂志, 2007, 87(3): 195-199.

[14] Krug L T, Torres-Gonzalez E, Qin Q, *et al*. Inhibition of NF-kappaB signaling reduces virus load and gammaherpesvirus-induced pulmonary fibrosis[J]. Am J Pathol, 2010, 177(2): 608-621.

(**收稿**:2012-10-03;**修回**:2012-12-06)

(编辑 汪勤俭)