

• 研究简报 •

康复新液对转化生长因子- β 1 诱导人胚肺成纤维细胞模型的干预作用

徐秋颖¹, 刘伟伟¹, 王宝家¹, 马秀英², 高永翔^{1*}

(1. 成都中医药大学基础医学院, 四川 成都 610075; 2. 药用美洲大蠊四川省重点实验室, 四川 成都 610000)

摘要: 为探讨康复新液对肺纤维化细胞模型的干预作用, 以转化生长因子 (transforming growth factor, TGF)- β 1 诱导人胚肺成纤维细胞 MRC-5 构建肺纤维化细胞模型, 并运用 CCK8 (cell counting kit-8) 法检测康复新液对 MRC-5 细胞的毒性。以测得的最高不致死给药浓度干预诱导 MRC-5 细胞模型, 进而通过荧光实时定量 PCR (qRT-PCR) 和蛋白质免疫印迹 (WB) 检测细胞纤维化指标在 mRNA 及蛋白质的水平变化。结果显示: TGF- β 1 在 10 ng/mL 的质量浓度下可成功诱导 MRC-5 细胞发生纤维化, 且细胞内 I 型胶原 (Collagen I)、III 型胶原 (Collagen III)、结缔组织生长因子 (connective tissue growth factor, CTGF)、层 n 黏连蛋白 (laminin, LN)、纤维连结蛋白 (fibronectin, FN)、 α -平滑肌肌动蛋白 (α -smooth muscle actin, α -SMA) 的 mRNA 表达水平均显著升高; 以 80 倍稀释的康复新液为最高不致死给药浓度, 对 MRC-5 细胞纤维化模型进行干预, 上述纤维化指标在 mRNA 及蛋白质水平均出现显著下降, 与地塞米松 (Dexamethasone, DXM) 的干预效果相当。综上, 康复新液可改善由 TGF- β 1 诱导 MRC-5 细胞纤维化的表型, 有望被应用于肺纤维化的治疗。

关键词: 康复新液; 肺纤维化; 转化生长因子; MRC-5 细胞

中图分类号: R-33 **文献标志码:** A

肺纤维化 (pulmonary fibrosis) 发生于许多不同病因引发的肺间质疾病, 生理特点表现为肺泡持续性损伤、成纤维细胞 (fibroblast) 增殖及大量细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 沉积, 从而导致肺组织反复破坏、修复, 最终造成肺组织中的大量胶原沉积^[1]。

康复新液是由美洲大蠊 (*Periplaneta americana* L.) 干燥虫体的乙醇提取物制成的溶液, 其主要成分包括氨基酸 (17 种以上, 包含人体必须氨基酸)、多肽类 (抗菌肽、咽侧体抑制

神经肽、焦激肽等)、多糖类(硫酸粘多糖等)、核苷类(肌酐、次黄嘌呤、尿嘧啶等)及油脂类等^[2]。《神农本草经》记载其“味咸、寒,生川泽,治血癖症坚、寒热,破积聚,喉咽痹,内寒无子”。康复新液可“通利血脉,养阴生肌”,内服可治消化道出血与溃疡等,外用可疗金疮、外伤等,具有改善黏膜创面微循环、加速机体病损组织修复再生、增强免疫等功能。已有试验研究显示康复新液可以改善实验性结肠炎,治疗小儿手足口病、带状疱疹、干症、头颈部恶性肿瘤等^[3]。随着临床使用康复新液的范围不断扩大,其更多药效有待挖掘,而目前尚无关于康复新液应用于治疗肺纤维化的报道。

在肺纤维化的进程中,许多因子参与调控,其中最重要的是转化生长因子(transforming growth factor, TGF)- β 1^[4-5],它可以促进成纤维细胞的迁移、增殖及转变为肌成纤维细胞,加速纤连蛋白、胶原等细胞外基质的过度分泌,逐渐以纤维组织取代正常的肺组织,对肺功能造成不可逆的破坏。结缔组织生长因子(connective tissue growth factor, CTGF)是 TGF- β 1 诱导的早期基因表达产物,在病理状态下,纤维化的组织中 CTGF 表达量会明显增加^[6]。这个过程中肌成纤维细胞会表达 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)这种独特的分子^[7],而 α -SMA 增多可明显增强肌成纤维细胞的迁移及收缩能力,进而增强 ECM 的合成和分泌功能。ECM 的主要成分是纤维连接蛋白(fibronectin, FN)和层黏结蛋白(laminin, LN),其中 FN 可以诱导胶原的形成,从而导致脏器的纤维化^[8]。肺纤维化时还会出现基底膜增厚,主要是与 FN 和 I 型胶原蛋白(Collagen I)表达明显增强有关^[9]。FN、LN 及胶原的合成增多、降解减少可导致 ECM 的过度积聚,从而形成纤维化。本研究选取 α -SMA、LN、FN、CTGF、Collagen I、III 型胶原蛋白(Collagen III)这 6 种因子反映肺部纤维化的程度,作为检测康复新液对肺纤维化是否有效的客观指标。通过肺纤维化中的关键因子 TGF- β 1 诱导人胚肺成纤维细胞(human fetal lung fibroblast) MRC-5 细胞系,构建肺纤维化细胞模型。验证此模型成功后,运用 CCK8 (cell counting kit-8) 法检测康复新液对 MRC-5 细胞的毒性,得出康复新液对 MRC-5 细胞的最高不致死给药浓度。进而使用此安全浓度干预诱导后的 MRC-5 细胞,从而在细胞层面实现康复新液治疗肺纤维化的有效性验证,旨在扩大已上市大品种中成药康复新液的适应范围,从干预肺纤维化的角度对其进行二次开发。

1 材料与方法

1.1 细胞系

MRC-5 细胞来源于中科院上海细胞库,使用 MEM 培养基(Gibco, 41500034),补充

10% (体积分数) 胎牛血清 (Gibco, 10099-141), 于 37 °C、5% (体积分数) 二氧化碳的恒温培养箱中进行培养, 5~7 d 传代, 按 1 瓶细胞传 2~3 瓶的比例进行。

1.2 试剂及耗材

荧光实时定量 PCR (qRT-PCR) 检测试剂 Realtime PCR Master Mix (QPK-201)、反转录试剂 ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix (FSQ-201) 购自 ToYoBo 公司, RNA 抽提试剂 TRIzol™ Plus RNA Purification Kit (12183555) 购自 Invitrogen 公司。地塞米松 (5 mg/mL, 批号 02138) 购自西南药业股份有限公司。Laminin 抗体(ab11575)、Fibronectin 抗体(ab2413)、 α -SMA 抗体 (ab124964) 购自 Abcam 公司, CTGF 抗体 (86641) 购自 CST 公司, Collagen I 抗体 (14695-1-AP) 购自 Proteintech 公司, CollagenIII 抗体 (OM275892) 购自 Omnimabs 公司, 内标 GAPDH 抗体 (200306-7E4)、HRP 标记羊抗鼠 (511103) 与羊抗兔 (511203) 二抗购自 Zen-bioscience 公司。无水乙醇、三氯甲烷、异丙醇等均为国产分析纯试剂。所用耗材均为购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司的一次性无 RNA 酶耗材。

1.3 主要设备和仪器

qRT-PCR 仪 (CFX96, Bio-Rad 公司)、离心机 (5415D, Eppendorf 公司)、微量分光光度计 (Nanodrop2000, Thermo Fisher 公司)、Multiskan spectrum 全波长酶标仪 (Multiskan Spectrum, Thermo Fisher 公司), 高速冷冻离心机 (Legend Microfuge 22R Centrifuge, Thermo Fisher 公司)。

1.4 引物

本研究中所使用的引物由成都擎科梓熙生物技术有限公司合成, 序列见表 1。

表 1 引物名称及序列

Tab.1 Primers and their sequences

名称	序列 (5'→3')
h-Collagen I -F	GAGGGCCAAGACGAAGACATC
h-Collagen I -R	CAGATCACGTCATCGCACAAAC
h-CollagenIII-F	TTGAAGGAGGATGTTCCCATCT
h-CollagenIII-R	ACAGACACATATTTGGCATGGTT
h- α -SMA-F	GTGTTGCCCTGAAGAGCAT
h- α -SMA-R	GCTGGGACATTGAAAGTCTCA
h-FN-F	CGGTGGCTGTCAGTCAAAG
h-FN-R	AAACCTCGGCTTCCTCCATAA
h-LN -F	GGACGAAAAGAAGTGCTTCCT
h-LN -R	GCAGGGATACCATTCTCTGACT
h-CTGF-F	AAAAGTGCATCCGTACTION

h-CTGF-R	CCGTCGGTACATACTCCACAG
GAPDH-F	ACAACCTTTGGTATCGTGGAAGG
GAPDH-R	GCCATCACGCCACAGTTTC

1.5 细胞模型建立与检测

MRC-5 细胞接种后 24 h 加入 TGF- β 1 (10 ng/mL) 进行诱导^[10], 分别在 0, 48 与 72 h 取样; 使用 TRIzol™ Plus RNA Purification Kit 进行 RNA 抽提, 测定 RNA 浓度及纯度, 并用反转录试剂 ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix 按照 1 μ g/10 μ L 体系进行逆转录; 之后以 GAPDH 为内参, 于 qRT-PCR 仪检测 α -SMA、LN、FN、CTGF、Collagen I、Collagen III 的 mRNA 表达水平。20 μ L 反应体系: SYBR (2 \times) 10 μ L, 上、下游引物各 0.8 μ L, cDNA 模板 2 μ L, 无核酸酶水 6.4 μ L。反应程序: 95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s; 95 $^{\circ}$ C 变性 5 s, 60 $^{\circ}$ C 退火延伸 30 s, 40 个循环。以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行相对表达水平的分析。

1.6 CCK-8 检测

在 96 孔细胞培养板中按照每孔 10^4 个细胞铺板, 24 h 后分别加入 10 倍、20 倍、40 倍、80 倍、160 倍及 320 倍稀释的康复新液 (稀释液使用完全培养基), 同时设置不加药对照; 培养 72 h 后加入 1/10 培养基体积的 CCK-8 试剂, 继续培养 1 h, 酶标仪记录 450 nm 的吸光度, 绘制生长曲线。

1.7 康复新液干预

在 6 孔细胞培养板中每孔接种 10^5 个细胞, 贴壁之后加入 10 ng/mL 的 TGF- β 1 进行纤维化模型诱导, 24 h 后加入 80 倍稀释的康复新液进行干预; 在干预 24, 48 与 72 h 时取样, 用于 qRT-PCR 与蛋白质免疫印迹 (Western blotting, WB) 检测, 同时设置地塞米松 (质量浓度 50 μ g/mL) 阳性对照组, 处理 72 h 后收取样品。分别检测 α -SMA、LN、FN、CTGF、Collagen I、Collagen III 及 GAPDH (内参) 的表达量。qRT-PCR 检测操作参照 1.5 小节步骤。WB 检测操作如下: 使用磷酸盐缓冲液 (PBS) 轻轻洗涤 3 次细胞样品, 加入含蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液, 4 $^{\circ}$ C 下裂解 20 min, 12 000 r/min 离心 5 min 后收取上清; BCA (bicinchoninic acid) 法测定蛋白浓度, 十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离条带, 湿转至聚偏氟乙烯膜, 5% (质量分数) 牛血清白蛋白封闭 1 h 后加入一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, 含 0.5% (体积分数) 吐温-20 的 Tris-盐酸缓冲液 (TBST) 洗涤 3 次后加入对应的辣根过氧化物酶标记二抗, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h 后用 TBST 洗涤 3 次, 加入增强型化学发光底物发光液, 于

化学发光成像仪下拍照。

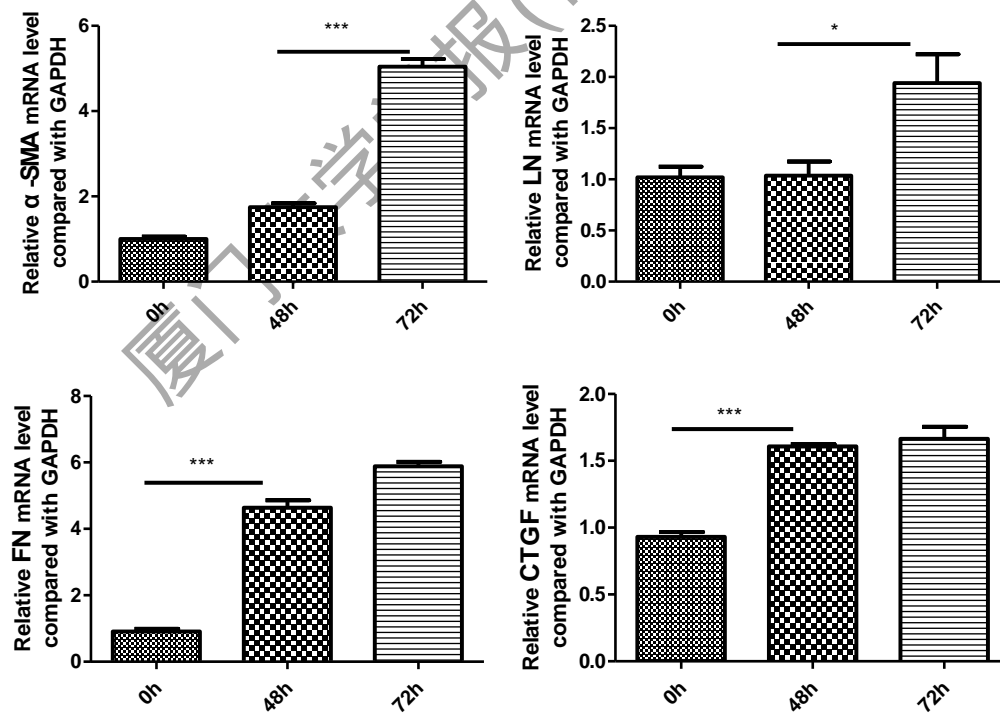
1.8 统计学分析

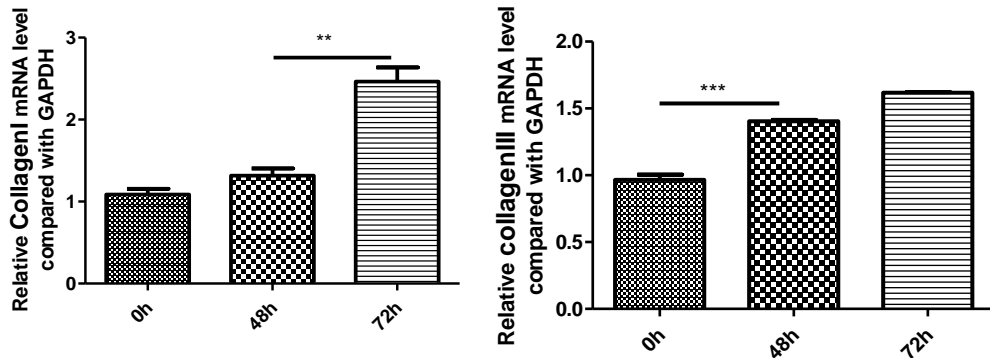
采用 SPSS 13.0 软件进行统计分析，数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示，通过配对样本 t -检验和独立样本 t -检验进行组间比较， $p < 0.05$ 为差异显著。

2 结果与分析

2.1 TGF- β 1 诱导 MRC-5 纤维化细胞模型检测

以 10 $\mu\text{g/L}$ TGF- β 1 处理 MRC-5 细胞，通过 qRT-PCR 分别检测 0, 48, 72 h 后细胞模型中 α -SMA、LN、FN、CTGF、Collagen I、CollagenIII 这 6 个特异性纤维化指标的 mRNA 表达水平，结果如图 1 所示：FN、CTGF、CollagenIII 的 mRNA 表达水平在 48 h 出现显著升高，LN、 α -SMA、Collagen I 的 mRNA 表达水平则在 72 h 出现显著升高，可见 MRC-5 细胞在 TGF- β 1 诱导 48 h 时开始出现纤维化，72 h 时纤维化充分，呈现出一定的时间依赖性，说明 72 h 时此模型诱导成功。





* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, 下同。

图 1 TGF- β 1 诱导 MRC-5 纤维化细胞模型中纤维化指标的 mRNA 表达水平

Fig.1 Relative mRNA expression levels of fibrosis indexes in the MRC-5 cell fibrosis model induced by TGF- β 1

2.2 康复新液对 MRC-5 细胞的毒性检测

通过 CCK-8 法检测不同稀释倍数的康复新液对 MRC-5 细胞的毒性, 结果见图 2: MRC-5 细胞在 10~40 倍稀释的康复新液作用下增殖受强烈抑制, 在 80 倍稀释的康复新液作用下有明显增殖, 160 倍及以上稀释的康复新液作用下与空白对照基本一致。由此可见本研究的最高不致死给药浓度为 80 倍稀释, 因此后续实验中使用 80 倍稀释作为康复新液的处理浓度。

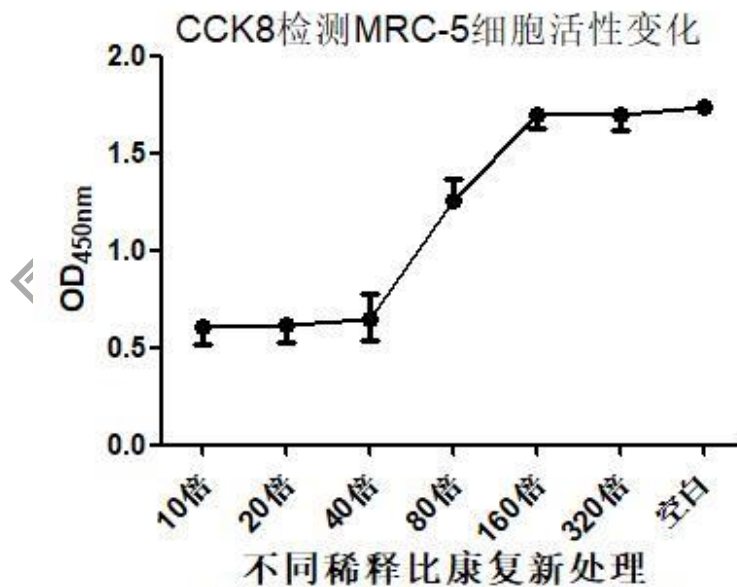


图 2 CCK8 法检测康复新液对 MRC-5 细胞的毒性

Fig.2 Toxic effects of Kangfuxin liquid on MRC-5 cells by CCK-8 assay

2.3 康复新液对 TGF- β 1 诱导 MRC-5 纤维化细胞模型的干预

以 80 倍稀释的康复新液干预 MRC-5 纤维化细胞模型, 干预时间分别为 24, 48 和 72 h,

通过 qRT-PCR 检测 6 个特异性纤维化指标的 mRNA 表达水平，比较干预不同时间的效果差别，结果如图 3 所示，空白对照组（control）和模型组（TGF- β 1）比较有显著差异，干预组与模型组比较 24 h 差异明显，mRNA 水平均出现显著下调；干预组 72 h 时与阳性对照组（DXM）相比， α -SMA 和 FN 的 mRNA 表达无显著差异，其他纤维化指标的 mRNA 表达水平高于阳性对照组，但也显著低于模型组。上述结果表明 80 倍稀释的康复新液可以有效降低 TGF- β 1 诱导的 MRC-5 纤维化细胞模型中纤维化指标的表达。

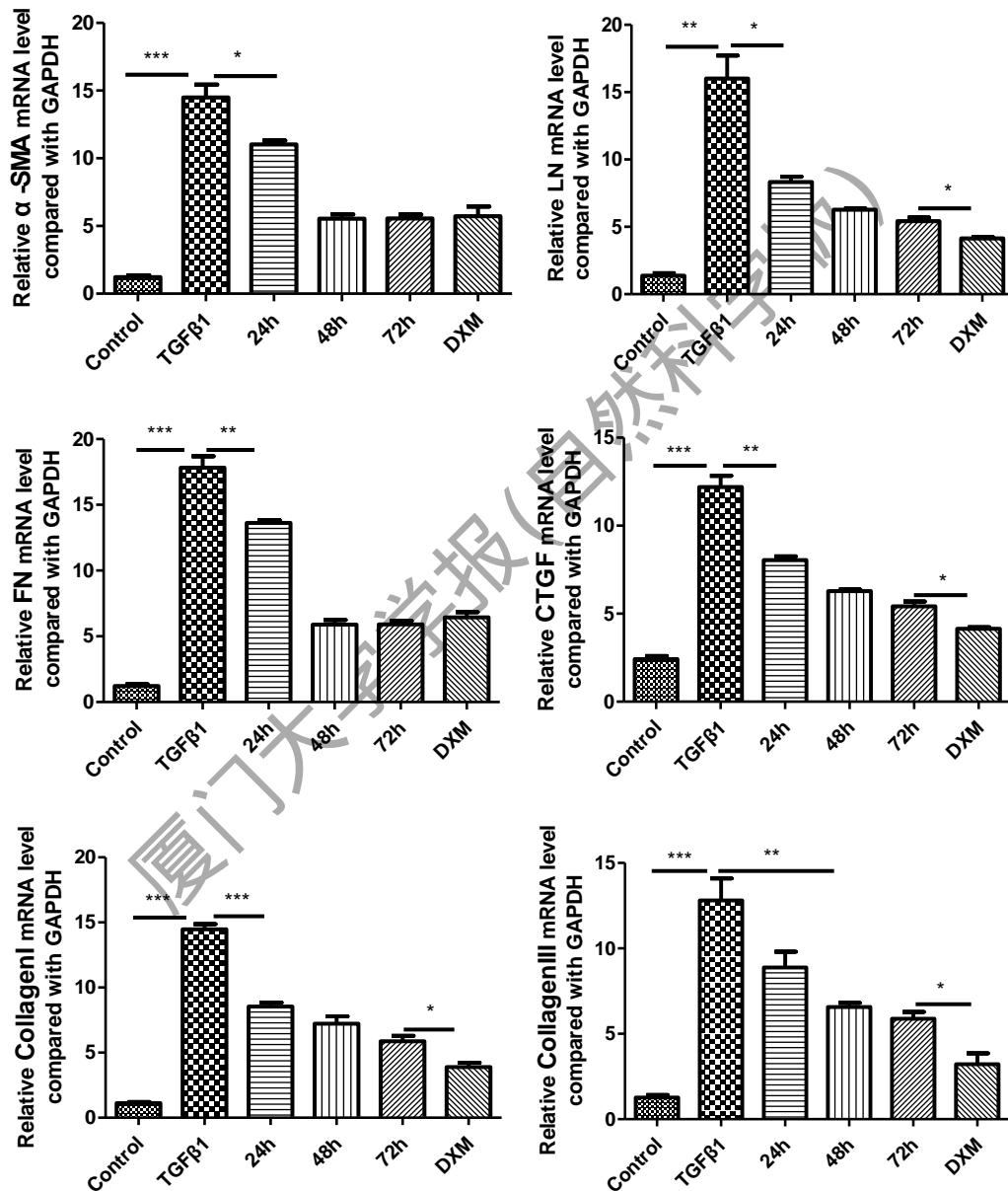


图 3 康复新液干预不同时间后 TGF- β 1 诱导 MRC-5 纤维化细胞模型中纤维化指标的 mRNA 表达水平
 Fig.3 Relative mRNA expression levels of fibrosis indexes after Kangfuxin liquid treatment on the MRC-5 cell fibrosis model for different time

进而通过 WB 方法检测康复新液干预不同时间后 TGF- β 1 诱导 MRC-5 纤维化细胞模型中上述 6 个特异性纤维化指标的蛋白表达水平,结果如图 4 所示:模型组和空白对照组相比,各个蛋白表达均上调,说明造模成功;干扰组与模型组相比, α -SMA、Collagen I 和 Collagen III 蛋白表达水平在 24~72 h 持续降低, LN、FN 和 CTGF 和蛋白表达水平在 48 h 出现明显降低;干扰组与阳性对照组相比,72 h 时的干扰组中 α -SMA、LN、FN 和 Collagen III 蛋白表达水平略高,CTGF 和 Collagen I 蛋白表达水平相当。所得结果与 qRT-PCR 检测的趋势基本一致,表明干扰组可以有效降低这些纤维化指标的表达。

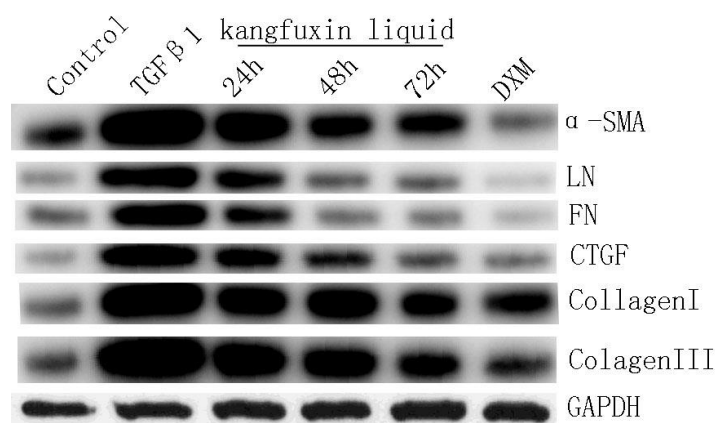


图 4 康复新液干预不同时间后 TGF- β 1 诱导 MRC-5 纤维化细胞模型中纤维化指标的蛋白表达水平

Fig.4 Relative protein expression levels of fibrosis indexes after Kangfuxin liquid treatment on the MRC-5 cell fibrosis model for different time

3 讨论

在世界范围内,组织器官纤维化是许多疾病致残、致死的主要原因。有关统计表明,特发性肺纤维化的患者从疾病诊断到死亡的时间仅 2~5 年,5 年生存率仅 20%^[11]。临床上这类患者大都会使用糖皮质激素治疗,但是糖皮质激素只对 1/3 的患者有一定的疗效,并且长期使用糖皮质激素会出现很多不良反应,如库欣综合征、机体免疫力下降、伤口难愈合等^[12]。虽然 2014 年美国食品药品监督管理局(FDA)批准肺纤维化的药物吡非尼酮(pirfenidone)和尼达尼布(nintedanib)用于临床,但这两种药物只能延缓疾病进程,对肺纤维化并没有实质的治疗作用,加之进口药品价格不菲,难以被患者接受,临床上使用的安全及有效性仍需要更多的数据支持^[13]。目前国际公认的最有效治疗方式是肺移植,但是肺移植存在肺供体少、手术风险大、技术要求高、价格昂贵等缺点,很难在肺纤维化的治疗中广泛选用。因此,拓展新的治疗措施并在临床上推广有重要的意义。

肺纤维化的形成过程中,在最重要的细胞因子 TGF- β 1 刺激作用下,成纤维细胞激活并

转化成肌成纤维细胞，而肌成纤维细胞的胞浆丰富，能够分泌胶原的同时还具有收缩功能，具备成纤维细胞和平滑肌的双重特性，肌成纤维细胞的形成是造成 ECM 异常沉积的主要细胞^[14]。所以肺成纤维细胞不断增殖并向肌成纤维细胞转化是肺纤维化发生发展的关键所在。

本研究成功构建了 TGF- β 1 诱导的 MRC-5 细胞纤维化模型，经检测纤维化特征性因子 α -SMA、LN、FN、CTGF、Collagen I、Collagen III 在建模中的 mRNA 表达都有所上调。以 80 倍稀释浓度的康复新液干预此模型后，上述指标因子的 mRNA 和蛋白表达水平均有所下调，表明康复新液对 MRC-5 细胞纤维化模型可起到有效的干预作用，效果与地塞米松相当，为抗纤维化的药物开发提供了新的思路 and 方向。但本研究也存在一定的局限性，即本研究中 MRC-5 细胞来源于中科院上海细胞库，经过多次培养后细胞的增殖及可诱导性都有所下降，因此临床上康复新液用于肺纤维化患者的效果还有待进一步研究。

参考文献:

- [1]徐慧蓉, 马小兵, 王献华.肺纤维化相关因子研究进展[J].现代预防医学, 2011, 38(10):1953-1955.
- [2]李奇娟, 王战国, 刘巧, 等.美洲大蠊研究现状及其研究中关键问题分析与展望[J/OL]. 中国中药杂志, 2018 [2018-02-10]. <https://www.cnki.net/kcms/doi/10.19540/j.cnki.cjcm.20180201.009>.
- [3]陈新, 王红, 张艳萍.康复新液的最新临床应用[J].中国医药指南, 2016, 6(17):89-96.
- [4]THIERY J P, ACLOQUE H, HUANG R Y, et al. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease[J].Cell, 2009, 139(5):871-890.
- [5]RADISKY D C. Rac1b and reactive oxygen species mediate MMP-3-induced EMT and genomic instability[J]. Nature, 2005, 436(47):123-127.
- [6]刘森炎, 钱一欣, 卞蓉蓉, 郁胜强. 结缔组织生长因子通过上调肾间质成纤维细胞组织型转谷氨酰胺酶和 III 型胶原蛋白促进肾间质纤维化[J].上海医学, 2017, 40(3):173-178.
- [7]滕立霞.升降散对系膜增生性肾小球肾炎大鼠肾组织 CTGF 及 α -SMA 表达的影响[J].中华中医药学刊, 2011, 29(6):1358-1360.
- [8]陈春宇, 陈志强.化痰通络中药对糖尿病肾病大鼠肾组织纤维连接蛋白和层粘连蛋白的影响[J].天然产物研究与开发, 2015, 27:2134-2137.
- [9]郭治, 吴金香. IL-33/ST2 激活人肺成纤维细胞表达纤维黏连蛋白 I 和 I 型胶原蛋白参与哮喘气道重塑[J].细胞与分子免疫学杂志, 2014, 30(9):975-979.
- [10]朱锦东.牛磺熊去氧胆酸缓解转化生长因子- β 1 诱导的 MRC-5 纤维化表型[D].北京:北京协和医学院, 2015:12-23.
- [11]潘有禄, 黄文海, 沈正荣.肺纤维化发生机制及治疗研究进展[J].中国药学杂志, 2012, 47(23):1873-1876.
- [12]周艳.基于“疏通肺络法”研究艾灸对肺纤维化大鼠上皮细胞-间质细胞转分化机制的影响[D].成都中医药大学, 2015:1.
- [13]陈茹萱.中药红景天成分对 TGF- β 1 诱导 MRC-5 细胞纤维化表型的干预 [D].北京:北京协和医院, 2016:

8.

[14]程飏, 付小兵, 盛志勇, 等. 瘢痕组织中 α -平滑肌肌动蛋白的表达与细胞凋亡的关系[J]. 中国病理生理杂志, 2002, 18(11):1333-1336.

Effect of Kangfuxin Liquid in Alleviating MRC-5 Cell Fibrosis Induced by Transforming Growth Factor- β 1

XU Qiuying, LIU Weiwei, WANG Baojia, MA Xiuying, GAO

Yongxiang*

(1. Basic Medical College, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, China; 2. Medicinal *Periplaneta americana* Key Laboratory of Sichuan Province, Chengdu 610000, China)

Abstract: For investigating effects of Kangfuxin liquid on the pulmonary fibrosis cell model, the pulmonary fibrosis cell model is established by treating human fetal lung fibroblast MRC-5 cell line with transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1). In addition, to detect effects of Kangfuxin liquid on MRC-5 cell by CCK8 assay, Kangfuxin liquid diluted by 80 times implements administration of drug on MRC-5 cell. The results showed that the pulmonary fibrosis cell model is established by treating human fetal lung fibroblast MRC-5 cell line with TGF- β 1 at the dose of 10ng.mL⁻¹. Kangfuxin liquid could significantly alleviate pulmonary fibrosis degree and efficiently down-regulate expression levels of LN, FN, α -SMA, CTGF, Collagen I and Collagen III in the pulmonary fibrosis cell model, so that the degree of pulmonary fibrosis can be reduced. Thus Kangfuxin liquid could significantly alleviate pulmonary fibrosis degree and might be a potential anti-fibrosis drug.

Key words: Kangfuxin liquid; pulmonary fibrosis; transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1); MRC-5 cell