

# 人脐带间充质干细胞联合吡非尼酮治疗小鼠肺纤维化

吴羨<sup>1</sup> 彭单伊<sup>1</sup> 苟好<sup>1</sup> 刘姜<sup>1</sup> 邹文静<sup>1</sup> 周欧<sup>1</sup> 丁凤霞<sup>2</sup> 田代印<sup>2</sup> 符州<sup>1,2\*</sup> 邹琳<sup>3</sup>

(<sup>1</sup>重庆医科大学附属儿童医院儿科研究所, 儿童发育疾病研究教育部重点实验室, 儿童发育重大疾病国家国际科技合作基地, 重庆市干细胞治疗工程技术研究中心, 重庆 400014; <sup>2</sup>重庆医科大学附属儿童医院呼吸中心, 重庆 400014; <sup>3</sup>重庆医科大学附属儿童医院临床分子医学中心, 重庆 400014)

**摘要** 该文旨在研究人脐带间充质干细胞(umbilical cord-derived mesenchymal stem cells, hUC-MSCs)联合吡非尼酮(pirfenidone, PFD)对博来霉素诱导的小鼠肺纤维化的治疗作用及可能机制。C57BL/6小鼠分为正常对照组、MSCs对照组、模型组、30 mg/kg PFD组(P<sub>30</sub>)、100 mg/kg PFD组、300 mg/kg PFD组、MSCs治疗组及MSCs联合P<sub>30</sub>组。气管滴注博来霉素后第7天尾静脉注射 $5 \times 10^5$  hUC-MSCs, 第7天起每日予PFD灌胃。造模后第21天收集肺组织, HE、Masson染色分别评估肺部形态变化及胶原沉积情况; Sircol法测胶原含量; PCR和Western blot检测纤维化标志物水平。超滤收集hUC-MSCs条件培养基(conditioned medium, CM), 联合PFD体外培养肌成纤维细胞(myfibroblast, MFB), CCK-8与BrdU实验检测MFB生长及增殖。结果显示, 与模型组相比, MSCs联合P<sub>30</sub>组显著改善小鼠生存率及肺部病理, 显著降低胶原及纤维化标志物水平( $P < 0.001$ ), 且疗效优于单用PFD和hUC-MSCs组( $P < 0.05$ )。PFD部分抑制MFB增殖, 联合CM增强了PFD对MFB增殖的抑制( $P < 0.001$ )。研究表明, hUC-MSCs联合低剂量PFD可能通过抑制MYB的增殖减轻博来霉素诱导的小鼠肺纤维化。

**关键词** 人脐带间充质干细胞; 吡非尼酮; 特发性肺纤维化

## Therapeutic Efficacy of Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells Combined with Pirfenidone in Pulmonary Fibrosis Mice

Wu Xian<sup>1</sup>, Peng Danyi<sup>1</sup>, Gou Hao<sup>1</sup>, Liu Jiang<sup>1</sup>, Zou Wenjing<sup>1</sup>, Zhou Ou<sup>1</sup>,  
Ding Fengxia<sup>2</sup>, Tian Daiyin<sup>2</sup>, Fu Zhou<sup>1,2\*</sup>, Zou Lin<sup>3</sup>

(<sup>1</sup>Department of Pediatric Research Institute, Children's Hospital of Chongqing Medical University, Ministry of Education Key Laboratory of Child Development and Disorders, China International Science and Technology Cooperation Base of Child Development and Critical Disorders, Chongqing Engineering Research Center of Stem Cell Therapy, Chongqing 400014, China; <sup>2</sup>Respiratory Center of Children's Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400014, China; <sup>3</sup>Center for Clinical Molecular Medicine, Children's Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400014, China)

**Abstract** This study aims to investigate the therapeutic effect of human umbilical cord mesenchymal stem cells combined with pirfenidone in bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice and its possible mechanism. C57BL/6 mice were divided into normal control group, hUC-MSCs control group, model group, 30 mg/kg PFD group (P<sub>30</sub>), 100 mg/kg PFD group, 300 mg/kg PFD group, hUC-MSCs treatment group and hUC-MSCs combined with P<sub>30</sub> group.  $5 \times 10^5$  hUC-MSCs were injected via the tail vein on the 7th day after intratracheal instillation of

收稿日期: 2018-04-11 接受日期: 2018-07-23

国家自然科学基金(批准号: 81670018、81600022)资助的课题

\*通讯作者。Tel/Fax: 023-63622934, E-mail: fu\_zhou79@aliyun.com

Received: April 11, 2018 Accepted: July 23, 2018

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81670018, 81600022)

\*Corresponding author. Tel/Fax: +86-23-63622934, E-mail: fu\_zhou79@aliyun.com

网络出版时间: 2018-09-26 16:54:10 URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20180926.1653.006.html>

bleomycin and PFD was administered once a day orally from then on. Their lung tissues were harvested at the 21th day, pulmonary morphological changes and collagen deposition were assessed respectively by HE and Masson staining, the content of collagen was measured by Sircol assay and the levels of fibrosis related markers were detected by PCR and Western blot. In addition, myofibroblasts (MFB) were cultured with hUC-MSCs conditional medium (CM) collected by ultrafiltration and PFD *in vitro*, CCK-8 and Brdu assay were used to detect the growth and proliferation of MFB. The results showed that hUC-MSCs combined with P<sub>30</sub> group significantly improved the survival rate and pulmonary histopathology of mice, reduced the levels of collagen and fibrosis related markers ( $P < 0.001$ ), and the efficacy of combination therapy was better than that of PFD alone and hUC-MSCs alone ( $P < 0.05$ ). PFD partially inhibited proliferation of MFB and PFD combined with CM enhanced the inhibitory effect of PFD on proliferation ( $P < 0.001$ ). This study demonstrate that hUC-MSCs combined with low-dose PFD may attenuate bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice by inhibiting MYB proliferation.

**Keywords** human umbilical cord mesenchymal stem cells; pirfenidone; idiopathic pulmonary fibrosis

特发性肺纤维化(idiopathic pulmonary fibrosis, IPF)是一种以进行性呼吸困难和肺功能逐渐恶化为临床特征的间质性肺疾病<sup>[1]</sup>。其发病率逐年上升,中位生存期仅2.5~3.5年,预后比多种癌症更差<sup>[2]</sup>。目前IPF尚无有效的治疗方法,因此,迫切需要寻找一种有效的治疗措施。

吡非尼酮(pirfenidone, PFD)是一类吡啶酮类化合物,是第一个通过III期临床试验证明对IPF有一定疗效的抗纤维化药物<sup>[3]</sup>。临床试验结果显示,PFD可降低IPF肺功能恶化速度,延缓病情进展<sup>[4-5]</sup>。虽然PFD的出现为IPF患者带来了福音,但在2015版IPF临床治疗指南中,PFD因有效剂量大、不良反应多、只对轻中度肺纤维化有效<sup>[1,4-5]</sup>而仅“酌情推荐”使用。因此,亟需一种既能增强PFD疗效、又可以减少其用量的疗法。

脐带来源的间充质干细胞(umbilical cord-derived mesenchymal stem cells, hUC-MSCs)因取材简单、无伦理限制、免疫调节能力强及免疫原性低等特点而广泛应用。目前全球已开展MSCs治疗各系统疾病的临床试验,证实了MSCs临床应用的安全性<sup>[6-8]</sup>。近年来研究表明, MSCs可旁分泌多种因子和微泡,通过调节免疫和控制炎症,可减少促纤维化因子及胶原沉积<sup>[9-11]</sup>。

目前尚无hUC-MSCs联合PFD治疗肺纤维化小鼠模型的文献报道,因此,本研究利用气管滴注博来霉素建立小鼠肺纤维化模型,经尾静脉注射hUC-MSCs联合低剂量PFD灌胃,观察小鼠一般情况、生存率、肺部病理改变及检测肺纤维化标志物的表达水平等,探讨hUC-MSCs联合低剂量PFD对肺纤维化

小鼠模型的治疗作用。将hUC-MSCs条件培养基联合PFD体外培养MFB,观察两者联合对MFB增殖的影响,初步探讨联合治疗的可能机制,为hUC-MSCs联合PFD治疗IPF提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂与仪器

人脐带间充质干细胞由重庆市干细胞治疗工程技术研究中心赠送;吡非尼酮购于上海阿达玛斯试剂有限公司;改良Masson染色试剂盒购于北京雷根生物技术有限公司;Sircol可溶性胶原检测试剂盒购于Bicolor公司;反转录试剂盒、Real-time PCR试剂购于TaKaRa公司; $\beta$ -actin、I型胶原 $\alpha 1$ 、I型胶原 $\alpha 2$ 、 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白引物由成都擎科梓熙生物技术有限公司合成;GAPDH、 $\alpha$ -SMA抗体购于武汉三鹰生物技术有限公司;山羊抗兔IgG二抗购于北京中杉金桥生物技术有限公司;超滤离心管购于Millipore公司;其他试剂均为国产分析纯。

### 1.2 动物实验

1.2.1 动物分组及处理 120只SPF级7周龄C57BL/6雄鼠购于重庆医科大学实验动物中心,饲养于重庆医科大学附属儿童医院实验动物中心SPF级饲养室,温度(22~26) °C,湿度55%~60%,光照12 h/d轮替,适应环境1周后开始建模。

将120只C57BL/6采用随机数字法分为8组:正常对照组(N)、MSCs对照组(N+M)、模型组(B)、低剂量PFD治疗组(B+P<sub>30</sub>)、中剂量PFD治疗组(B+P<sub>100</sub>)、高剂量PFD治疗组(B+P<sub>300</sub>)、MSCs治疗组(B+M)及hUC-MSCs联合低剂量PFD组(B+M+P<sub>30</sub>)。

表1 荧光定量PCR引物

Table 1 The primers for fluorescence quantitative PCR

基因	上游引物(5'→3')	下游引物(5'→3')
Gene	Forward primer (5'→3')	Reversed primer (5'→3')
<i>β-actin</i>	CAG AAG GAG ATT ACT GCT CTG GCT	TAC TCC TGC TTG CTG ATC CAC ATC
<i>Colla1</i>	GTT TGG ATG GTG CCA AGG GA	AGC ACC ATC ATT TCC ACG AG
<i>Colla2</i>	AGC AGG AGG TTT CGG CTA AG	GCA ACA AAG TCC GCG TAT CC
<i>α-SMA</i>	GAC AAT GGC TCT GGG CTC TGT AA	ATG CCA TGT TCT ATC GGG TAC TT

通过气管插管滴注3 mg/kg博来霉素建模,以1滴/10秒的速度滴注,正常对照组及MSCs对照组等速滴注等量的生理盐水。将小鼠置于预热的37 °C电热毯上,待苏醒后放回饲养笼。在建模后第7天, MSCs组经小鼠尾静脉注射 $5 \times 10^5/200 \mu\text{L}$  P4代hUC-MSCs,非MSCs组予以等量生理盐水。从建模后第7天开始,低、中、高剂量PFD组分别予以30 mg/kg、100 mg/kg、300 mg/kg PFD混悬液灌胃,非PFD组以等量生理盐水,每天1次,持续到建模后第21天。观察并记录小鼠生存情况,于第21天收集小鼠肺组织。

1.2.2 小鼠生存曲线的绘制 博来霉素造模后连续观察21天,记录小鼠精神、食欲、活动、存活等状况,利用Graphpad Prism 5.0绘制生存曲线。

1.2.3 肺组织病理评分 选取各组肺组织的石蜡切片,每个标本取前、中、后切面各三张行HE染色后,每张选取5个高倍镜视野(100 $\times$ )观察,根据Ashcroft评分方法分别进行评分,然后取平均值作为最后得分,以评估肺纤维化的严重程度<sup>[12]</sup>。

1.2.4 肺内胶原含量的测定 取右肺其中80 mg肺组织,根据Sircol法测可溶性胶原试剂盒说明书操作测定。利用胶原标准品制作标准曲线,然后根据标准曲线计算出胶原浓度。可溶性胶原含量按以下公式计算:可溶性胶原含量=计算出的胶原浓度 $\times$ 水解液总体积(1 mL)/80 mg $\times$ 右肺组织总湿重(mg)。

1.2.5 荧光定量PCR检测肺纤维化标志物mRNA的表达 采用TRIZOL法提取各组肺组织中的总RNA,利用逆转录试剂盒将RNA逆转录为cDNA。用得到的cDNA进行荧光定量PCR,以 $\beta$ -actin基因作为内参基因,检测I型胶原 $\alpha$ 1(collagen type I alpha 1 chain, *Colla1*)、I型胶原 $\alpha$ 2(*Colla2*)及 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白(alpha smooth muscle actin, *α-SMA*) mRNA的表达水平。所用引物系列如表1。

1.2.6 Western blot法检测肺组织中 $\alpha$ -SMA的表达 采用RIPA细胞裂解法提取肺组织中的总蛋白,BCA

法测量蛋白质浓度。25  $\mu\text{g}$ 蛋白质上样,8% SDS-PAGE凝胶电泳分离蛋白,依次以30 V 5 min、80 V 30 min、120 V 30 min进行电泳,恒流250 mA电流条件下转膜60 min,室温封闭1 h,4 °C孵育一抗( $\alpha$ -SMA 1:500, GAPDH 1:20 000)过夜,室温孵育二抗(1:5 000) 1 h, ECL法显色。

### 1.3 体外实验

1.3.1 hUC-MSCs的培养基鉴定 P2代hUC-MSCs从重庆市干细胞治疗工程技术研究中心获得,按照课题组前期报道过的方法培养及鉴定hUC-MSCs<sup>[13]</sup>。待hUC-MSCs生长至P<sub>4</sub>代,经胰酶消化后收集细胞悬液,离心后用PBS重悬细胞并计数,使细胞终浓度为 $2.5 \times 10^6/\text{mL}$ ,置于冰上待用。

1.3.2 hUC-MSCs条件培养基的制备 将P<sub>4</sub>代hUC-MSCs接种至10 cm细胞培养皿中,当细胞融合度达到75%~80%时更换为5 mL无血清DMEM/F12培养基,继续培养24 h后,收集培养皿中的培养基于超滤离心管中,4 °C、4 000  $\times$ g离心30 min,得到约500  $\mu\text{L}$ 浓缩培养基,即为CM。

1.3.3 CCK8实验 将小鼠胚胎成纤维细胞(NIH3T3)、人胚肺成纤维细胞(HLF-9)分别分为:对照组(Ctrl)、0.1 mg/mL PFD组(P<sub>0.1</sub>)、5% CM组(CM)、5% CM+0.1 mg/mL PFD(CM+P<sub>0.1</sub>)。NIH3T3与HLF-9以3 000个/孔密度接种到96板中,待细胞贴壁后,更换含有相应浓度的PFD和/或CM的200  $\mu\text{L}$ 培养基,放入细胞培养箱中继续培养,于0、1、2、3、4、5天每孔加入10  $\mu\text{L}$  CCK-8, 3 h后用酶标仪测量各孔吸光度(波长为450 nm)。

1.3.4 Brdu细胞增殖实验 NIH3T3、HLF-9分组同CCK-8实验,两种细胞分别以3 000个/孔的密度接种到96板中,待细胞贴壁后,更换含有相应浓度的PFD和/或CM的200  $\mu\text{L}$ 培养基,放入细胞培养箱中培养48 h后,加入Brdu,在细胞培养箱中继续培养4 h后,各组细胞经固定、核变性后加入Brdu一抗,室温

下孵育90 min, 显色后用酶标仪测量各孔吸光度(波长为450 nm)。

#### 1.4 统计学分析

实验数据均应用GraphPad Prism 5.0软件进行统计学分析。生存曲线通过log-rank检验分析, 数据以均数±标准差表示, 两独立样本组间分析采用t检验, 多组数据间比较采用单因素分析。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

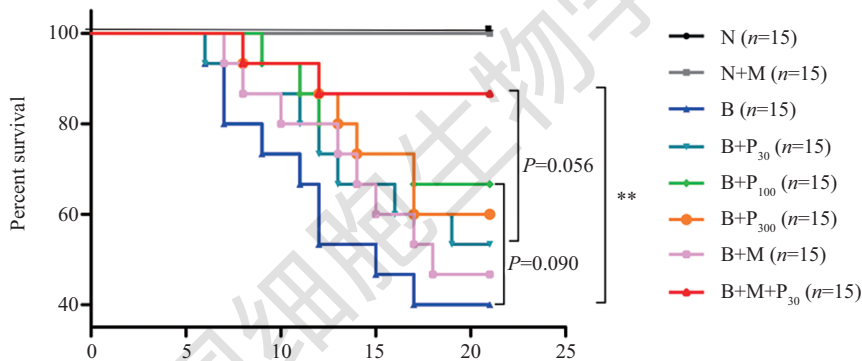
### 2.1 hUC-MSCs联合低剂量PFD对小鼠生存时间的影响

与模型组的生存时间相比, 单用低剂量PFD (30 mg/kg,  $P_{30}$ )与单用hUC-MSCs无法延长肺纤维化小鼠生存时间; 单用中剂量(100 mg/kg,  $P_{100}$ )与高剂量PFD(300 mg/kg,  $P_{300}$ )有延长生存时间的趋势,

但差异无统计学意义; hUC-MSCs联合 $P_{30}$ 组显著延长小鼠的生存时间, 差异具有统计学意义( $P<0.01$ ), 且hUC-MSCs联合 $P_{30}$ 组对生存时间的改善优于单用 $P_{100}$ 、 $P_{300}$ 的效果(图1)。

### 2.2 hUC-MSCs联合 $P_{30}$ 组对小鼠肺部病理的影响

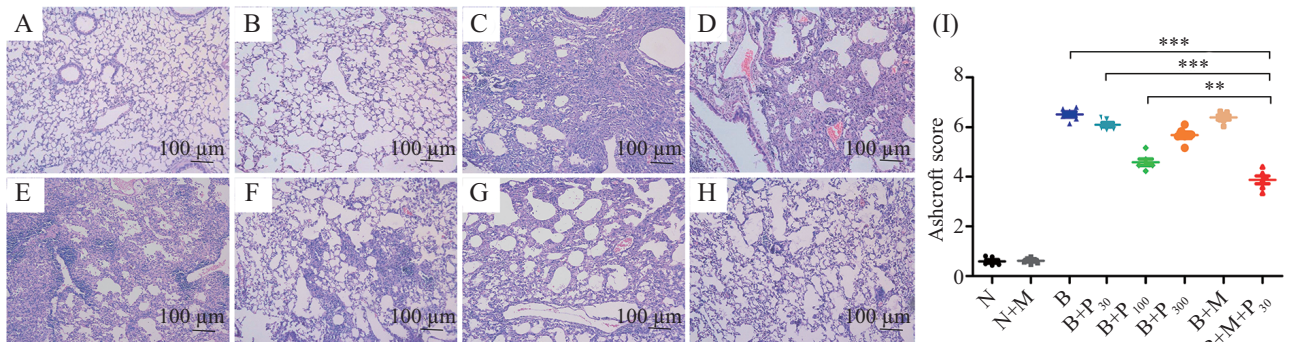
模型组小鼠在建模第21天的病理改变为: 炎症细胞渗出, 肺泡间隔增宽, 双肺底部形成磨玻璃样、条索状、网格状, 部分区域形成大小不等的囊状改变, 即蜂窝肺。与模型组肺部病理相比,  $P_{30}$ 组和hUC-MSCs组无明显改善; 而 $P_{100}$ 组肺内网格状、蜂窝状的区域有所减少, Ashcroft评分改善( $P<0.001$ );  $P_{300}$ 组肺部病理有一定改善, 但改善程度不及 $P_{100}$ 组。可见,  $P_{100}$ 在单用PFD各组中疗效最佳, hUC-MSCs联合 $P_{30}$ 明显改善博来霉素所致的肺部病变, Ashcroft评分明显好转( $P<0.001$ ), 且对病理的改善明显优于单用 $P_{100}$ ( $P<0.01$ )(图2)。



\*\* $P<0.01$ .

图1 各组小鼠的生存曲线

Fig.1 The survival curve of mice in each group



A~H: N(A), N+M(B), B(C), B+M(D), B+ $P_{30}$ (E), B+ $P_{100}$ (F), B+ $P_{300}$ (G), B+M+ $P_{30}$ (H)各组肺部病理改变; I: 各组肺组织HE染色的Ashcroft评分, \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ 。

A~H: the pulmonary pathological changes of N (A), N+M (B), B (C), B+M (D), B+ $P_{30}$  (E), B+ $P_{100}$  (F), B+ $P_{300}$  (G), B+M+ $P_{30}$  (H) groups; I: Ashcroft score of HE staining of lung tissues in each group, \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ .

图2 各组小鼠肺组织的病理改变

Fig.2 Pulmonary pathological changes of lung tissues of mice in each group

### 2.3 hUC-MSCs联合P<sub>30</sub>对小鼠肺部胶原的影响

Masson染色将肺内胶原染成蓝色,可反应肺部纤维化的严重程度。模型组镜下可见肺内大量胶原沉积。与模型组相比,P<sub>30</sub>组和hUC-MSCs组肺内胶原沉积无明显改变;P<sub>100</sub>、P<sub>300</sub>组胶原沉积有所减少,但P<sub>300</sub>组胶原减少程度不及P<sub>100</sub>组;hUC-MSCs联合P<sub>30</sub>后可显著降低肺内胶原沉积,且效果优于P<sub>100</sub>(图3A~图3H)。

Sircol法可检测小鼠肺内可溶性胶原的含量,模型组小鼠右肺胶原含量较对照组显著升高( $P<0.001$ )。与模型组相比,单用P<sub>30</sub>组与hUC-MSCs组的胶原含量无明显改变;P<sub>100</sub>组右肺胶原明显减少( $P<0.001$ );P<sub>300</sub>组右肺胶原含量虽有所减少,但是减少幅度不及P<sub>100</sub>组。hUC-MSCs联合P<sub>30</sub>组肺内胶原含量显著减少( $P<0.001$ ),且联合组胶原含量明显低于P<sub>100</sub>组(图3I)。

### 2.4 hUC-MSCs联合P<sub>30</sub>对肺纤维化标志物表达的影响

Colla1、Colla2被认为是主要的肺纤维化标志物,其含量反映肺纤维化的程度<sup>[8]</sup>。模型组Colla1、Colla2 mRNA水平较对照组显著增高。与模型组相比,P<sub>30</sub>、P<sub>300</sub>组及hUC-MSCs组Colla1 mRNA无明显变化,P<sub>100</sub>组及hUC-MSCs联合P<sub>30</sub>组Colla1 mRNA的表达显著减少,且hUC-MSCs联合P<sub>30</sub>组表达量更低,差异具有统计学意义( $P<0.001$ )。除P<sub>30</sub>组外,各治疗组Colla2 mRNA水平均降低,hUC-MSCs联合P<sub>30</sub>组转录水平最低( $P<0.001$ )(图4A和图4B)。

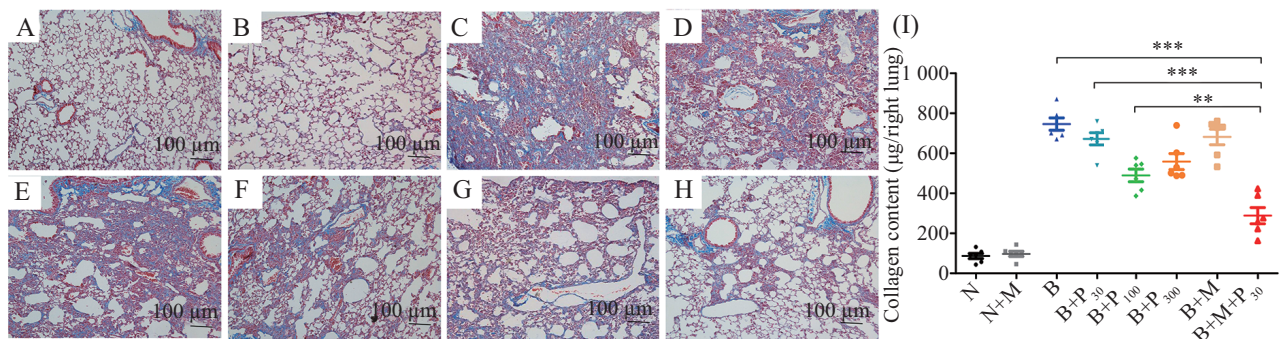
博来霉素造模后,肺内的MFB数量明显增加,作

为MFB的标志物 $\alpha$ -SMA的表达也显著增加<sup>[14]</sup>。本研究结果显示,与模型组相比,P<sub>30</sub>、P<sub>300</sub>组及hUC-MSCs组的 $\alpha$ -SMA mRNA水平无明显改变,P<sub>100</sub>及联合组显著降低,且联合组更低( $P<0.001$ )(图4C)。在蛋白水平,单用P<sub>300</sub>和hUC-MSCs对 $\alpha$ -SMA的表达无明显改变,P<sub>30</sub>、P<sub>100</sub>可部分抑制 $\alpha$ -SMA的增加,而hUC-MSCs与PFD联合后可显著降低 $\alpha$ -SMA的表达(图4D)。

### 2.5 hUC-MSCs条件培养基可影响PFD对肌成纤维细胞增殖的抑制

研究表明,TGF- $\beta$ 1可诱导成纤维细胞向MFB转化,表现为MFB的标志物 $\alpha$ -SMA表达显著增多,因此可用 $\alpha$ -SMA的水平来显示MFB的数量变化<sup>[15]</sup>。在本实验中,利用4 ng/mL TGF- $\beta$ 1刺激两种成纤维细胞NIH3T3和HLF-9 48 h后,细胞内的 $\alpha$ -SMA mRNA水平明显增高( $P<0.001$ )(图5A和图5B),表明MFB数目显著增加。后续实验中CM及PFD对成纤维细胞的处理均是在TGF- $\beta$ 1刺激48 h后添加,以观察CM及PFD对MFB生长与增殖的影响。

MSCs对肺部疾病的治疗主要是通过旁分泌起作用<sup>[16]</sup>,因此在细胞实验中采用CM代替hUC-MSCs的作用进行研究。CCK-8实验表明,单用P<sub>0.1</sub>可部分抑制MFB的生长( $P<0.05$ );CM对HLF-9来源的MFB生长无明显影响,而有促进NIH3T3来源的MFB生长的趋势,但差异无统计学意义( $P>0.05$ )。在P<sub>0.1</sub>基础上添加CM后,显著增强了P<sub>0.1</sub>对MFB生长的抑制,且差异具有统计学意义( $P<0.001$ )(图5C和图5D)。BrdU实验结果显示,单用P<sub>0.1</sub>部分抑制MFB的增殖,而CM不影响MFB的增殖,CM与P<sub>0.1</sub>联合后,同样显著增强

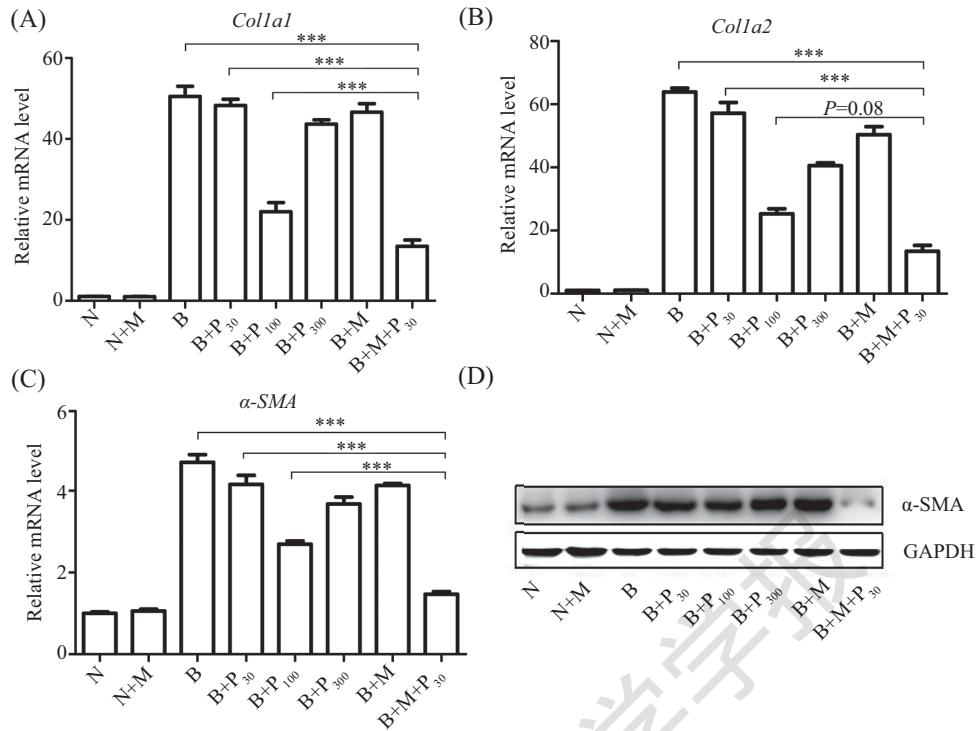


A~H: N(A), N+M(B), B(C), B+M(D), B+P<sub>30</sub>(E), B+P<sub>100</sub>(F), B+P<sub>300</sub>(G), B+M+P<sub>30</sub>(H)各组肺部Masson染色; I: 各组的小鼠右肺内胶原含量, \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ 。

A-H: Masson staining of lung tissues in N (A), N+M (B), B (C), B+M (D), B+P<sub>30</sub> (E), B+P<sub>100</sub> (F), B+P<sub>300</sub> (G), B+M+P<sub>30</sub> (H) groups; I: collagen content of right lung in each group, \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ 。

图3 各组小鼠肺组织内胶原的水平

Fig.3 The collagen levels of lung tissues of mice in each group

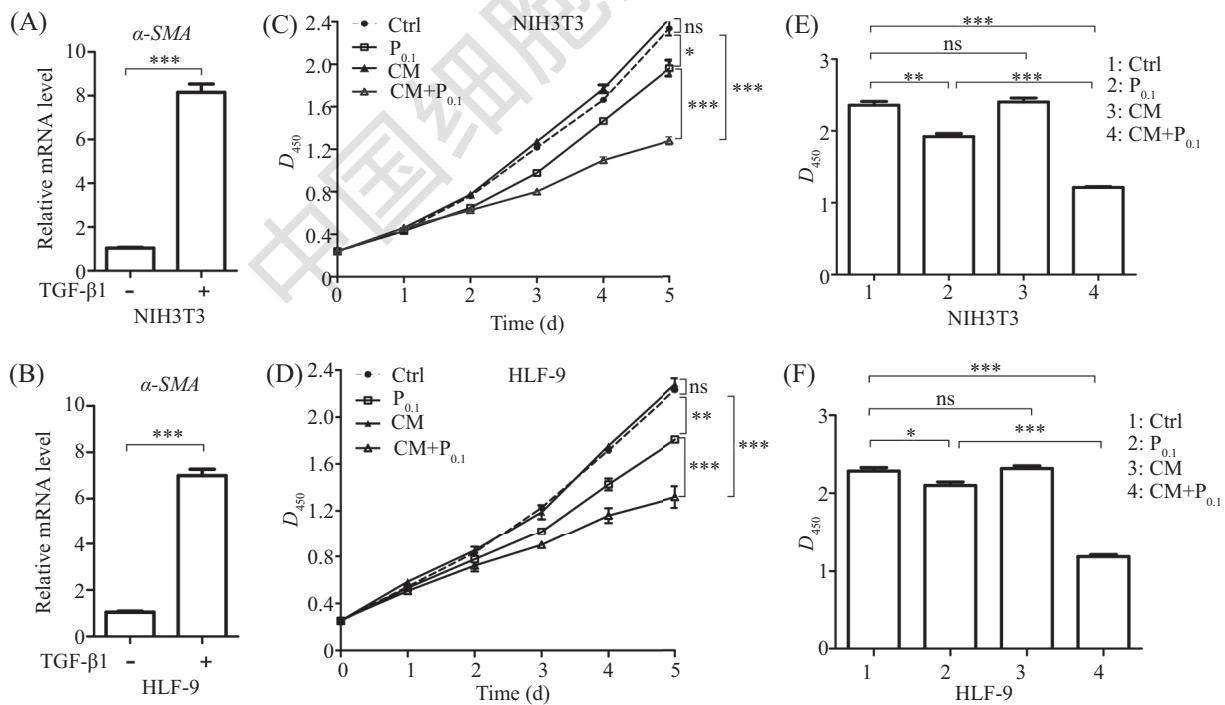


A、B: 各组肺组织内肺纤维化标志物的表达; C、D: 各组肺组织内 $\alpha$ -SMA的表达; \*\*\* $P < 0.001$ 。

A,B: expression of pulmonary fibrosis-related markers in lung tissues in each group; C,D: expression of  $\alpha$ -SMA in lung tissues in each group; \*\*\* $P < 0.001$ .

图4 各处理组小鼠肺组织内纤维化标志物的水平

Fig.4 The expression of pulmonary fibrosis related markers in each group



A、B: 4 ng/mL TGF- $\beta$ 1作用NIH3T3和HLF-9 48 h后 $\alpha$ -SMA mRNA增加; C、D: CCK-8实验结果; E、F: Brdu实验结果; \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ 。

A,B: the expression of  $\alpha$ -SMA mRNA increased in NIH3T3 and HLF-9 after 4 ng/mL TGF- $\beta$ 1 for 48 h; C,D: the results of CCK-8 assay; E,F: the results of Brdu assay; \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

图5 hUC-MSCs条件培养基可影响PFD对肌成纤维细胞增殖的抑制作用

Fig.5 CM of hUC-MSCs affects the inhibition of PFD on myofibroblast proliferation

了 $P_{0.1}$ 对MFB增殖的抑制( $P<0.001$ )(图5E和图5F)。

### 3 讨论

IPF因缺乏特异的早期诊断指标,临床上多数患者就诊时肺部已形成了肺纤维化病灶。本研究将hUC-MSCs和PFD的干预时间点设置在肺纤维化形成后,更符合临床实际需求。在本研究中,将hUC-MSCs移植入肺纤维化小鼠体内,并与低剂量PFD联合应用。结果显示,与模型组相比,hUC-MSCs联合PFD明显延长了小鼠的生存时间,病理染色提示肺部蜂窝样改变明显减少,肺内胶原沉积及肺纤维化标志物水平显著降低。与hUC-MSCs联合后,低剂量的PFD能发挥优于其3倍甚至10倍剂量的抗纤维化作用,因此可推测,hUC-MSCs与PFD联合疗法既可增强PFD抗纤维化疗效、又可降低PFD的用量,减少不良反应发生率,以期增强IPF患者的耐受性与依从性。

Oku等<sup>[17]</sup>采用三个浓度10、30、100 mg/kg PFD治疗博来霉素诱导的小鼠肺纤维化模型,结果显示,PFD的抗纤维化作用与剂量呈正相关。但尚无文献报道包含更高剂量梯度的PFD对小鼠肺纤维化的疗效。本研究应用30、100、300 mg/kg PFD三个剂量梯度探讨对肺纤维化的治疗作用,与预期不同的是,高剂量(300 mg/kg)PFD未达到比中剂量PFD(100 mg/kg)更好的抗纤维化效果。在Azuma等<sup>[18]</sup>和Wijnsenbeek等<sup>[19]</sup>进行的PFD治疗IPF的临床试验中,PFD的不良反应以胃肠道反应为主,且与剂量呈正相关,发生率在40%~60%,部分患者因不耐受而停药。结合在本实验过程中观察到的高剂量PFD组小鼠的食欲比中、低剂量PFD组差的现象,可推测PFD剂量在超过适宜范围后,产生了胃肠道不良反应,影响了PFD的治疗效果。因此,临床中不能期望用增加PFD剂量的方法来达到最佳的抗纤维化效果。基于此,为了避免较高剂量的PFD产生不良反应,本研究中采用了30 mg/kg PFD与hUC-MSCs联合治疗,而未采用100 mg/kg PFD与hUC-MSCs联合。

IPF的发病原理的研究仍不清楚,其主要的病理改变为大量肌成纤维细胞的增殖、聚集以及细胞外基质的沉积,其中细胞外基质主要成分为胶原<sup>[20]</sup>。MFB作为IPF病变的主要效应细胞,其数量与IPF疾病的严重程度及预后呈负相关,可见肺纤维化组织内MFB是IPF治疗的靶点之一<sup>[21]</sup>。研究表明,MSCs

可抑制TGF- $\beta$ 1诱导的成纤维细胞向MFB分化<sup>[11,22]</sup>,还可通过旁分泌作用调节免疫,抑制促炎因子的产生,并减少胶原沉积,从而有益于纤维化疾病<sup>[11]</sup>。而PFD作为一种多细胞因子抑制剂,可通过抑制TGF- $\beta$ 1、bFGF、CTGF等细胞因子的表达,抑制靶细胞(肌)成纤维细胞的生物活性,从而抑制(肌)成纤维细胞的增殖及胶原的合成<sup>[14]</sup>。本研究中,hUC-MSCs联合低剂量PFD组的肺组织中,MFB标志物 $\alpha$ -SMA的转录及蛋白水平明显低于单用PFD或hUC-MSCs组,提示hUC-MSCs与PFD联合后具有更强的抗纤维化功效,其机制可能与MFB数目的显著下降有关。因此,该研究利用体外实验验证这一假设,结果提示,CM可能是通过增强PFD对MFB增殖的影响从而增强PFD的抗纤维化能力,但CM影响PFD抗纤维化作用的具体机制仍有待探索。值得一提的是,单用CM对MFB的增殖无抑制作用甚至具有促进其增殖的趋势,而将CM与PFD联合后对MFB的增殖显示出明显的抑制作用,其机制有待进一步研究。

本研究结果表明,hUC-MSCs联合低剂量PFD对小鼠肺纤维化模型有治疗作用,并延缓IPF的进程,为IPF的临床治疗提供了一种新思路。但是,两者联合治疗的深入机制及临床转化尚需进一步研究和探索。

### 参考文献 (References)

- 1 Raghu G, Rochwerg B, Zhang Y, Garcia CA, Azuma A, Behr J, et al. An official ATS/ERS/JRS/ALAT clinical practice guideline: treatment of idiopathic pulmonary fibrosis. An update of the 2011 clinical practice guideline. *Am J Respir Crit Care Med* 2015; 192(2): e3-e19.
- 2 Hutchinson J, Fogarty A, Hubbard R, McKeever T. Global incidence and mortality of idiopathic pulmonary fibrosis: a systematic review. *Eur Respir J* 2015; 46(3): 795-806.
- 3 Carter NJ. Pirfenidone: in idiopathic pulmonary fibrosis. *Drugs* 2011; 71(13): 1721-32.
- 4 King TE Jr, Bradford WZ, Castro-Bernardini S, Fagan EA, Glaspole I, Glassberg MK, et al. A phase 3 trial of pirfenidone in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med* 2014; 37: 2083-92.
- 5 Noble PW, Albera C, Bradford WZ, Costabel U, Glassberg MK, Kardatzke D, et al. Pirfenidone in patients with idiopathic pulmonary fibrosis (CAPACITY): two randomised trials. *Lancet* 2011; 377: 1760-9.
- 6 Antunes MA, Laffey JG, Pelosi P, Rocco PRM. Mesenchymal stem cell trials for pulmonary diseases. *J Cell Biochem* 2014; 115: 1023-32.
- 7 Trounson A, McDonald C. Stem cell therapies in clinical trials: progress and challenges. *Cell Stem Cell* 2015; 17(1): 11-22.

- 8 Chang YS, Ahn SY, Yoo HS, Sung SI, Choi SJ, Oh WI, *et al.* Mesenchymal stem cells for bronchopulmonary dysplasia: Phase 1 dose-escalation clinical trial. *J Pediatr* 2014; 64(5): 966-72.
- 9 Álvarez D, Levine M, Rojas M. Regenerative medicine in the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis: current position. *Stem Cell Cloning* 2015; 8: 61-5.
- 10 Ahn SY, Chang YS, Park WS. Stem cell therapy for bronchopulmonary dysplasia: bench to bedside translation. *J Korean Med Sci* 2015; 30(5): 509-13.
- 11 Gazdhar A, Grad I, Tamò L, Gugger M, Feki A, Geiser T. The secretome of induced pluripotent stem cells reduces lung fibrosis in part by hepatocyte growth factor. *Stem Cell Res Ther* 2014; 5: 123.
- 12 Ashcroft T, Simpson JM, Timbrell V. Simple method of estimating severity of pulmonary fibrosis on a numerical scale. *J Clin Pathol* 1988; 41(4): 467-70.
- 13 Hua Z, Yi X, Yunqiu X, Rong Z, Daiyin T, Ting W, *et al.* Therapeutic effects of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells in acute lung injury mice. *Sci Rep* 2017; 7: 39889.
- 14 Barkauskas CE, Noble PW. Cellular mechanisms of tissue fibrosis. New insights into the cellular mechanisms of pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2014; 306(11): C987-996.
- 15 Martin MM, Buckenberger JA, Jiang J, Malana GE, Knoell DL, Feldman DS, *et al.* TGF-beta1 stimulates human AT1 receptor expression in lung fibroblasts by cross talk between the Smad, p38 MAPK, JNK, and PI3K signaling pathways. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007; 293(3): L790-9.
- 16 Ranganath SH, Levy O, Inamdar MS, Karp JM. Harnessing the mesenchymal stem cell secretome for the treatment of cardiovascular disease. *Cell Stem Cell* 2012; 10(3): 244-58.
- 17 Oku H, Shimizu T, Kawabata T, Nagira M, Hikita I, Ueyama A, *et al.* Antifibrotic action of pirfenidone and prednisolone: different effects on pulmonary cytokines and growth factors in bleomycin-induced murine pulmonary fibrosis. *Eur J Pharmacol* 2008; 590(1/2/3): 400-8.
- 18 Azuma A, Nukiwa T, Tsuboi E, Suga M, Abe S, Nakata K, *et al.* Double-blind, placebo-controlled trial of pirfenidone in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 171(9): 1040-7.
- 19 Wijssenbeek MS, Grutters JC, Wuyts WA. Early experience of pirfenidone in daily clinical practice in Belgium and the Netherlands: a retrospective cohort analysis. *Adv Ther* 2015; 32(7): 691-704.
- 20 Thomas AW, Thirumalai RR. Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease. *Nat Med* 2012; 18(7): 1028-40.
- 21 Enomoto N, Suda T, Kato M, Kaida Y, Nakamura Y, Imokawa S, *et al.* Quantitative analysis of fibroblastic foci in usual interstitial pneumonia. *Chest* 2006; 130(1): 22-9.
- 22 Reddy M, Fonseca L, Gowda S, Chougule B, Hari A, Totey S. Human adipose-derived mesenchymal stem cells attenuate early stage of bleomycin induced pulmonary fibrosis: comparison with pirfenidone. *Int J Stem Cells* 2016; 9(2): 192-206.