

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2022.03.012

温肺化纤汤对过氧化氢诱导的肺间充质干细胞氧化应激损伤模型有氧糖酵解功能的影响

莫丽莎¹, 邱明亮¹, 朱国双², 朱伟³, 刘良猗^{1✉}

1. 江西中医药大学附属医院, 江西省南昌市八一大道 445 号, 330006; 2. 江西中医药大学中医学院; 3. 广州中医药大学第二临床医学院

[摘要] **目的** 探讨温肺化纤汤治疗特发性肺纤维化 (IPF) 其可能机制。**方法** 梯度密度离心法分离提取 C57BL/6 小鼠肺间充质干细胞 (LMSCs)。体外培养 LMSCs, 采用不同浓度 (100、200、300、400、500、600、700、800 $\mu\text{mol/L}$) 的过氧化氢 (H_2O_2) 诱导细胞损伤, MTT 法检测 LMSCs 细胞存活率, 选择细胞存活率约为 50% 的 H_2O_2 损伤浓度进行后续试验。细胞分为正常对照组、温肺化纤汤组, 温肺化纤汤组设浓度为 1600、800、400、200、100、50、25 $\mu\text{g/ml}$, MTT 法检测温肺化纤汤的毒性。细胞分为正常对照组、模型组、温肺化纤汤组, 温肺化纤汤设浓度为 1600、800、400、200、100、50、25 $\mu\text{g/ml}$, 根据剂量最小化和疗效最大化的原则, 结合细胞存活率确定药物的最佳浓度用于后续试验。实验分为正常对照组、模型组、阳性对照组及温肺化纤汤低、中、高剂量组。除正常对照组外, 模型组和温肺化纤汤各剂量组分别在温肺化纤汤预处理 24 h 后均给予 H_2O_2 造模 6 h。造模结束后检测细胞上清中葡萄糖摄取量及乳酸水平, RT-PCR 检测有氧糖酵解相关酶己糖激酶 2 (HK2)、丙酮酸激酶 2 (PKM2) mRNA 水平。**结果** 600 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 作用于 LMSCs 6 h, 细胞的存活率为 (52.17 $\pm$ 0.82) %, 并作为后续氧化应激损伤模型的浓度。与正常对照组比较, 不同浓度的温肺化纤汤 (25~1600 $\mu\text{g/ml}$) 对 LMSCs 均无毒性作用 ($P>0.05$)。与模型组比较, 不同浓度 (25~1600 $\mu\text{g/ml}$) 温肺化纤汤预处理的 LMSCs 存活率均显著增加 ($P<0.01$); 按 4 倍设定等比浓度梯度, 采取终浓度为 25、100、400 $\mu\text{g/ml}$ 温肺化纤汤作为低、中、高剂量组的干预浓度。与正常对照组相比, 模型组 LMSCs 氧化应激损伤后导致葡萄糖摄取量和乳酸含量降低 ($P<0.01$), 有氧糖酵解相关酶 HK2 和 PKM2 mRNA 水平均下降 ($P<0.05$)。与模型组对比较, 温肺化纤汤各剂量组均可增强葡萄糖摄取量和乳酸的水平 ($P<0.05$), 且温肺化纤汤中、高剂量 (100、400 $\mu\text{g/ml}$) 则增强了 HK2、PKM2 mRNA 表达 ($P<0.01$)。与阳性对照组比较, 温肺化纤汤高剂量组葡萄糖摄取量、乳酸含量均升高 ($P<0.05$)。与温肺化纤汤低剂量组比较, 温肺化纤汤中、高剂量组的 HK2、PKM2 mRNA 水平均明显增高 ($P<0.05$)。**结论** 温肺化纤汤可能通过增强 LMSCs 的有氧糖酵解改善 H_2O_2 诱导的细胞氧化应激损伤, 从而治疗 IPF。

[关键词] 特发性肺纤维化; 肺间充质干细胞; 氧化应激损伤; 温肺化纤汤; 有氧糖酵解

特发性肺纤维化 (Idiopathic pulmonary fibrosis, IPF) 是一种以进行性纤维化为特征的肺部疾病, 通常导致终末期肺病、呼吸衰竭^[1]。IPF 的五年生存率约为 40%^[2]。抗纤维化的西药因其昂贵的价格

及潜在的胃肠道损伤等不良反应限制了其在临床上的应用^[3]。本团队在洪广祥教授“治肺不远温”学术思想指导下, 以温阳散寒、化痰行瘀为治则, 运用温肺化纤汤治疗 IPF^[4]。该方对呼吸困难症状改善较为明显, 具有良好的临床疗效^[5-6], 并成为中医药诊治肺间质纤维化的江西省内《肺痿诊疗专家共识》推荐方^[7]。

氧化应激被广泛认为是 IPF 的核心特征^[8]。研

基金项目: 国家自然科学基金 (81860826); 江西省自然科学基金 (20212BAB206061); 江西省中医药管理局重点研究室建设项目 (赣中医药科教字[2021]3号)

✉ 通讯作者: llj6505@163.com, (0791) 86362625

究表明,在 IPF 的发展过程中,间充质干细胞(MSCs)的活化起着至关重要的作用^[9]。MSCs 是多能非造血干细胞,存在于包括肺脏在内的大多数组织中^[10]。MSCs 持续暴露在氧化应激的微环境之中,阻碍了组织常驻干细胞的正常修复和再生能力^[11]。另有研究认为,有氧糖酵解对 MSCs 的生物能学、生物合成能力和表观遗传有调节作用^[12]。前期研究表明,温肺化纤汤具有较强的抗氧化功效^[13-14]。本实验在此基础上,观察温肺化纤汤对氧化应激模型下肺间充质干细胞(LMSCs)的保护作用,并通过有氧糖酵解途径探讨其可能的抗氧化机制,为温肺化纤汤治疗 IPF 提供实验依据。本实验通过江西中医药大学实验动物伦理委员会审查批准,批件号:JZLLSC20210072。

1 材料及方法

1.1 动物及细胞提取和鉴定

SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠 20 只,5~6 周龄,体重质量(18±22)g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,实验动物许可证号 SCXK(湘)2019-0004。实验前适应性饲养 1 周,饲养环境为 SPF 级,室温 20~24℃,每日照明 12 h,予以饲料及普通水喂养。

小鼠颈椎脱臼处死,75%酒精浸泡 5 min,摘取双肺组织剪成碎块,加入 II 型胶原酶(0.5 mg/ml)37℃培养箱内消化 1~2 h 后终止消化。消化液使用 100 μm、70 μm 细胞筛网依次过滤,1500 r/min(离心半径 159 mm)常温离心 15 min, PBS 重悬,得到小鼠肺组织单细胞悬液。再以等体积方式加入 Percoll 分离液(1.073 g/ml)5 ml 中,2500 r/min(离心半径 157 mm)常温离心 20~25 min 后液体分为 3 层。吸取中间白色絮状层,1000 r/min(离心半径 89 mm)常温离心 5 min,接种于 100 mm 的培养皿中。24 h 后半量换液,48 h 后全部换液。5~7 天左右按照 1:2 的比例消化传代至新的培养皿中。

采取第 5 代细胞进行 MSCs 的免疫表型和三系分化实验,参照团队前期免疫表型鉴定方法^[15]和 MSCs 成骨、成软骨、成脂分化试剂盒说明书进行。结果显示,流式鉴定 LMSCs 免疫表型特征为 Sca-1、CD90 阳性,CD11b、CD45、CD31 阴性。多项分化诱导实验证实 LMSCs 能够在体外分化为成骨细胞、成软骨细胞、成脂肪细胞,符合 MSCs 的特征,表明实验提取的 LMSCs 满足实验的需求,故后续实验采取第 5~10 代的 LMSCs 细胞。

1.2 温肺化纤汤的制备

温肺化纤汤组成:麻黄 10 g,熟地黄 20 g,鹿角霜 15 g,肉桂 4 g,炮姜 10 g,白芥子 10 g,地龙 10 g,土鳖虫 10 g,桃仁 10 g,红花 10 g,川芎 10 g。中药饮片购自江西汇中堂药房有限公司。参照团队前期研究进行冻干粉的制备^[14]。称取 500 mg 温肺化纤汤冻干粉,溶于 25 ml 的 α-MEM 基础培养基中,过滤、分装,即为 20 mg/ml 浓度的温肺化纤汤工作母液。

1.3 主要试剂和仪器

N-乙酰-L-半胱氨酸(NAC,货号:A9165)、Percoll 分离液(货号:P4937)、二甲基亚砜(DMSO,货号:2650)、II 型胶原酶(货号:C6885)、四甲基偶氮唑蓝(MTT,货号:M2128),Sigma 公司;内源性过氧化物酶阻断液过氧化氢(H₂O₂,武汉博士德生物工程有限公司,货号:AR1108);α-MEM 培养基(货号:C12571500BT)、磷酸缓冲盐溶液(PBS,货号:FPIP004)、澳洲胎牛血清(FBS,货号:10099-141)、0.25%胰蛋白酶(含 EDTA,货号:25200072)、双抗(青霉素/链霉素,货号:15140-122),Gibco 公司;PE 标记小鼠 Ly-6A/E(Sca-1,货号:562059)、APC 标记小鼠 CD90.2(货号:561974)、APC 标记小鼠 CD31(货号:561814)、PE 标记小鼠 CD11b(货号:561689)、PE 标记小鼠 CD45(货号:561087),BD Pharmingen 公司;小鼠骨髓 MSCs 成骨诱导分化试剂盒(赛业生物科技有限公司,货号:MUBMX-90021);MSCs 成脂分化染色试剂盒(货号:C37A0-0150)、MSCs 成脂诱导分化试剂(货号:05-330/05-331/05-332)、MSCs 软骨分化染色试剂盒(货号:C37B0-0150)、MSCs 成软骨诱导分化试剂(货号:05-220/02-221),上海逍鹏生物科技有限公司;葡萄糖(GLU)试剂盒(货号:A154-1-1)、乳酸测试盒(货号:A019-2-1),南京建成生物工程研究所;PCR 逆转录试剂盒(货号:4379012001)、PCR 扩增试剂盒(货号:04913850001),Roche 公司;Trizol(Thermo Fisher 公司,货号:15596-018)。

水套式 CO₂ 培养箱(Thermo Fisher 公司,型号:3110);低速台式自动平衡离心机(北京北利时代医疗科技有限公司,型号:DT5-3);多功能酶标仪[帝肯(上海)贸易有限公司,型号:M1000pro];全自动倒置荧光显微镜(Nikon 公司,型号:ECLIPSE TI2-E);流式细胞仪(Agilent ACEA 公司,型号:Qpanteton);PCR 逆转录仪

(型号: ViiA7)、荧光定量 PCR 仪 (型号: Quant Studio 7 Flex)、PCR 扩增仪 (型号 Quant Studio 7 Flex), Applied Biosystems 公司; 超微量分光光度计 (Thermo Scientific, 型号: Nanodrop2000)。

1.4 氧化应激模型的构建

根据文献^[16]报道, H_2O_2 常作为氧化应激细胞模型损伤的造模药物。另外不同的细胞株, 不同的培养环境, 造模浓度会有所差异。据此, 在开展本研究前需进行 H_2O_2 氧化应激造模浓度的筛选。LMSCs 细胞分为正常对照组、模型组, 每组 5 个复孔, 实验重复 3 次。按 5×10^4 个/孔的密度接种于 96 孔板, 每孔 100 μ l, 置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 培养箱中培养过夜。第二天正常对照组更换成新鲜的完全培养液 100 μ l, 不做处理。模型组的 H_2O_2 药物造模的终浓度依据团队前期的研究基础^[14]进行设定, 依次为 100、200、300、400、500、600、700、800 μ mol/L, 干预 6 h 后进行 MTT 检测 LMSCs 细胞存活率。细胞的存活率是该模型建立成功的重要标志之一^[17]。当细胞的存活率为 50%~60% 时, 表明细胞氧化应激模型的建立^[18-19]。故本研究选择细胞存活率约为 50% 的 H_2O_2 损伤浓度进行后续试验。

1.5 温肺化纤汤的毒性实验

细胞分为正常对照组、温肺化纤汤组, 每组 5 个复孔, 实验重复 3 次。96 孔培养板内每孔接种 100 μ l 密度为 5×10^4 个/孔的细胞悬液, 培养过夜。第二天正常对照组更换为新鲜的完全培养液, 温肺化纤汤组分别加温肺化纤汤浓度为 1600、800、400、200、100、50、25 μ g/ml。作用 24 h 后进行 MTT 检测 LMSCs 细胞存活率。

1.6 温肺化纤汤作用浓度筛选

细胞分组: 正常对照组、模型组、温肺化纤汤组, 每组 5 个复孔, 实验重复 3 次。细胞按 5×10^4 个/孔的密度接种于 96 孔板内, 每孔 100 μ l。培养过夜后正常对照组和模型组更换成新鲜的完全培养液; 温肺化纤汤组加入浓度梯度为 1600、800、400、200、100、50、25 μ g/ml 药物干预, 持续作用 24 h 后, 模型组和温肺化纤汤组采用 1.4 中筛选出来的 H_2O_2 造模浓度进行氧化应激损伤模型的构建, 6 h 后行 MTT 检测 LMSCs 细胞存活率。根据剂量最小化和疗效最大化的原则, 结合细胞存活率确定药物的最佳浓度^[20]。

1.7 温肺化纤汤对 LMSCs 葡萄糖摄取量和乳酸含量的影响

实验分为正常对照组、模型组、阳性对照组及

温肺化纤汤低、中、高剂量组, 每组 3 个复孔, 实验重复 3 次。细胞按 5×10^4 个/孔的密度接种于 6 孔板内, 每孔 2 ml, 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 培养箱中培养过夜。第二天正常对照组和模型组更换成新鲜的完全培养液, 阳性对照组加入终浓度为 100 μ mol/L 完全培养基配制的 NAC 工作液, 温肺化纤汤组加入终浓度为 1.6 筛选出浓度的温肺化纤汤完全培养基配制的复方工作液。24 h 后除正常对照组外, 其余各组均给予 1.4 中筛选出浓度的 H_2O_2 造模, 6 h 后收集细胞上清备用。按照试剂盒说明书进行检测葡萄糖含量和乳酸的水平。最后计算细胞上清中及完全培养基中的葡萄糖含量及乳酸含量。细胞葡萄糖的摄取量=完全培养基中的葡萄糖含量-细胞上清葡萄糖含量。

1.8 温肺化纤汤对 LMSCs 糖酵解相关酶 mRNA 表达水平的影响

细胞分组、造模均同 1.7, 每组 3 个复孔, 实验重复 3 次。造模结束后按照 Trizol 说明书提取细胞的 RNA。使用超微量分光光度计检测 RNA 的浓度, 用无酶水将浓度调整至 300~600 ng/ μ l。参照 PCR 反转录说明书进行逆转录 (两步法), 两步法的反应体系总共是 20 μ l。反应结束后将反转录好的样品存放在 -80 $^{\circ}$ C 冰箱。将反转录好的 cDNA 取出解冻, 使用无酶水配制引物。引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司进行合成, 内参 (β -Actin): 上游 CTACCTCATGAAGATCCTGACC, 下游 CACA GCTTCTCTTTGATGTAC, 长度 90 bp; 己糖激酶 2 (HK2): 上游 CTACATGGAGGAGAT GCGTAAT, 下游 GCTTTGTGAAATCGATCAGGAT, 长度 236 bp; 丙酮酸激酶 2 (PKM2): 上游 TATCA TTGCCGTGACTCGAAAT, 下游 AAGTTTACACGA AGGTCGACAT, 长度 129 bp。准备 384 孔板, 进行 10 μ l PCR 扩增体系的配制, 操作注意避光。运行 PCR 扩增仪, 按照操作流程设置 PCR 循环的条件。第一步, 95 $^{\circ}$ C, 10 min 激活酶活性。第二步, PCR 反应 (循环 40 次): 95 $^{\circ}$ C, 10 s; 60 $^{\circ}$ C, 1 min。扩增结束后导出数据, 计算表达量 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 的值。 $\Delta\Delta Ct$ =处理组的 ($Ct_{目的基因} - Ct_{\beta-actin}$) - 对照组的 ($Ct_{目的基因} - Ct_{\beta-actin}$)。

1.9 统计学方法

采用 SPSS 25.0 处理数据。计量资料符合正态分布以 ($\bar{x} \pm s$) 进行统计学描述, 不符合正态分布的则用 $M (P_{25}, P_{75})$ 描述。符合正态分布和方差齐

性的多组计量资料采用单因素方差分析，组间两两比较采用LSD方法。不符合正态分布或方差齐性的计量资料比较采用基于秩次的非参数检验，两独立样本的比较采用Mann-Whitney *U* 检验。*P* < 0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 LMSCs 氧化应激模型构建的 H₂O₂ 给药浓度筛选结果

表 1 示，与正常对照组比较，不同浓度的 H₂O₂ (200、300、400、500、600、700、800 μmol/L) 造模 6 h 后细胞的存活率均下降 (*P* < 0.01)。当 H₂O₂ 作用浓度取 600 μmol/L 时，细胞的存活率为 (52.17±0.82) %，故后续实验以 600 μmol/L 浓度作为 H₂O₂ 给药浓度。

表 1 不同浓度 H₂O₂ 诱导干预 LMSCs 氧化应激模型 6 h 后细胞存活率比较 (%， $\bar{x}\pm s$)

H ₂ O ₂ 浓度/μmol·L ⁻¹	样本数	细胞存活率
100	3	97.42±1.04
200	3	88.67±2.99 ^{a)}
300	3	73.62±1.46 ^{a)}
400	3	73.77±1.05 ^{a)}
500	3	67.60±3.20 ^{a)}
600	3	52.17±0.82 ^{a)}
700	3	33.20±2.08 ^{a)}
800	3	22.57±2.51 ^{a)}

注：H₂O₂，过氧化氢；LMSCs，肺间充质干细胞。
a) 与正常对照组比较，*P* < 0.01。

2.2 温肺化纤汤对 LMSCs 细胞毒性研究结果

表 2 示，与正常对照组比较，温肺化纤汤不同浓度 (25、50、100、200、400、800、1600 μg/ml) 干预后各组细胞的存活率差异均无统计学意义 (*P* > 0.05)，提示温肺化纤汤从 25 μg/ml 到 1600 μg/ml 对 LMSCs 细胞均无毒性作用。

表 2 不同浓度温肺化纤汤干预 LMSCs 24 h 后细胞存活率比较 (%， $\bar{x}\pm s$)

温肺化纤汤浓度/μg·ml ⁻¹	样本数	细胞存活率
25	3	96.96±3.49
50	3	99.89±4.04
100	3	99.11±5.58
200	3	102.74±1.87
400	3	103.14±5.04
800	3	104.93±5.72
1600	3	103.51±3.09

注：LMSCs，肺间充质干细胞。

2.3 各组 LMSCs 细胞存活率比较

表 3 示，与正常对照组比较，模型组 LMSCs 细胞存活率下降 (*P* < 0.01)；与模型组比较，温肺化纤汤各剂量组细胞存活率均增强 (*P* < 0.01)，表明 25 μg/ml 的温肺化纤汤即可发挥有效抗氧化的作用。随着浓度的增加，温肺化纤汤促进 LMSCs 细胞存活的能力逐步提高，且 800 和 1600 μg/ml 两个药物浓度的细胞存活率均超过 100%。结合 2.2 的结果可知，温肺化纤汤可促进 LMSCs 细胞的增殖。为了进一步排除细胞增殖因素造成的细胞存活率提高，故不采取 800 和 1600 μg/ml 两个浓度。尽管 200 μg/ml 和 400 μg/ml 温肺化纤汤干预后的细胞存活率均大于 90%，但显然 400 μg/ml 作用更优，因此 400 μg/ml 是本次实验的最佳浓度。进一步考虑药物效应，按 4 倍设定等比浓度梯度，采取终浓度为 25、100、400 μg/ml 温肺化纤汤作为低、中、高剂量组的干预浓度。

表 3 各组 LMSCs 细胞存活率比较 (%， $\bar{x}\pm s$)

组别	温肺化纤汤浓度/μg·ml ⁻¹	样本数	细胞存活率
正常对照组	—	3	100.00±0.00
模型组	—	3	60.93±2.51 ^{a)}
温肺化纤汤组	25	3	73.35±2.20 ^{b)}
	50	3	82.96±1.33 ^{b)}
	100	3	86.92±1.32 ^{b)}
	200	3	92.38±4.43 ^{b)}
	400	3	97.51±2.26 ^{b)}
	800	3	102.78±2.19 ^{b)}
	1600	3	112.83±3.45 ^{b)}

注：LMSCs，肺间充质干细胞。
a) 与正常对照组比较，*P* < 0.01；b) 与模型组比较，*P* < 0.01。
“—”表示不存在。

2.4 各组 LMSCs 葡萄糖摄取量和乳酸水平比较

表 4 示，与正常对照组比较，模型组葡萄糖摄取量、乳酸水平降低 (*P* < 0.01)；与模型组比较，阳性对照组乳酸水平增加，温肺化纤汤各剂量组葡萄糖摄取量、乳酸水平均升高 (*P* < 0.05 或 *P* < 0.01)；与阳性对照组比较，温肺化纤汤高剂量组葡萄糖摄取量、乳酸水平均升高 (*P* < 0.05)；温肺化纤汤各剂量组葡萄糖摄取量差异无统计学意义 (*P* > 0.05)，温肺化纤汤高剂量组乳酸水平明显温肺化纤汤中、低剂量组 (*P* < 0.05)，且温肺化纤汤中、低剂量组乳酸水平差异无统计学意义 (*P* > 0.05)。

表 4 各组 LMSCs 葡萄糖摄取量和乳酸水平比较

(mmol/L, $\bar{x} \pm s$)			
组别	样本量	葡萄糖摄取量	乳酸水平
正常对照组	3	1.91±0.33	2.44±0.11
模型组	3	1.16±0.29 ^{a)}	1.40±0.21 ^{a)}
阳性对照组	3	1.53±0.17	1.84±0.27 ^{b)}
温肺化纤汤低剂量组	3	1.70±0.14 ^{b)}	1.90±0.05 ^{b)}
温肺化纤汤中剂量组	3	1.92±0.25 ^{c)}	1.84±0.37 ^{b)}
温肺化纤汤高剂量组	3	1.95±0.05 ^{c) d)}	4.17±0.09 ^{c) d) e) f)}

注: LMSCs, 肺间充质干细胞。

a) 与正常对照组比较, $P<0.01$; b) 与模型组比较, $P<0.05$; c) 与模型组比较, $P<0.01$; d) 与阳性对照组比较, $P<0.05$; e) 与温肺化纤汤低剂量组比较, $P<0.05$; f) 与温肺化纤汤中剂量组比较, $P<0.05$ 。

2.5 各组 LMSCs 有氧糖酵解相关酶 mRNA 表达水平比较

表 5 示, 与正常对照组比较, 模型组糖酵解相关酶基因 HK2、PKM2 mRNA 表达均下降 ($P<0.01$); 模型组、阳性对照组、温肺化纤汤低剂量组 HK2、PKM2 mRNA 表达差异无统计学意义 ($P>0.05$); 与模型组、阳性对照组、温肺化纤汤低剂量组比较, 温肺化纤汤中、高剂量组 HK2、PKM2 mRNA 表达升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 且温肺化纤汤高剂量组 HK2、PKM2 mRNA 表达高于温肺化纤汤中剂量组 ($P<0.05$)。

表 5 各组 LMSCs 细胞中 HK2、PKM2 mRNA 水平比较

(2 ^{-ΔΔCt} , $\bar{x} \pm s$)			
组别	样本量	HK2	PKM2
正常对照组	3	1.00±0.00	1.00±0.00
模型组	3	0.45±0.12 ^{a)}	0.53±0.06 ^{a)}
阳性对照组	3	0.61±0.09	0.63±0.05
温肺化纤汤低剂量组	3	0.59±0.10	0.62±0.08
温肺化纤汤中剂量组	3	0.89±0.09 ^{b) c) d)}	0.98±0.06 ^{b) c) d)}
温肺化纤汤高剂量组	3	1.08±0.25 ^{b) c) d) e)}	1.37±0.13 ^{b) c) d) e)}

注: LMSCs, 肺间充质干细胞; HK2, 己糖激酶 2; PKM2, 丙酮酸激酶 2。

a) 与正常对照组比较, $P<0.01$; b) 与模型组比较, $P<0.01$; c) 与阳性对照组比较, $P<0.05$; d) 与温肺化纤汤低剂量组比较, $P<0.05$; e) 与温肺化纤汤中剂量组比较, $P<0.05$ 。

3 讨论

IPF 常以顽固性咳嗽, 声息气短, 或进行性呼吸困难, 伴随肺功能指标的进行性下降为临床表现。根据该病的临床表现, 可归属于中医学“肺痿”范畴。我们认为本病多见于久咳不愈或大病之后, 导致肺的生肌受损, 肺阳生发乏源, 晚期常表现为气阳不足^[21]。该病病机是阳虚寒凝, 痰滞血

瘀, 以阳虚为本, 痰浊、水饮、瘀血为标。肺肾阳虚是疾病发生发展的重要内因, 阳虚寒凝血瘀是本病的基本病理改变。本团队在治疗“阴疽”名方阳和汤的基础上创制了温肺化纤汤, 并作为治疗间质性肺病的专方。该方用药多为辛、甘之品, 相伍可温阳补血, 散寒通滞。纵观全方, 融合了温补之熟地黄、鹿角霜、肉桂, 温散之麻黄、炮姜, 温通之川芎、桃仁、红花, 温化之白芥子等品, 共奏散寒温肺、涤痰行瘀之功。可谓“温补气阳以治本虚, 温肺散寒以除标证, 温通瘀血以畅气机, 温化痰湿以致平和, 用药甘温以调气血”。

研究^[22]显示, 氧化还原失衡与 IPF 密切相关。IPF 患者的肺组织中可见到氧化应激的标志物, 并且异常抗氧化活性加重了肺纤维化的发生^[23]。近年来, MSCs 因其可促进受损细胞的存活而受到广泛关注。MSCs 可迁移到损伤部位, 分泌多种旁分泌因子, 减少炎症反应, 促进组织修复^[24]。因此, 本研究以 LMSCs 的氧化应激损伤以模拟肺部损伤作为细胞模型探索温肺化纤汤的抗氧化功效。结果显示, 温肺化纤汤可有效改善 H₂O₂ 诱导的 LMSCs 氧化应激损伤, 提高 LMSCs 的细胞活性。

糖酵解代谢对于人类多能干细胞的生物能学、生物合成能力和表观遗传调节至关重要, 这也得到了代谢组学分析的进一步支持和印证^[25-26]。MSCs 和肿瘤细胞一样, 在常氧条件下利用糖酵解产生三磷酸腺苷(ATP), 这一过程称之为有氧糖酵解^[27]。有氧糖酵解对于干细胞的增殖非常重要, 不仅仅是快速产生 ATP, 还可以使营养物质转化为生物合成前体并促进生物能量的积累^[28]。本研究中观察到, 空白对照组 LMSCs 的葡萄糖摄取量和乳酸含量处于较高水平; 模型组 LMSCs 的有氧糖酵解功能受到损伤, 表现为葡萄糖摄取量和乳酸含量的减少, 而温肺化纤汤各剂量组葡萄糖摄取率和乳酸明显较模型组增多, 提示温肺化纤汤可改善有氧糖酵解功能, 且以高剂量效果更佳。为了进一步论证该结果, 我们又进行了糖酵解的两个关键酶 HK2、PKM2 mRNA 的检测。结果发现, 氧化应激损伤后模型组 LMSCs 的 HK2、PKM2 mRNA 表达下降, 而温肺化纤汤中、高剂量可促进 HK2、PKM2 mRNA 表达以发挥抗氧化的功效, 即增强氧化应激损伤下 LMSCs 的有氧糖酵解水平。

综上所述, 温肺化纤汤可改善 H₂O₂ 诱导的 LMSCs 氧化应激损伤, 其机制可能与增强 LMSCs 的有氧糖酵解有关。本研究仅初步探讨了温肺化纤

汤通过增强 LMSCs 有氧糖酵解功能以发挥抗氧化的功效, 未对调控有氧糖酵解酶 (HK2、PKM2) 的上下游通路进行进一步的研究, 具体的调控机制将是团队今后研究的重点。

参考文献

- [1]SAITO S, ALKHATIB A, KOLLS JK, et al. Pharmacotherapy and adjunctive treatment for idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) [J]. *J Thorac Dis*, 2019, 11 (Suppl 14): S1740-S1754.
- [2]GAO J, KALAFATIS D, CARLSON L, et al. Baseline characteristics and survival of patients of idiopathic pulmonary fibrosis: a longitudinal analysis of the Swedish IPF Registry[J]. *Respir Res*, 2021, 22(1):40-44.
- [3]NATSUIZAKA M, CHIBA H, KURONUMA K, et al. Epidemiologic survey of Japanese patients with idiopathic pulmonary fibrosis and investigation of ethnic differences [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2014, 190 (7): 773-779.
- [4]胡李慧, 朱伟, 张元兵, 等. 温肺化纤汤的组方原则与临床应用[J]. *时珍国医国药*, 2016, 27(5):1168-1169.
- [5]兰智慧, 张元兵, 朱伟, 等. 全程温法治疗肺间质纤维化的临床体会[J]. *中医药通报*, 2012, 11(5):38-40.
- [6]刘良倚, 闻海菊, 李少峰. 温肺化纤汤治疗肺间质纤维化 6 例分析[J]. *中医药通报*, 2011, 10(6):55-8.
- [7]刘良倚, 张元兵, 兰智慧. 肺痿诊疗专家共识意见(江西省)[J]. *江西中医药*, 2017, 48(2):12-15.
- [8]CAMELI P, CARLEO A, BERGANTINI L, et al. Oxidant/antioxidant disequilibrium in idiopathic pulmonary fibrosis pathogenesis[J]. *Inflammation*, 2020, 43(1):1-7.
- [9]TZOUVELEKIS A, KOLIAKOS G, NTOLIOS P, et al. Stem cell therapy for idiopathic pulmonary fibrosis: a protocol proposal [J]. *J Transl Med*, 2011, 9: 182. doi: 10.1186/1479-5876-9-182.
- [10]ZULUETA A, COLOMBO M, PELI V, et al. Lung mesenchymal stem cells-derived extracellular vesicles attenuate the inflammatory profile of Cystic Fibrosis epithelial cells[J]. *Cell Signal*, 2018, 51:110-118. doi: 10.1016/j.cellsig.2018.07.015.
- [11]BEERS MF, MORRISEY EE. The three R's of lung health and disease: repair, remodeling, and regeneration [J]. *J Clin Invest*, 2011, 121(6):2065-2073.
- [12]MOUSSAIEFF A, ROULEAU M, KITSBERG D, et al. Glycolysis-mediated changes in acetyl-CoA and histone acetylation control the early differentiation of embryonic stem cells [J]. *Cell Metab*, 2015, 21(3):392-402.
- [13]朱伟, 王敏, 张元兵, 等. 不同提取方法对温肺化纤汤提取物的抗氧化活性评价[J]. *中医药通报*, 2014, 13(3):59-62.
- [14]龚年金, 兰智慧, 朱伟, 等. 温肺化纤汤对 H₂O₂ 诱导小鼠肺间充质干细胞氧化应激损伤的保护作用机制[J]. *中华中医药杂志*, 2019, 34(8):3465-3469.
- [15]兰智慧, 李少峰, 张元兵, 等. 温肺化纤汤含药血清对小鼠肺间充质干细胞增殖和迁移能力的影响[J]. *中华中医药杂志*, 2017, 32(12):5366-5370.
- [16]GILLE JJ, JOENJE H. Cell culture models for oxidative stress: superoxide and hydrogen peroxide versus normobaric hyperoxia [J]. *Mutat Res*, 1992, 275 (3-6): 405-414.
- [17]何方婷, 陈嘉熠, 徐佳伊, 等. 氧化应激细胞模型建立的研究进展[J]. *食品工业科技*, 2019, 40(7):341-345.
- [18]孙婧陶, 李兆华, 张宝修, 等. 过氧化氢诱导延边奶山羊乳腺上皮细胞氧化损伤模型的建立[J]. *江苏农业科学*, 2013, 41(10):149-152.
- [19]吴寒, HUTABARAT RP, 黄午阳. H₂O₂ 诱导 ARPE-19 细胞损伤模型的建立及蓝莓花青素的保护作用[J]. *中国药理学通报*, 2018, 34(2):274-279.
- [20]王潇璐, 于竹芹, 汪贯习, 等. 胡黄连苷对 SH-SY5Y 细胞氧糖剥夺/复氧复糖损伤保护作用[J]. *青岛大学学报(医学版)*, 2021, 57(4):537-543.
- [21]胡李慧, 刘良倚. 刘良倚治疗肺间质纤维化经验[J]. *江西中医药大学学报*, 2015, 27(2):30-31, 34.
- [22]ROQUE W, ROMERO F. Cellular metabolomics of pulmonary fibrosis, from amino acids to lipids [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2021, 320(5):689-695.
- [23]LIGUORI I, RUSSO G, CURCIO F, et al. Oxidative stress, aging, and diseases[J]. *Clin Interv Aging*, 2018, 13:757-772. doi: 10.2147/CIA.S158513.
- [24]ULLAH I, SUBBARAO RB, RHO GJ. Human mesenchymal stem cells-current trends and future prospective [J]. *Biosci Rep*, 2015, 35(2):e00191. doi: 10.1042/BSR20150025.
- [25]MOUSSAIEFF A, ROULEAU M, KITSBERG D, et al. Glycolysis-mediated changes in acetyl-CoA and histone acetylation control the early differentiation of embryonic stem cells [J]. *Cell Metabolism*, 2015, 21 (3): 392-402.
- [26]PANOPoulos AD, YANES O, RUIZ S, et al. The metabolome of induced pluripotent stem cells reveals metabolic changes occurring in somatic cell reprogramming [J]. *Cell Res*, 2012, 22(1):168-177.
- [27]SUN H, ZHANG X, DAI J, et al. Sodium lactate promotes stemness of human mesenchymal stem cells through KDM6B mediated glycolytic metabolism [J].

Biochem Biophys Res Commun, 2020, 532 (3) : 433-439.

[28] HEIDEN M, CANTLEY LC, THOMPSON CB. Under-

standing the warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation [J]. Science, 2009, 324 (5930) : 1029-1033.

Effect of *Wenfei Huaxian Decoction* (温肺化纤汤) on Aerobic Glycolysis of Hydrogen Peroxide-induced Oxidative Stress Injury of Lung Mesenchymal Stem Cells in Mice

MO Lisha¹, QIU Mingliang¹, ZHU Guoshuang², ZHU Wei³, LIU Liangyu¹

1. Affiliated Hospital of Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang, 330006; 2. School of Chinese Medicine, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine; 3. The Second Clinical Medical School, Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine

ABSTRACT **Objective** To investigate the possible mechanism of *Wenfei Huaxian Decoction* (温肺化纤汤, WHD) in the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis (IPF). **Methods** C57BL/6 mice lung mesenchymal stem cells (LMSCs) were isolated by gradient density centrifugation. The LMSCs were cultured in vitro, and different concentrations (100, 200, 300, 400, 500, 600, 700 and 800 $\mu\text{mol/L}$) of hydrogen peroxide (H_2O_2) were used to induce cell injury. The survival rate of LMSCs was detected by MTT method, and the H_2O_2 concentration corresponding to the survival rate of 50% was used in subsequent experiments. The cells were divided into normal control group and WHD groups with different concentrations (1600, 800, 400, 200, 100, 50, and 25 $\mu\text{g/ml}$), and the MTT method was used to detect the toxicity of WHD. The cells were divided into normal control group, model group, and WHD groups with different concentrations (1600, 800, 400, 200, 100, 50, and 25 $\mu\text{g/ml}$), and the optimal concentration of WHD was determined for subsequent experiments following the principle of minimum dose with maximum effect and referring to the survival rate of the cells. The sample were divided into normal control group, model group, positive control group, and WHD low, medium and high dose groups. Except for the normal control group, the model group and all WHD dose groups were given H_2O_2 for 6 hours 24 hours after pretreatment to develop the model. After modeling, the glucose intake and the lactic acid level in cell supernatant were detected. The mRNA levels of the aerobic glycolysis related hexokinase 2 (HK2) and pyruvate kinase 2 (PKM2) were detected by RT-PCR. **Results** When 600 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 were given to LMSCs for 6 h, the cell survival rate was $(52.87 \pm 0.82)\%$. Therefore, 600 $\mu\text{mol/L}$ was used as the concentration of H_2O_2 in subsequent oxidative stress injury model. Compared to the normal control group, the WHD groups with different concentrations (25 $\mu\text{g/ml}$ to 1600 $\mu\text{g/ml}$) all had no toxic effect on LMSCs ($P > 0.05$). Compared to that in the model group, the cell survival rate of LMSCs in the WHD groups significantly increased after pretreatment with different concentrations (25 $\mu\text{g/ml}$ to 1600 $\mu\text{g/ml}$) of WHD ($P < 0.01$). The equal concentration gradient with ratio of 4 : 1 were set, and the concentration of 25, 100 and 400 $\mu\text{g/ml}$ were determined as the low, medium and high dose of WHD. Compared to those in the normal control group, the glucose uptake and lactic acid content in the model group decreased ($P < 0.01$), and the mRNA levels of aerobic glycolysis related enzymes HK2 and PKM2 ($P < 0.05$) after oxidative stress injury of LMSCs. Compared to the model group, all dose groups of WHD increased the glucose intake and lactic acid level ($P < 0.05$), while the WHD medium and high dose groups (100 and 400 $\mu\text{g/ml}$) increased the mRNA expression of HK2 and PKM2 ($P < 0.01$). Compared to the positive control group, the WHD high dose group had higher glucose intake and lactic acid content ($P < 0.05$). Compared to the low dose group of WHD, the medium and high dose groups significantly increased the mRNA levels of HK2 and PKM2 ($P < 0.05$). **Conclusion** WHD can improve the oxidative stress injury induced by H_2O_2 in the treatment of IPF, and its mechanism may be related to enhancing the aerobic glycolysis of LMSCs.

Keywords idiopathic pulmonary fibrosis; lung mesenchymal stem cells; oxidative stress injury; *Wenfei Huaxian Decoction* (温肺化纤汤); aerobic glycolysis

(收稿日期: 2021-06-30; 修回日期: 2021-11-29)

[编辑: 王利芬]