

# hPMSCs 对哮喘大鼠肺组织保护作用及机制研究

吕 剑<sup>1</sup>, 钟哲峰<sup>2</sup>

**摘要** 目的 探讨人胎盘间充质干细胞(hPMSCs)对哮喘大鼠的治疗作用及 Notch 信号通路相关因子的影响。方法 30 只 SD 大鼠随机均分为 3 组,即对照组、哮喘模型组(OVA 组)及 hPMSCs 移植组(hPMSCs 组)。采用 HE 染色观察肺组织形态学变化;ELISA 法检测大鼠血清中炎症因子表达;采用 RT-qPCR 和 Western blot 方法检测大鼠肺组织中 Notch1、Notch2、Notch3、Jagged1 mRNA 和蛋白变化。结果 HE 染色结果显示,与 OVA 组比较,hPMSCs 组管腔轻微狭窄,炎症细胞浸润减轻;ELISA 检测结果显示,OVA 组血清中免疫球蛋白 E(IgE)、白细胞介素-4(IL-4)含量高于对照组( $P < 0.05$ ),而干扰素- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ )含量下降( $P < 0.05$ )。与 OVA 组比较,hPMSCs 组血清中 IgE、IL-4 含量下降( $P < 0.05$ ),而血清中 IFN- $\gamma$  含量上升( $P < 0.05$ );RT-qPCR 和 Western blot 检测结果显示,OVA 组肺组织中 Notch1、Notch2、Jagged1 mRNA 和蛋白表达水平高于对照组,而 Notch3 mRNA 和蛋白表达水平下降。与 OVA 组比较,hPMSCs 组 Notch1、Notch2、Jagged1 mRNA 及蛋白表达水平下降,而 Notch3 mRNA 及蛋白表达水平上升。结论 hPMSCs 能够通过调节 Notch 信号通路抑制哮喘大鼠的炎症反应,对哮喘的治疗发挥一定作用。

**关键词** 大鼠;人胎盘间充质干细胞;肺组织;Notch

**中图分类号** R 725.6

**文献标志码** A 文章编号 1000-1492(2020)03-0385-06  
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.03.012

支气管哮喘(简称哮喘)是一种常见临床疾病,主要表现为气促伴或不伴咳嗽、反复发作的喘息<sup>[1]</sup>。以往有研究<sup>[2]</sup>表明,辅助性 T1/2 细胞(Thelper1/2, Th1/Th2)细胞在哮喘发病中起着重要作用,而 Th2 细胞的分化发展是其发病的始动环节。大量研究<sup>[3]</sup>表明,急慢性哮喘发病过程中 Notch 信号通路与 Th1/Th2 共同参与调控,但其机制仍有待明确。人胎盘来源干细胞(human placenta-derived mesenchymal stem cells, hPMSCs)是具有

多向分化潜能的间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)hPMSCs 的致瘤性实验呈阴性,具有正常的染色体核型,这说明遗传性状稳定,使其在治疗免疫疾病方面有广阔前景。现建立哮喘大鼠模型,在移植 hPMSCs 后通过 HE 染色、RT-qPCR 和 Western blot 等方法观察其对哮喘大鼠肺组织的影响,以及调节 Notch 信号通路表达,为哮喘治疗提供可能的新方法。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物** SPF 级 SD 雌性大鼠 30 只(6~8 周)购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,体质量( $185 \pm 12.5$ )g,实验动物许可证[SCXK(湘)2018-0016],单位使用许可证编号:SYXK(湘)2015-0033。大鼠统一饲养在南华大学动物房,室温 18~26℃,40%~70%相对湿度,适应性喂养 7 d。本研究通过我院伦理委员会审查,实验过程动物符合 3R 原则。

**1.2 仪器与试剂** 胰蛋白酶(美国 Sigma 公司);低糖 DMEM 培养基、胎牛血清(美国 HyClone 公司);cDNA 反转录试剂盒(日本 Takara 公司);卵白蛋白(Ovalbumin grade II、V)(美国 Sigma 公司);SYBR Green 荧光试剂盒(美国 Biomiga 公司);Jagged1 兔抗大鼠单克隆抗体(美国 SANTA CRUZ 公司);Notch1、2、3、4 兔抗大鼠单克隆抗体(美国 Cell signaling 公司);图像分析系统(美国 Media Cybernetics 公司);酶标检测仪(美国 GeneCore 公司);石蜡切片机(德国 Leica 公司)。

## 1.3 方法

**1.3.1 hPMSCs 的分离、培养与鉴定** 取足月剖宫产胎儿胎盘侧组织,经 PBS 多次冲洗去除血迹,剪成  $1 \times 1 \times 1$  mm<sup>3</sup> 0.1% IV 型胶原酶中,37℃ 消化 30 min,200 目筛网过滤收集细胞,细胞悬液离心后置于培养箱内培养(37℃、5% CO<sub>2</sub>)。7 d 后首次全量换液弃去未贴壁细胞,以后每 3 d 换液 1 次,待细胞汇合度达 70%~80% 时传代培养。取第 3 代 hPMSCs 消化分离,收集细胞悬液( $5 \times 10^6$  个/ml),加入不同 EP 管中,采用流式细胞仪检测 hPMSCs 表面标

2019-11-26 接收

基金项目:湖南省教育厅科学研究项目(编号:17B231);衡阳市科学技术发展项目(2016KS12)

作者单位:南华大学附属南华医院<sup>1</sup> 儿科、<sup>2</sup> 感染科,衡阳 421002

作者简介:吕 剑,男,硕士,副主任医师;

钟哲峰,男,硕士,副主任医师,责任作者, E-mail: nanhua415@126.com

志物 CD90、CD45、CD44、CD29、CD34。

1.3.2 哮喘模型的建立及分组 大鼠随机均分为3组,即对照组、哮喘模型组(OVA组)及hPMSCs移植组(hPMSCs组)。造模第1天腹腔注射1 ml OVA混悬液致敏(200 mg 氢氧化铝,Ⅱ级OVA 1 mg溶于1 ml 生理盐水),1周后加强致敏1次,将大鼠置于雾化吸入箱,每天雾化30 min/次(1%的Ⅱ级OVA雾化液),共7次,制作出SD大鼠哮喘模型<sup>[4]</sup>。其余组均按相同造模方法,对照组采用生理盐水进行致敏和激发。而hPMSCs组在首次激发后,将第3代的hPMSCs尾静脉注入1 ml 细胞混悬液(密度为 $1 \times 10^7$ 个/ml)。对照组和OVA组采用尾静脉注射1 ml PBS溶液。

1.3.3 肺组织 HE 染色 各组大鼠取左侧一叶肺组织,石蜡包埋,做厚度4 μm的连续切片,进行苏木精-伊红(HE)染色后,中性树胶封片,在显微镜下观察病理改变。

1.3.4 ELISA 法检测大鼠血清中免疫球蛋白 E (immunoglobulin E, IgE)、白细胞介素-4(interleukin 4, IL-4)和干扰素-γ(interferon-γ, IFN-γ)含量 末次激发24 h后,20%乌拉坦腹腔麻醉大鼠,经腹主动脉取血,置于抗凝离心管内,3 000 r/min离心10 min,分取血清,-20 ℃保存备用。按照ELISA试剂盒说明书检测大鼠血清中IgE、IL-4和IFN-γ含量。

1.3.5 RT-qPCR 法检测大鼠肺组织中 Notch 信号通路相关 mRNA 表达 取冻存大鼠肺组织50 mg,TRIzol 试剂提取总 RNA,根据 Revertaid First Strand cDNA Synthesis Kit 说明书进行反转录反应,合成 cDNA,保存在-80 ℃。采用上海生工生物技术公司合成的 Notch1、Notch2、Notch3 及 Jagged1 的引物序列,参照 SYBR Green 荧光 PCR 试剂盒说明书,配置反应体系,依次进行逆转录及扩增反应。实验重复3次,最后由软件计算并读出各组 Ct 值,并对照组基因表达设为1,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的 mRNA 的含量。

1.3.6 Western blot 检测肺组织中 Notch1、Notch2、Notch3 及 Jagged1 蛋白变化 每组取冻存大鼠肺组织100 mg,用预冷的蛋白裂解液提取总蛋白,1 200 r/min离心5 min,采用BCA法测定蛋白浓度。每孔以50 μg蛋白样品上样,经SDS-PAGE电泳分离、转膜,然后脱脂奶粉室温下封闭2 h,加入 Notch1(1:200)、Notch2(1:200)、Notch3(1:200)、Jagged1(1:500)一抗4 ℃孵育过夜,洗膜后加入辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔二抗(1:1 000)室温孵育1 h,ECL染色后,曝光、显影。

1.4 统计学处理 采用SPSS17.0软件,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用单因素方差分析,两两比较采用LSD-t检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 hPMSCs 培养与鉴定 培养7 d后可见梭型细胞贴壁生长增多,培养21 d左右细胞大量增殖,呈漩涡状生长,见图1。培养3代后的细胞,经流式细胞仪分析表面标记的阳性率为CD44<sup>+</sup> [(94.11 ± 1.44)%]、CD90<sup>+</sup> [(97.85 ± 2.75)%]、CD29<sup>+</sup> [(92.17 ± 2.16)%],阴性率为CD34<sup>-</sup> [(92.23 ± 1.68)%]和CD45<sup>-</sup> [(95.19 ± 2.47)%]。见图2。

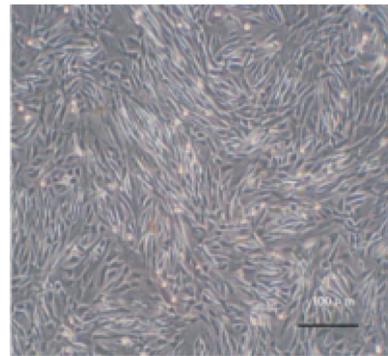


图1 显微镜下观察hPMSCs形态 ×100

2.2 肺组织病理改变 采用倒置显微镜观察拍照,

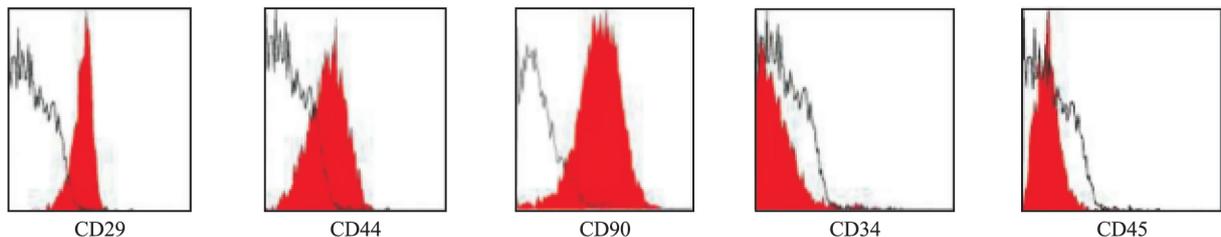


图2 流式细胞仪鉴定hPMSCs

X轴:波长;Y轴:相对强度

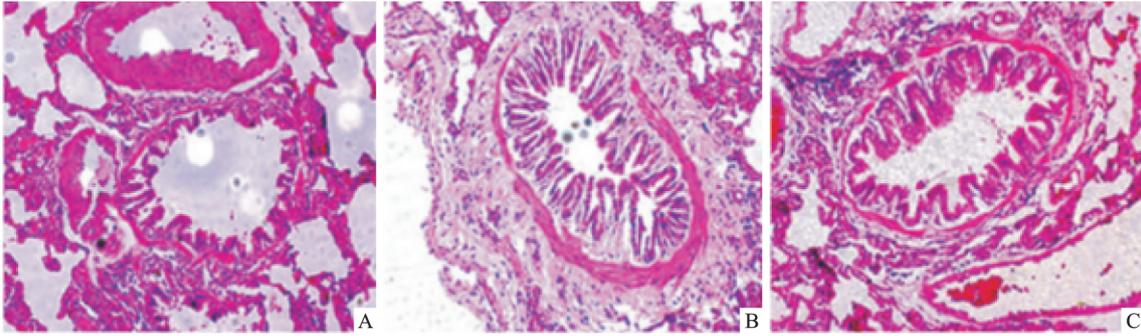


图3 各组大鼠肺组织学结构 HE×200  
A:对照组;B:OVA组;C:hPMSCs组

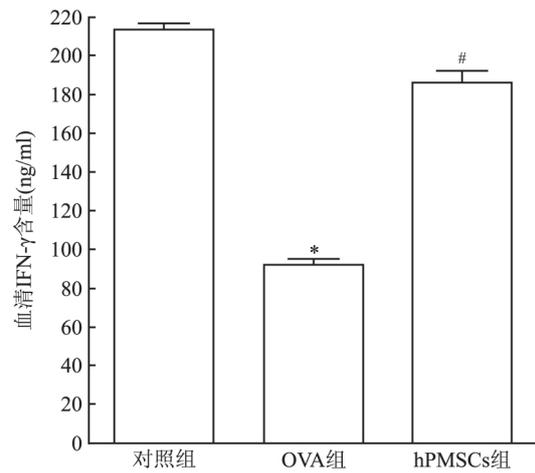
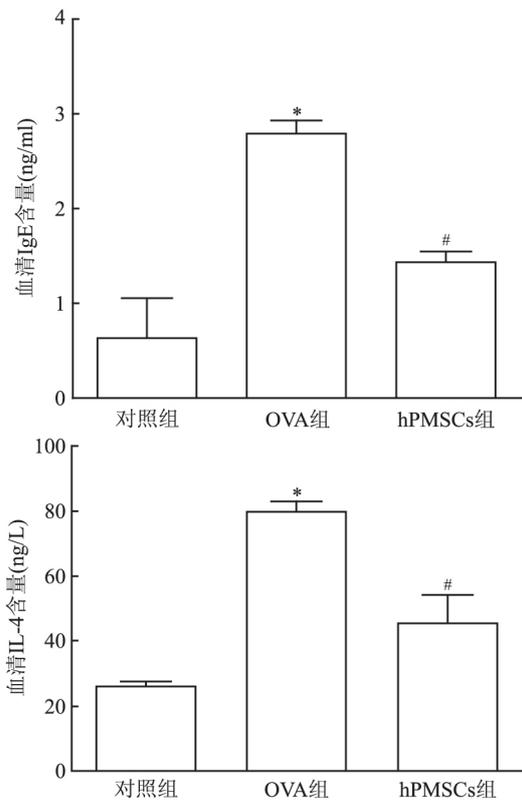


图4 大鼠血清中炎症因子表达  
与对照组比较: \*  $P < 0.05$ ; 与 OVA 组比较: #  $P < 0.05$

对照组未见炎症细胞浸润,肺泡壁完整、支气管无任何改变,而 OVA 组存在严重炎症改变,支气管黏膜增厚,管腔狭窄,说明哮喘模型制备成功; hPMSCs 组管腔轻微缩窄,炎症细胞浸润减轻,病理改变较 OVA 组好转。见图 3。

**2.3 ELISA 检测大鼠血清炎症细胞因子** OVA 组血清中 IgE、IL-4 含量高于对照组 ( $F = 77.41, P < 0.05$ ;  $F = 37.25, P < 0.05$ ), 而与 OVA 组比较, hPMSCs 组血清中 IgE、IL-4 含量下降 ( $F = 28.39, P < 0.05$ ;  $F = 14.81, P < 0.05$ ); OVA 组血清中 IFN- $\gamma$  含量低于对照组 ( $F = 58.10, P < 0.05$ ), 而与 OVA 组比较, hPMSCs 组血清中 IFN- $\gamma$  含量上升 ( $F =$

155.23,  $P < 0.05$ )。见图 4。

**2.4 大鼠肺组织中 Notch1、Notch2、Jagged1 mRNA 表达变化** OVA 组肺组织中 Notch1、Notch2、Jagged1 mRNA 表达水平高于对照组 ( $F = 56.20, P < 0.05$ ), 而与 OVA 组比较, hPMSCs 组 Notch1、Notch2、Jagged1 mRNA 表达水平下降 ( $F = 64.12, P < 0.05$ ); OVA 组 Notch3 mRNA 表达水平低于对照组 ( $P < 0.05$ ), 而与 OVA 组比较, hPMSCs 组 Notch3 mRNA 表达水平上升 ( $P < 0.05$ )。见图 5。

**2.5 Western blot 检测大鼠肺组织中 Notch 相关蛋白表达水平** OVA 组肺组织中 Notch1、Notch2、Jagged1 蛋白表达水平高于对照组 ( $F = 77.46, P <$

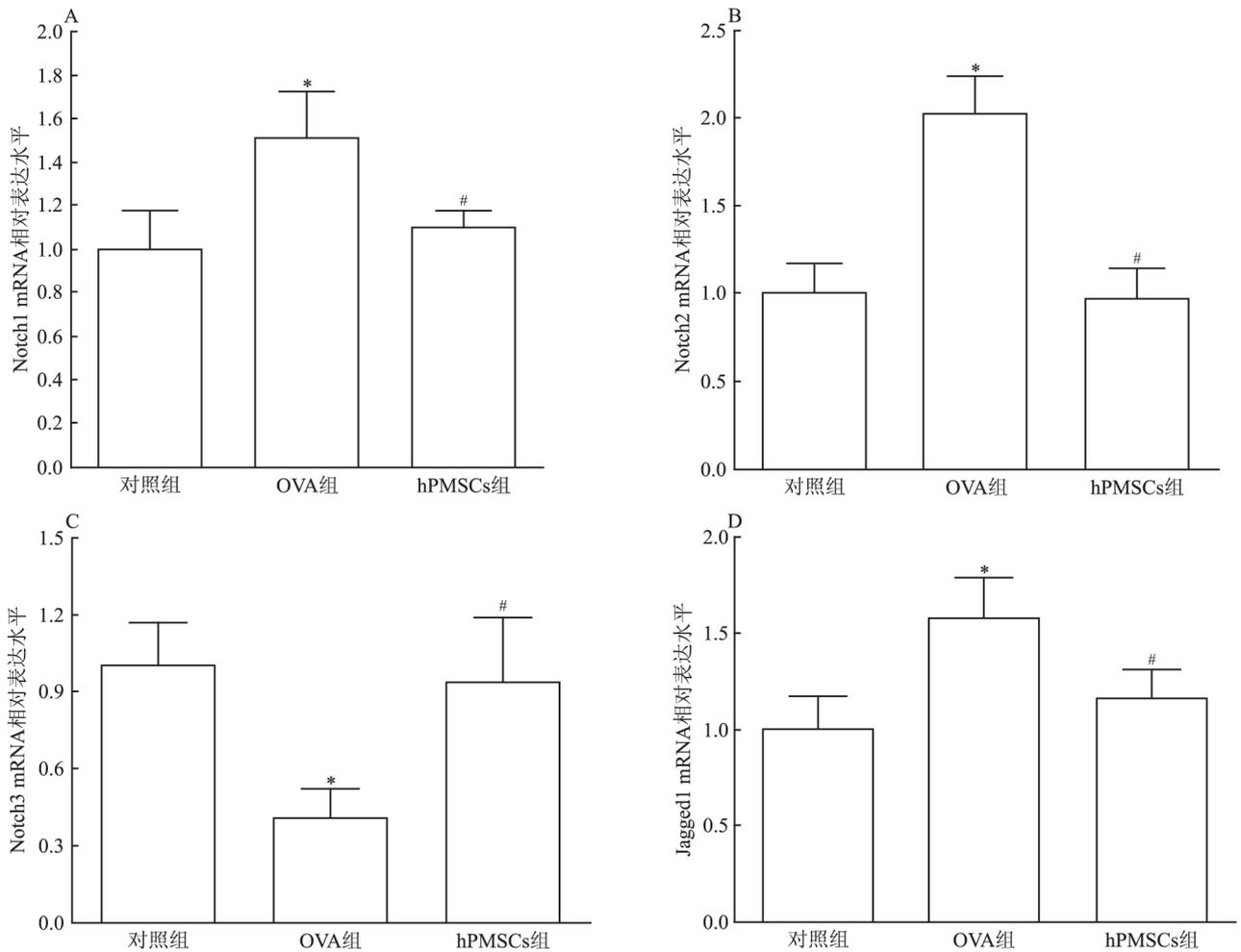


图5 大鼠肺组织中 Notch 相关 mRNA 表达水平

A: Notch1 相对表达水平; B: Notch2 相对表达水平; C: Notch3 相对表达水平; D: Jagged1 相对表达水平; 与对照组比较: \*  $P < 0.05$ ; 与 OVA 组比较: #  $P < 0.05$

0.05), 而与 OVA 组比较, hPMSCs 组 Notch1、Notch2、Jagged1 蛋白表达水平下降 ( $F = 105.18, P < 0.05$ ); OVA 组 Notch3 蛋白表达水平低于对照组, 而与 OVA 组比较, hPMSCs 组 Notch3 蛋白表达水平上升。见图 6。

### 3 讨论

哮喘是一种呼吸系统的异质性疾病, 表现为气道炎症导致持续性气道高反应性下出现的广泛而可逆性气道狭窄。哮喘气道炎症由多种细胞因子、黏附分子和炎症介质参与, 如淋巴细胞、巨噬细胞和中性粒细胞等<sup>[5-6]</sup>。有研究<sup>[7-8]</sup>表明, Th1/Th2 失衡可引起支气管哮喘, Th1 辅助细胞为 CD4<sup>+</sup> 细胞, 分泌 IL-2、IFN- $\gamma$  等对哮喘有一定的抑制作用, 还能促进 IgG 的生成。Th2 辅助细胞的主要执行细胞因子为 IL-4、IL-5 等, 能对抗细胞外多细胞寄生虫的免疫

反应, 另外 IL-4、IgE 会活化肥大细胞而释放组胺、血清素等, 造成气道收缩<sup>[9]</sup>。

hPMSCs 是来源于胎盘组织的新 MSCs, 较其他来源 MSCs 抗炎能力更强, 具备有多向分化潜能及免疫调节功能<sup>[10-11]</sup>。hPMSC 具有多分化潜能, 是一种理想的组织工程种子细胞。不同来源的 MSCs 生物学特性不尽相同, 如骨髓来源 MSC 造血能力极强, 脐血来源 MSC 有强的向神经细胞分化的潜能, 胎盘来源 MSC 在免疫调控方面更优。由于 hPMSCs 具有低免疫原性<sup>[12]</sup> 及免疫调节作用, 它可向损伤或炎症部位迁移发挥修复、炎症抑制作用。研究<sup>[13]</sup> 显示, hPMSCs 较其他 MSCs 有更强的迁移能力, 靶向治疗作用更明显, 有着更广阔的应用前景。

HE 染色显示, OVA 组存在严重炎症改变, 支气管黏膜增厚, 管腔狭窄, 这说明哮喘模型制备成功。hPMSCs 组炎症细胞浸润减轻, 黏液分泌下降, 气道

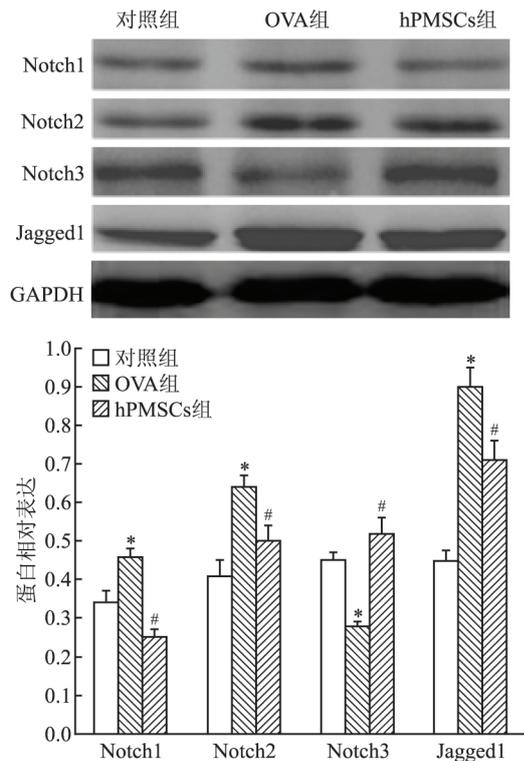


图6 大鼠肺组织中 Notch 相关蛋白表达水平  
与对照组比较: \*  $P < 0.05$ ; 与 OVA 组比较: #  $P < 0.05$

平滑肌增殖减弱,这说明 hPMSCs 能缓解哮喘发展,减轻哮喘诱发的支气管炎、细胞浸润的产生;IFN- $\gamma$  及 IL-4 分别是 Th1 和 Th2 类细胞的代表性细胞因子,ELISA 检测结果显示,与 OVA 组比较,hPMSCs 组血清中 IgE、IL-4 含量下降 ( $P < 0.05$ ),而 IFN- $\gamma$  含量上升 ( $P < 0.05$ )。这说明 hPMSCs 能够抑制哮喘大鼠炎症细胞因子的分泌和 IgE 的生成,与 HE 检测结果基本一致。

Notch 信号通路是一个在进化上十分保守的跨膜受体蛋白家族,在许多疾病过程中起到重要的作用<sup>[14]</sup>。一个完整的 Notch 信号通路包括 Notch 受体、Notch 配体及其下游分子<sup>[15]</sup>,对细胞的增殖、分化和凋亡具有重要调节作用。在哺乳类动物中存在有 4 种 Notch 受体 (Notch1 ~ 4) 及 5 种配体 (Serrate 家族配体: Jagged-1、2 和 Delta 家族配体: Delta-1、3、4)。Notch 配体能与细胞表面的 Notch 受体相互调节,激活 Notch 信号通路,调节外周 T 淋巴细胞、树突细胞和边缘区 B 细胞等,并参加细胞免疫功能的调节。哮喘发病的主要特征为活化的 T 细胞分泌过多的 Th2 类细胞因子 (IL-4、IL-5、IL-13 等),而 Th1 细胞减少,导致 Th1/Th2 失衡,产生包括气道重塑、气道高反应性、黏蛋白分泌过多和气道炎症等症

状。研究<sup>[16]</sup>证明 Notch 信号通路参与 Th1、Th2 细胞的增殖、分化过程,阻断 Notch 信号将影响 Th1、Th2 细胞应答。Jagged 蛋白可诱导 Th2 细胞分化,而 IFN- $\gamma$  能抑制 Th2 细胞的分化和功能。本实验 RT-qPCR 和 Western blot 结果表明,与 OVA 组比较,hPMSCs 组 Notch1、Notch2、Jagged1 mRNA 及蛋白表达水平下降,而 Notch3 mRNA 及蛋白表达水平上升。这提示 Notch 信号通路在哮喘发病机制中起着重要作用,同时 hPMSCs 可能通过抑制 Notch 受体 (Notch1、Notch2) 和配体 (Jagged1) 表达,上调 Notch3 表达产生影响,改善哮喘气道炎症,而哮喘发生时 Notch3 表现为抑制作用,这与 Maekawa et al<sup>[17]</sup>报道基本一致。

综上所述,本实验成功复制出哮喘大鼠模型,采用 hPMSCs 治疗后改善哮喘大鼠肺部病理症状,hPMSCs 可能通过 Notch 通路的调节作用,降低 IL-4、IgE 水平和增加 IFN- $\gamma$ ,减轻气道高反应性和炎症。目前的研究为将来进一步探讨 hPMSCs 与哮喘之间的关系奠定了基础,hPMSCs 可能成为治疗哮喘的新思路。

## 参考文献

- [1] 刘慧芳,姜敏,马海霞. 哮喘大鼠肺组织线粒体功能变化及其对氧化应激水平的影响[J]. 新乡医学院学报,2018,35(8):662-5.
- [2] 黄伟强,李惠,袁梅,等. 支气管哮喘患者外周血 T 细胞亚群 Th1、Th2 及其相关细胞因子水平变化及意义[J]. 山东医药,2015,55(20):40-1.
- [3] 姚意恩,李超乾. Notch 信号通路与支气管哮喘关系的研究进展[J]. 实用医学杂志,2019,35(2):315-7.
- [4] Lin Z R, Wang W G, Yan H M, et al. A method to induce asthma model by OVA in 129Sv mice strain[J]. Chin J Cell Bio, 2011, 33(9):964-8.
- [5] Barnig C, Levy B D. Innate immunity is a key factor for the resolution of inflammation in asthma[J]. Eur Respir Rev, 2015, 24(135):141-53.
- [6] 何桂媛,李文新,王莉,等. miR-146 在支气管哮喘发生发展中的研究进展[J]. 实用医学杂志,2018,34(10):1737-9.
- [7] 孟珊珊,于金燕,闫冰迪,等. 哮喘患者调节性 T 细胞对 Th1 和 Th2 细胞的影响[J]. 中华实用诊断与治疗杂志,2015,29(8):742-4.
- [8] 李春雷,阎玥,史琦,等. 理肺汤对哮喘大鼠肺组织病理损伤及血清 Th1/Th2 亚群失衡影响[J]. 中华中医药杂志,2017,32(7):2931-5.
- [9] 王熠杰,赵生涛,杨旭,等. IL-17A 抑制 Th2 细胞分化减轻哮喘小鼠气道嗜酸性粒细胞炎症[J]. 第三军医大学学报,2017,39(10):954-9.
- [10] Lee H J, Jung J, Cho K J, et al. Comparison of *in vitro* hepato-

- genic differentiation potential between various placenta-derived stem cells and other adult stem cells as an alternative source of functional hepatocytes [J]. *Differentiation*, 2012, 84(3): 223 - 31.
- [11] Koo B K, Park I Y, Kim J, et al. Isolation and characterization of chorionic mesenchymal stromal cells from human full term placenta [J]. *J Korean Med Sci*, 2012, 27(8): 857 - 63.
- [12] Lee J M, Jung J, Lee H J, et al. Comparison of immunomodulatory effects of placenta mesenchymal stem cells with bone marrow and adipose mesenchymal stem cells [J]. *Int Immunopharmacol*, 2012, 13(2): 219 - 24.
- [13] 高云, 黄新立, 张龙等. CCR1 基因过表达对骨髓间充质干细胞靶向肝癌迁移能力的影响 [J]. *中华肝脏病杂志*, 2017, 25(5): 354 - 9.
- [14] 胡美, 许欣婷, 李红梅等. Notch 信号通路调控哮喘小鼠气道上皮纤维化 [J]. *中国病理生理杂志*, 2016, 32(5): 781 - 6.
- [15] 张悦, 马蕾, 薛海波等. Notch 信号通路调控调节性 T 细胞分化与功能的研究进展 [J]. *现代免疫学*, 2018, 38(2): 162 - 5.
- [16] Neal L M, Qiu Y, Chung J, et al. T cell-restricted notch signaling contributes to pulmonary Th1 and Th2 immunity during cryptococcus neoformans infection [J]. *J Immunol*, 2017, 199(2): 643 - 55.
- [17] Maekawa Y, Tsukumo S, Chiba S, et al. Delta1-Notch3 interactions bias the functional differentiation of activated CD4<sup>+</sup> T cells [J]. *Immunity*, 2003, 19(4): 549 - 59.

## Protective effect and mechanism of hPMSCs on lung tissue of asthmatic rats

Lü Jian<sup>1</sup>, Zhong Zhefeng<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>Dept of Pediatrics, <sup>2</sup>Dept of Infectious Diseases, Nanhua Hospital Affiliated of University of South China, Hengyang 421002)

**Abstract Objective** To investigate the therapeutic effects of human placental mesenchymal stem cells (hPMSCs) on asthmatic rats and the effects of Notch signaling pathway related factors. **Methods** Thirty SD rats were randomly divided into three groups: control group, asthma model group (OVA group) and hPMSCs transplantation group (hPMSCs group), 10 rats/group. The morphological changes of lung tissue were observed by HE staining. The inflammatory factors in rat serum were detected by ELISA. The Notch1, Notch2, Notch3 and Jagged1 mRNA and protein in rat lung tissue were detected by RT-qPCR and Western blot. **Results** HE staining results showed that compared with OVA group, the lumen of hPMSCs group was slightly constricted and inflammatory cell infiltration was alleviated. ELISA results showed that serum immunoglobulin E (IgE) and interleukin 4 (IL-4) levels in OVA group were higher than those in control group ( $P < 0.05$ ), while interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) level was lower ( $P < 0.05$ ). Compared with OVA group, the levels of IgE and IL-4 in serum of hPMSCs group decreased ( $P < 0.05$ ), while the levels of IFN- $\gamma$  in serum increased ( $P < 0.05$ ). The results of RT-qPCR and Western blot showed that the expressions of Notch1, Notch2 and Jagged1 mRNA and protein in lung tissue of OVA group were higher than those of control group, while the expression of Notch3 mRNA and protein was lower. Compared with OVA group, the expression of Notch1, Notch2, Jagged1 and Notch3 mRNA and protein in hPMSCs group decreased, while the expression of Notch3 mRNA and protein increased. **Conclusion** hPMSCs can inhibit the inflammatory response of asthmatic rats by regulating Notch signaling pathway and play a role in the treatment of asthma.

**Key words** rat; hPMSCs; lung tissue; Notch