

昆布多糖通过调节巨噬细胞极化延缓肺纤维化研究

张波¹, 苑艳丽², 李玉彤¹, 薛涛¹, 刘言娟¹, 邵凤丽^{1*}, 辛杰¹, 李新朋^{1*}

1. 临沂大学, 山东 临沂 276000

2. 上海中医药大学, 上海 201203

摘要: **目的** 探索昆布多糖基于调节巨噬细胞极化抑制肺纤维化的作用机制。**方法** 将昆布中提取的硫酸多糖经自由基降解, 得到低相对分子质量昆布多糖 (low molecular weight fucoidan, LMWF), 并通过高效液相色谱测定了其单糖结构组成。通过免疫组化检测肺纤维化小鼠与 LMWF 治疗组小鼠 M2 巨噬细胞极化生物标志物的表达, 并通过 Western blotting 和 qRT-PCR 检测 M1/M2 标志物的表达。分别用脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 联合 γ 干扰素 (interferon- γ , IFN- γ) 和白细胞介素-4 (interleukin-4, IL-4) 诱导 MH-S 细胞, 构建体外 M1 和 M2 巨噬细胞极化模型, 探索 LMWF 调节巨噬细胞极化延缓肺纤维化的作用机制。**结果** LMWF 可显著降低肺纤维化小鼠肺组织中 M1/M2 巨噬细胞标志物的表达 ($P < 0.05, 0.01, 0.001$)。同样, LMWF 可有效抑制细胞模型中 M1 和 M2 型标志物的表达 ($P < 0.05, 0.01, 0.001$)。**结论** LMWF 可以通过早期抗炎作用调节 M1 巨噬细胞极化, 并在后期通过抑制 M2 巨噬细胞极化有助于减少纤维化。

关键词: 昆布; 低相对分子质量多糖; 肺纤维化; MH-S 细胞; 巨噬细胞极化

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2023)17-5619-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.17.015

Ecklonia kurome polysaccharides delays pulmonary fibrosis by regulating macrophages polarization

ZHANG Bo¹, YUAN Yan-li², LI Yu-tong¹, XUE Tao¹, LIU Yan-juan¹, SHAO Feng-li¹, XIN Jie¹, LI Xin-peng¹

1. Linyi University, Linyi 276000, China

2. Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China

Abstract: Objective To exploring the mechanism of *Ecklonia kurome* polysaccharides in inhibiting pulmonary fibrosis by regulating macrophage polarization. **Methods** Low molecular weight fucoidan (LMWF) was obtained by free radical degradation of sulfated polysaccharide extracted from *E. kurome*, and its monosaccharide structure was determined by high performance liquid chromatography. The expressions of polarized biomarkers in M2 macrophages of pulmonary fibrosis mice and LMWF treated mice were detected by immunohistochemistry, and the expressions of M1/M2 markers were detected by Western blotting and qRT-PCR. Lipopolysaccharide (LPS) combined with interferon- γ (IFN- γ) and interleukin-4 (IL-4) were used to induce MH-S cells respectively, and the polarization models of M1 and M2 macrophages *in vitro* were constructed to explore the mechanism of LMWF in regulating macrophage polarization and delaying pulmonary fibrosis. **Results** LMWF significantly decreased the expressions of M1/M2 macrophage markers in lung tissue of mice with pulmonary fibrosis ($P < 0.05, 0.01, 0.001$). Similarly, LMWF effectively inhibited the expressions of M1 and M2 markers in cell model ($P < 0.05, 0.01, 0.001$). **Conclusion** LMWF can regulate the polarization of M1 macrophages through anti-inflammatory effect in the early stage, and help to reduce fibrosis by inhibiting the polarization of M2 macrophages in the later stage.

Key words: *Ecklonia kurome* Okam.; low molecular weight fucoidan; pulmonary fibrosis; MH-S cell; M1/M2 macrophages polarization

收稿日期: 2023-04-13

基金项目: 山东省自然科学基金联合基金资助项目 (ZR2021LZY030); 临沂大学大学生创新创业训练计划项目 (X202210452199)

作者简介: 张波, 副教授, 研究方向为中药鉴定与质量评价。E-mail: zhangboyxy@lyu.edu.cn

*通信作者: 李新朋, 副教授, 研究方向为中药多糖活性评价。Tel: (0539)7258639 E-mail: lixinpeng513@126.com

邵凤丽, 副教授, 研究方向为海洋化学。E-mail: shaofengli@lyu.edu.cn

肺纤维化是一种以病因不明的慢性进行性纤维化间质性肺炎为特征的疾病^[1-2]。当发生肺损伤时,肺间质细胞会分泌胶原蛋白进行修复,但如果修复过度,即成纤维细胞过度增殖,细胞外基质大量积聚,就会形成肺纤维化。肺纤维化的发病机制包括成纤维细胞活化、细胞自噬能力下降、转化生长因子- β 1 (transforming growth factor- β 1, TGF- β 1) 信号通路的激活与免疫失衡。近年来,对肺纤维化发病机制的研究已不再局限于肺泡损伤相关的发病机制。肺纤维化很可能由内源性和外源性细胞应激引起,导致成纤维细胞活化、肺泡结构破坏、细胞外基质沉积、气体交换障碍和呼吸衰竭^[3]。而巨噬细胞参与了肺纤维化的整个发病过程,不同表型的巨噬细胞对肺纤维化有不同的影响^[4]。另一方面,巨噬细胞的极化受到微生物信号、组织特异性诱导、细胞因子和其他因素的调节^[5]。当巨噬细胞极化为不同的亚型时,它们受到不同信号通路的调节^[6]。在肺纤维化的不同阶段,巨噬细胞分化为不同的亚型。巨噬细胞的表型极化很可能是肺纤维化发生和发展的机制之一^[7]。

研究表明,巨噬细胞的极化影响肺纤维化的发展进程^[8]。在肺纤维化的早期,即肺泡炎症阶段,肺巨噬细胞极化为 M1 型^[9],在肺纤维化晚期,即纤维化修复阶段,巨噬细胞极化为 M2 亚型^[10-11]。炎症性巨噬细胞通常表现为 M1 激活型,分泌一氧化氮 (nitric oxide, NO)、活性氧 (reactive oxygen species, ROS)、白细胞介素 (interleukin, IL) 和肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF) 等^[12]。此时, M1 巨噬细胞也会分泌基质金属蛋白酶 2 (matrix metalloproteinase 2, MMP2) 和 MMP9,促进细胞外基质的降解,有利于炎症细胞浸润受损组织。当炎症持续时, M1 巨噬细胞改变了它们对炎症的反应方式,募集 Th17 细胞和中性粒细胞,导致持续的组织损伤^[13-14]。而 M2 巨噬细胞的激活也与肺纤维化的发展密切相关。研究指出 M2 巨噬细胞在小鼠纤维化模型和人类肺纤维化中发挥着重要作用^[15],它们可以产生纤维化介质。除了纤维化作用外,肺纤维化患者巨噬细胞表型的变化也可以解释为什么患者经常肺部感染,导致肺衰竭并最终死亡。因此,抑制 M2 巨噬细胞表型是肺纤维化的潜在治疗策略^[16]。

昆布为海带科植物海带 *Laminaria japonica* Aresch. 或翅藻科植物昆布 *Ecklonia kurome* Okam. 的

干燥叶状体,具有消痰软坚散结、利水消肿等功效。昆布多糖是昆布主要活性成分之一,药理活性丰富,而低相对分子质量昆布多糖 (low molecular weight fucoidan, LMWF) 是一种主要由岩藻糖组成的硫酸多糖,在肺纤维化小鼠模型中已经显示出抑制作用^[17-18]。LMWF 可以阻断 ROS 以抑制肺纤维化^[19],但先前的研究尚未探讨 LMWF 作用于肺泡巨噬细胞的机制。因此,本研究旨在阐明 LMWF 是否能作用于肺泡巨噬细胞的极化以延缓肺纤维化。

1 材料

1.1 动物与细胞

SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠,体质量 (22±2) g,购自中楚恒通生物科技有限公司 (济南),许可证号 SCXX (鄂) 2017-0012,动物实验已获得临沂大学医学院动物伦理委员会的批准 (批准号 LYU20200106)。

小鼠肺泡巨噬细胞系 (MH-S 细胞) 购自济南中楚生物科技有限公司。

1.2 药材

昆布采摘于青岛地区,经临沂大学辛杰副教授鉴定为翅藻科植物昆布 *E. kurome* Okam. 的干燥叶。

1.3 药品与试剂

乙醇 (分析纯,批号 YD20210421) 购自天津市永大化学试剂有限公司; Tris-HCl 缓冲液 (批号 20180807)、CCK-8 试剂盒 (批号 20210413)、胰蛋白酶 (批号 20210623)、RIPA 裂解液 (批号 20210521)、 γ 干扰素 (interferon- γ , IFN- γ , 批号 20220410)、2 mmol/L L-谷氨酰胺 (批号 20210514)、双抗 (批号 20220319)、RPMI 1640 培养基 (批号 20220401) 购自北京索莱宝生物科技有限公司; 精氨酸酶-1 (Arginase-1) 抗体 (批号 64q4824, 稀释比例 1:1000)、TNF- α 抗体 (批号 73g3336, 稀释比例 1:1000)、 β -actin 抗体 (批号 12w2944, 稀释比例 1:3000)、TGF- β 1 抗体 (批号 20r6523, 稀释比例 1:1000)、抵抗素样分子 α (found in inflammatory zone 1, Fizz-1) 抗体 (批号 85d1712, 稀释比例 1:1000) 购自 Affinity Biosciences 公司; CD163 抗体 (批号 20211110)、诱导型一氧化氮合酶 (inducible nitric oxide synthase, iNOS) 抗体 (批号 20211110)、CD86 抗体 (批号 20220210) 购自武汉基因美生物科技有限公司, 稀释比例 1:500; YM-1 抗体 (批号 ab93034) 购自英国 Abcam 公司, 稀释比例 1:1000; 山羊抗兔 IgG 二抗 (批号

56j9958)、山羊抗鼠 IgG 二抗(批号 19z2345)购自 Affinity Biosciences 公司, 稀释比例 1 : 5000; 引物购自生工生物工程有限公司; SYBR Green One Step qPCR 试剂盒(批号 U28220)购自翊圣生物科技有限公司; Prime-Script RT 试剂盒(批号 016100)购自东洋纺(上海)生物科技有限公司; 脂多糖(lipopolysaccharide, LPS, 批号 S11060)购自上海源叶生物科技有限公司; IL-4(批号 200-04)购自派普泰克生物科技(苏州)有限公司; *L*-岩藻糖标准品(批号 E1822041)购自上海阿拉丁生物科技股份有限公司; 博莱霉素(批号 193507)、10%胎牛血清(批号 2164724)购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司; 泼尼松(批号 LA21243)购自浙江仙琚制药有限公司。

1.4 仪器

041BR325717 型凝胶电泳仪(美国 Bio-Rad 公司); 1260 型高效液相色谱仪(瑞士 Agilent 公司); Light Cycler 96 型实时荧光定量 PCR 仪(瑞士 Roche 公司); 5200 型全自动化学发光成像仪(上海天能仪器有限公司)。

2 方法

2.1 昆布多糖化学组成

采取水提醇沉法提取昆布多糖。昆布加入 10 倍量纯水, 100 °C 提取 2 h, 提取液经硅藻土滤过, 滤液减压浓缩, 浓缩液与乙醇按体积比 1 : 4 沉淀^[20], 沉淀烘干得粗多糖。通过自由基降解(H_2O_2 -Vc 1 : 1, 30 mmol/L), 70 °C 降解 2 h, 氢氧化钠终止反应, 反应液浓缩后乙醇沉淀得到 LMWF。借助 CL-6B 柱洗脱, 用氯化钠作为洗脱剂, 得到 1.0 mol/L NaCl 洗脱组分(已有研究发现该组分对肺纤维化具有更好的抑制活性^[18])。基于 3-甲基-1-苯基-2-吡啶啉-5-酮柱前衍生化后的高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)分析 LMWF 的主要单糖成分^[21]。用苯酚-硫酸法测定总糖含量。用氯化钡-明胶法分析硫酸盐含量^[22]。半胱氨酸盐酸盐-硫酸法用于测定 LMWF 的岩藻糖含量, 以 *L*-岩藻糖作为标准品^[23]。

2.2 动物分组、造模与给药

动物实验样品来自前期实验研究^[19]: 小鼠随机分为假手术、模型组及 LMWF 低、中、高低剂量(25、50、100 mg/kg)组和泼尼松(3 mg/kg)组, 每组 12 只。前期采用预实验确定造模方法: 小鼠 ip 1%戊巴比妥钠麻醉后, 行气管切开术, 造模组小鼠气管内

慢滴注博莱霉素(博来霉素配制成溶液, 无菌滤过, 3.5 mg/kg, 滴加 1 mL), 假手术组小鼠气管内滴注等体积的生理盐水作为对照。术后缝合伤口, 消毒后将麻醉苏醒后的小鼠送回动物房, 自由饮水进食, 注意保温; 于博莱霉素诱导后 3、7、14、21、28 d 处死各组存活小鼠, 取肺组织进行苏木素-伊红(HE)染色观察其病理改变, 初步判断炎症及纤维化改变, 并采用 Masson 染色及天狼星红染色观察胶原沉积, 确定小鼠肺纤维化进展阶段和造模时间(Masson 和天狼星红染色出现胶原沉积, 纤维化样改变, 认为造模成功)。LMWF 用无菌蒸馏水溶解, 采用 ip 给药, 实验周期 28 d(由预实验确定)。

2.3 M2 型巨噬细胞标志物表达

取小鼠肺组织石蜡切片进行免疫组化检测, 观察 Arginase-1、Fizz-1、YM-1 的表达和定位。将小鼠肺组织在液氮中研磨以提取蛋白, 并用 BCA 试剂盒定量^[24-25]。采用 Western blotting 检测 M2 生物标志物(Fizz-1、Arginase-1、YM-1、TGF- β 1)的表达, 使用 Image J 软件分析差异。

2.4 qRT-PCR 检测 M1 与 M2 型巨噬细胞标志物表达

按照试剂盒说明书提取小鼠肺组织中总 RNA 并合成 cDNA, 进行 qRT-PCR 分析。检测小鼠肺组织中 Arginase-1、Fizz-1、IL-10、YM-1、TGF- β 1、CD86、TNF- α 、IL-6、Toll 样受体 4(Toll-like receptor 4, TLR4)和一氧化氮合酶 2(nitric oxide synthase 2, NOS2)的基因表达^[26]。引物序列见表 1。

2.5 CCK-8 检测细胞活力

MH-S 细胞用含 10%胎牛血清、2 mmol/L *L*-谷氨酰胺、100 U/mL 青霉素和 100 μ g/mL 链霉素的 RPMI 1640 培养基, 于 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中培养。细胞以 2×10^3 /孔接种到 96 孔板中, 与不同质量浓度(0、50、100、200、400、800、1000 μ g/mL)的 LMWF 共培养 24 h。加入 CCK-8 并培养 1 h, 采用分光光度计测定 450 nm 处的吸光度(A)值。

2.6 昆布多糖作用浓度筛选

以 2×10^3 /孔接种 MH-S 细胞, IL-4(20 ng/mL)诱导 48 h 构建 M2 极化模型^[27-28], 同时用不同质量浓度(100、200、400、800、1000 μ g/mL)的 LMWF 处理, 另设置不含药物的对照组。

用 IFN- γ (20 ng/mL)联合 LPS(10 ng/mL)诱导 MH-S 细胞 24 h, 构建 M1 型极化模型^[29], 同时用不同质量浓度(25、50、100、200、400、800 μ g/mL)

表 1 巨噬细胞标志物引物序列

基因	引物序列 (5'-3')
<i>Arginase-1</i>	F: CTCCAAGCCAAAGTCCTTAGAG R: GGAGCTGTCATTAGGGACATCA
<i>Fizz-1</i>	F: CCAATCCAGCTAACTATCCCTCC R: CCAGTCAACGAGTAAGCACAG
<i>IL-10</i>	F: GCTCTTACTGACTGGCATGAG R: CGCAGCTCTAGGAGCATGTG
<i>YM-1</i>	F: GCAAGACTTGCGTACTATGAA R: AACGGGGCAGGTCCAAA
<i>TGF-β1</i>	F: ACGTCACTGGAGTTGTACGG R: GGGGCTGATCCCGTTGATT
<i>CD86</i>	F: GAGCTGGTAGTATTTGGCAGG R: GGCCAGGTACTTGGCATT
<i>TNF-α</i>	F: CCTGTAGCCACGTCGTAG R: GGGAGTAGACAAGGTACAACCC
<i>IL-6</i>	F: TAGTCCTTCTACCCCAATTTCC R: TTGGTCTTAGCCACTCCTTC
<i>NOS2</i>	F: GGAGTGACGGCAAACATGACT R: TCGATGCACAACTGGGTGAAC
<i>TLR4</i>	F: TTTGACACCCTCCATAGACTTCA R: GAAACTGCAATCAAGAGTGCTG
<i>β-actin</i>	F: CCTCTATGCCAACACAGT R: AGCCACCAATCCACACAG

的 LMWF 处理细胞,另设置不含药物的对照组。用 CCK-8 试剂盒检测细胞活力以筛选有效浓度。

2.7 昆布多糖调节巨噬细胞极化

MH-S 细胞以 1×10^5 /mL 接种于 6 孔板,IL-4 (20 ng/mL) 诱导 48 h,并用不同质量浓度 (200、400、800 μg/mL) 的 LMWF 处理细胞。用 IFN-γ (20 ng/mL) 联合 LPS (100 ng/mL) 诱导,并用不同质量浓度 (200、400、800 μg/mL) 的 LMWF 处理细胞。于显微镜下观察细胞形态并拍照。按照试剂盒说明书提取细胞总 RNA 并合成 cDNA,进行 qRT-PCR 分析,检测 *Arginase-1*、*Fizz-1*、*IL-10*、*YM-1*、*TGF-β1*、*CD86*、*TNF-α*、*IL-6*、*TLR4*、胶原 (*collagen*)、纤维连接蛋白 (*fibronectin*, *FN*) 和 α-平滑肌肌动蛋白 (α-smooth muscle actin, *α-SMA*) 的基因表达,引物序列见表 1、2。提取细胞总蛋白并进行定量,采用 Western blotting 检测 *Fizz-1*、*Arginase-1*、*YM-1*、*TGF-β1*、*CD163*、*iNOS*、*TNF-α* 和 *CD86* 蛋白表达。

2.8 统计学分析

使用 Image Pro 软件分析 Western blotting 和免疫组化染色结果,并使用 GraphPad Prism 8.0 软件进行统计分析。各组之间的差异通过单因素方差分析 (ANOVA) 进行评估,然后进行 Dunnett 检验。所有定量数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

表 2 纤维化标志物引物序列

基因	引物序列 (5'-3')
<i>collagen</i>	F: ATGGATTCCCGTTCGAGTACG R: TCAGCTGGATAGCGACATCC
<i>FN</i>	F: AAGACCATACTGCGGAATG R: GAACATGACCGATTGGACC
<i>α-SMA</i>	F: GTGACTCACAACGTGCCTATC R: CTCGGCAGTAGTCACGAAGC
<i>β-actin</i>	F: CCTCTATGCCAACACAGT R: AGCCACCAATCCACACAG

3 结果

3.1 昆布多糖化学组成

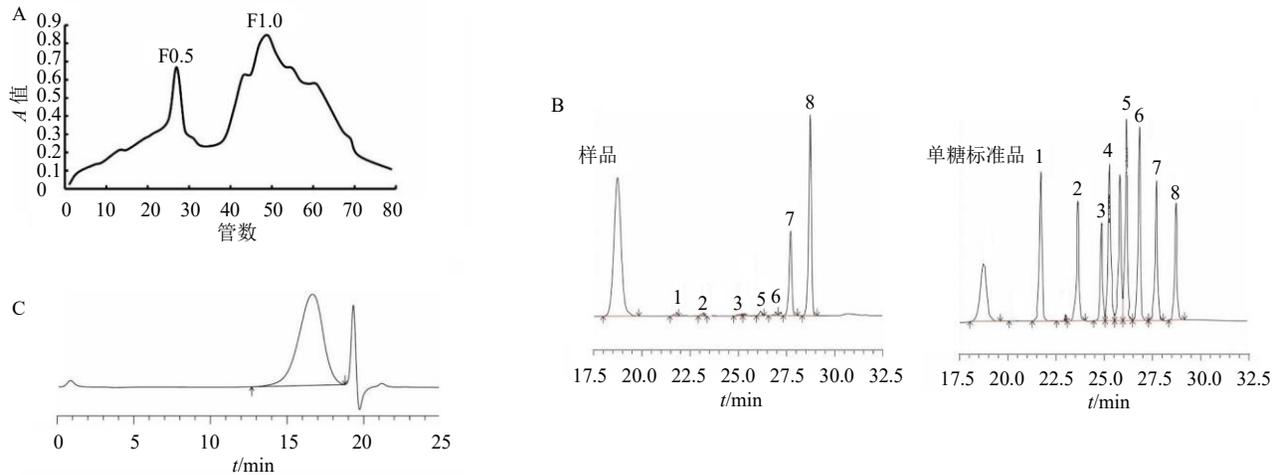
CL-6B 色谱柱对降解后的昆布多糖进行分离。梯度洗脱 (0~2 mol/L NaCl) 得到 2 个洗脱组分 (F0.5 和 F1.0), 收集 F1.0 组分 (图 1-A)。尽管 F1.0 的化学结构已经明确^[30], 但由于其基本化学组成与昆布的来源略有不同, 本研究仍然重新测试了 F1.0 的基本化学组成。单糖成分分析发现, 岩藻糖是主要成分, 其次是半乳糖和葡萄糖醛酸 (图 1-B)。相对分子质量测试显示为 9801 (图 1-C)。化学成分测试结果显示, 总糖、岩藻糖、糖醛酸、硫酸根质量分数分别为 52.53%、38.75%、2.98%、34.33%, 半乳糖、甘露糖、葡萄糖、鼠李糖、木糖、岩藻糖、葡萄糖醛酸物质的量比为 0.03 : 0.01 : 0 : 0.01 : 0.01 : 1 : 0.02。

3.2 小鼠肺组织 M2 型巨噬细胞标志物蛋白表达

免疫组化染色结果 (图 2-A) 显示, *Arginase-1*、*Fizz-1* 和 *YM-1* 在肺纤维化小鼠肺组织中的表达显著增加 ($P < 0.001$), 而 M2 巨噬细胞极化标记物在 LMWF 处理的小鼠肺组织中表达水平显著降低 ($P < 0.01$, 0.001)。通过 Western blotting 检测 M2 巨噬细胞极化生物标志物 (图 2-B), 结果显示 LMWF 在抑制生物标志物表达方面具有良好的稳定性, 显著降低了 *Fizz-1*、*Arginase-1*、*YM-1* 和 *TGF-β1* 表达 ($P < 0.05$, 0.01 , 0.001)。此外, 阳性对照药物泼尼松对 M2 巨噬细胞极化生物标志物的表达有良好的抑制作用, 但对 *YM-1* 表达没有明显的抑制作用。

3.3 小鼠肺组织 M1 和 M2 型巨噬细胞生物标志物基因表达

为了研究 LMWF 是否可以调节巨噬细胞极化, 检测了小鼠肺组织中 M1 和 M2 极化生物标志物的 mRNA 水平。如图 3 所示, 与假手术组比较, 模型组小鼠肺组织中 M2 型标志物 *Fizz-1*、*IL-10*、*Arginase-1* 和 *YM-1* 基因表达水平均显著升高 ($P <$

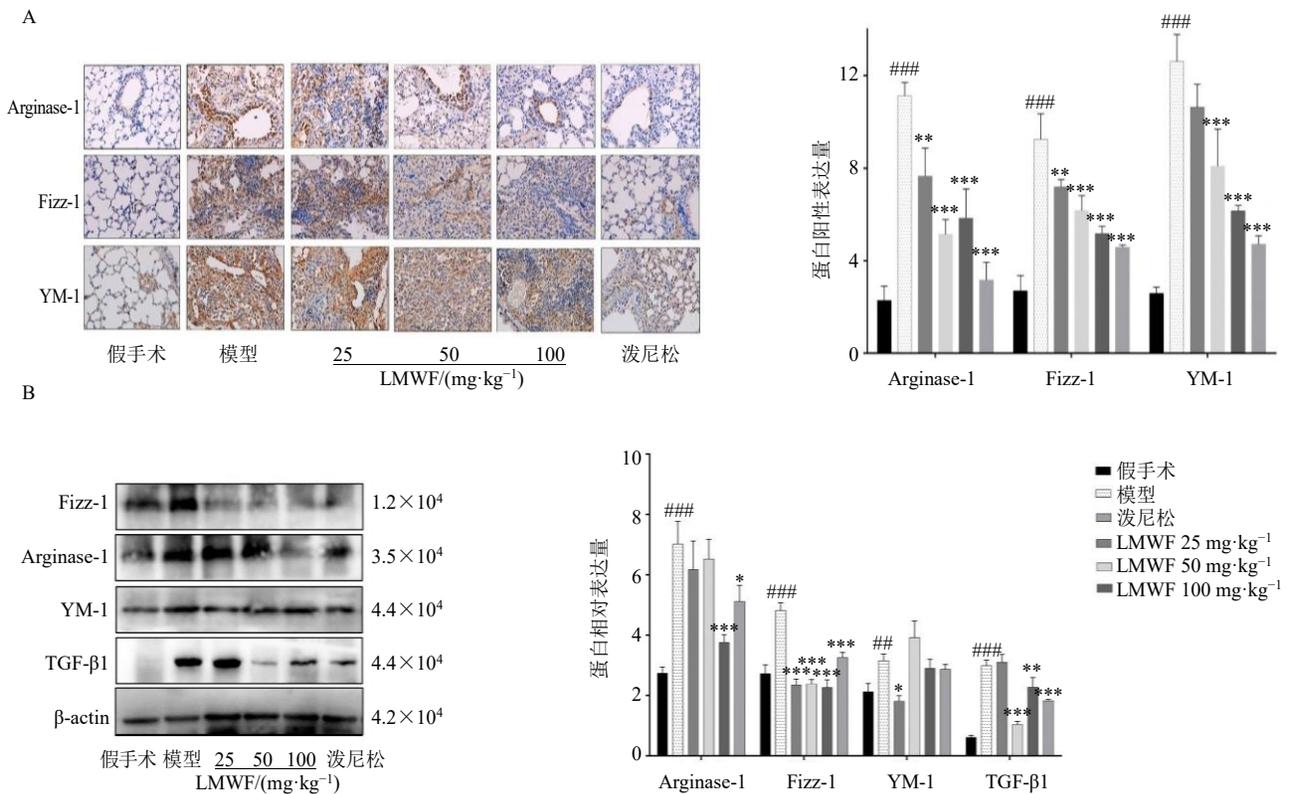


A-梯度洗脱曲线 B-单糖组成图谱 (1-甘露糖, 2-鼠李糖, 3-葡萄糖醛酸, 4-葡萄糖, 5-半乳糖, 6-木糖, 7-岩藻糖, 8-核糖) C-采用高效液相色谱检测多糖相对分子质量组成的图谱

A-gradient elution curve B-monosaccharide composition (1-mannose, 2-rhamnose, 3-glucuronic acid, 4-glucose, 5-galactose, 6-xylose, 7-fucose, 8-ribose) C-spectrum of molecular weight composition of polysaccharides by high performance liquid chromatography

图1 昆布多糖 F1.0 组分化学组成

Fig. 1 Chemical composition of *E. kurome* polysaccharide F1.0 component



A-免疫组化检测 Arginase-1、Fizz-1 和 YM-1 的表达 ($\times 400$) B-Western blotting 检测 M2 巨噬细胞极化生物标志物的表达 与假手术组比较: $###P < 0.01$ $####P < 0.001$; 与模型组比较: $*P < 0.05$ $**P < 0.01$ $***P < 0.001$, 图3同

A-Arginase-1, Fizz-1 and YM-1 expressions by immunohistochemistry B-expressions of polarized biomarkers in M2 macrophages by Western blotting $###P < 0.01$ $####P < 0.001$ vs sham group; $*P < 0.05$ $**P < 0.01$ $***P < 0.001$ vs model group, same as fig. 3

图2 LMWF 对肺纤维化小鼠肺组织中 M2 型巨噬细胞标志物蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 Effect of LMWF on M2 macrophage markers protein expressions in lung tissue of mice with pulmonary fibrosis ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

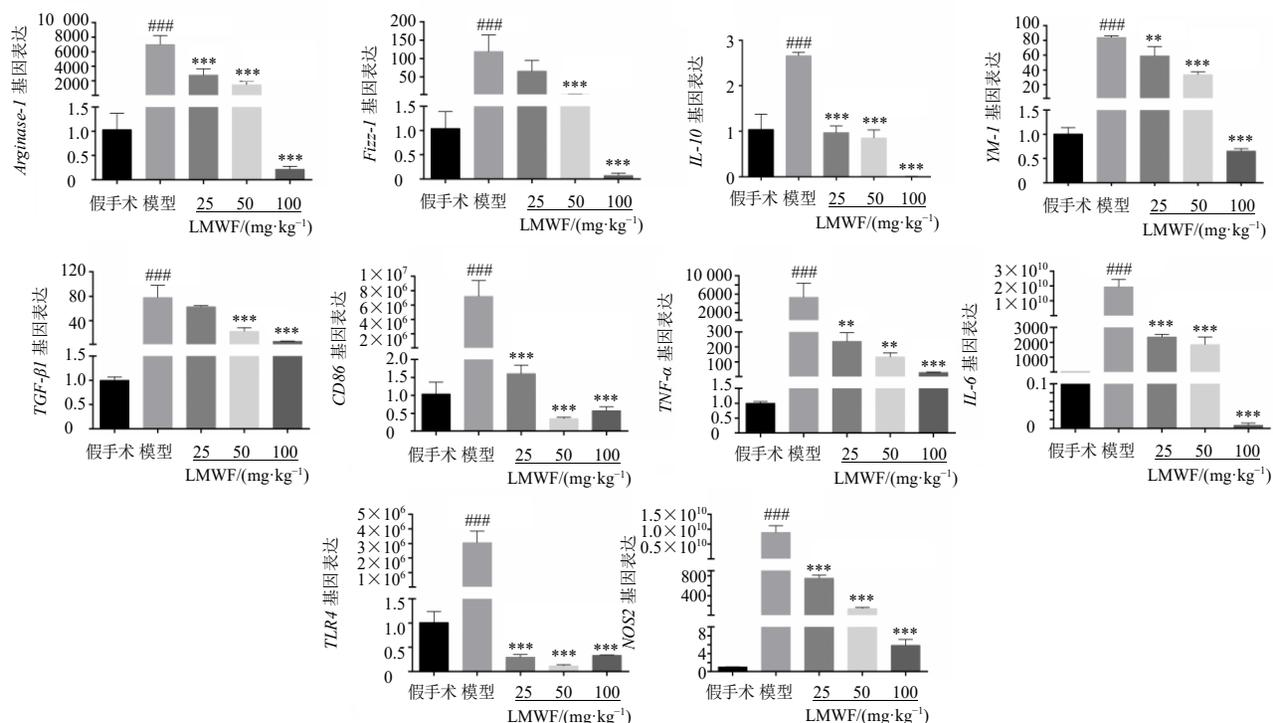


图3 LMWF对肺纤维化小鼠肺组织中M1和M2巨噬细胞生物标志物基因表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 3 Effect of LMWF on M1 and M2 macrophages biomarkers gene expressions in lung tissue of mice with pulmonary fibrosis ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

0.001), 而 LMWF 能够减少 M2 型巨噬细胞标志物表达 ($P < 0.01, 0.001$)。同时, LMWF 也降低了 *TGF-β1* 表达 ($P < 0.001$)。此外, LMWF 可降低 M1 型生物标志物 *CD86*、*TNF-α*、*IL-6*、*TLR4*、*NOS2* 表达 ($P < 0.01, 0.001$)。

3.4 昆布多糖调节 M2 型巨噬细胞极化

为了探索 LMWF 对巨噬细胞极化的调节作用, 评估了 LMWF 在 IL-4 诱导 MH-S 细胞中的作用。采用 CCK-8 法检测细胞毒性。结果表明, LMWF (0~1 mg/mL) 对 MH-S 细胞无毒性 (图 4-A)。IL-4 诱导后, 细胞形态发生变化, LMWF 可以有效调节细胞形态, 减少 IL-4 对细胞的损伤 (图 4-C)。浓度筛选后, 选择 200、400、800 μg/mL 作为实验浓度 (图 4-B)。检测 M2 巨噬细胞极化生物标志物的蛋白和 mRNA 表达 (图 4-D、图 5), 结果表明 LMWF 可以有效降低 M2 型生物标志物表达 ($P < 0.05, 0.01, 0.001$)。同时, 还检测了纤维化标志物的 mRNA 表达 (图 5)。结果表明, IL-4 诱导后, 纤维化标志物表达增加 ($P < 0.05, 0.01$), LMWF 可以降低纤维化标志物的表达 ($P < 0.05, 0.01$)。

3.5 昆布多糖调节 M1 巨噬细胞极化

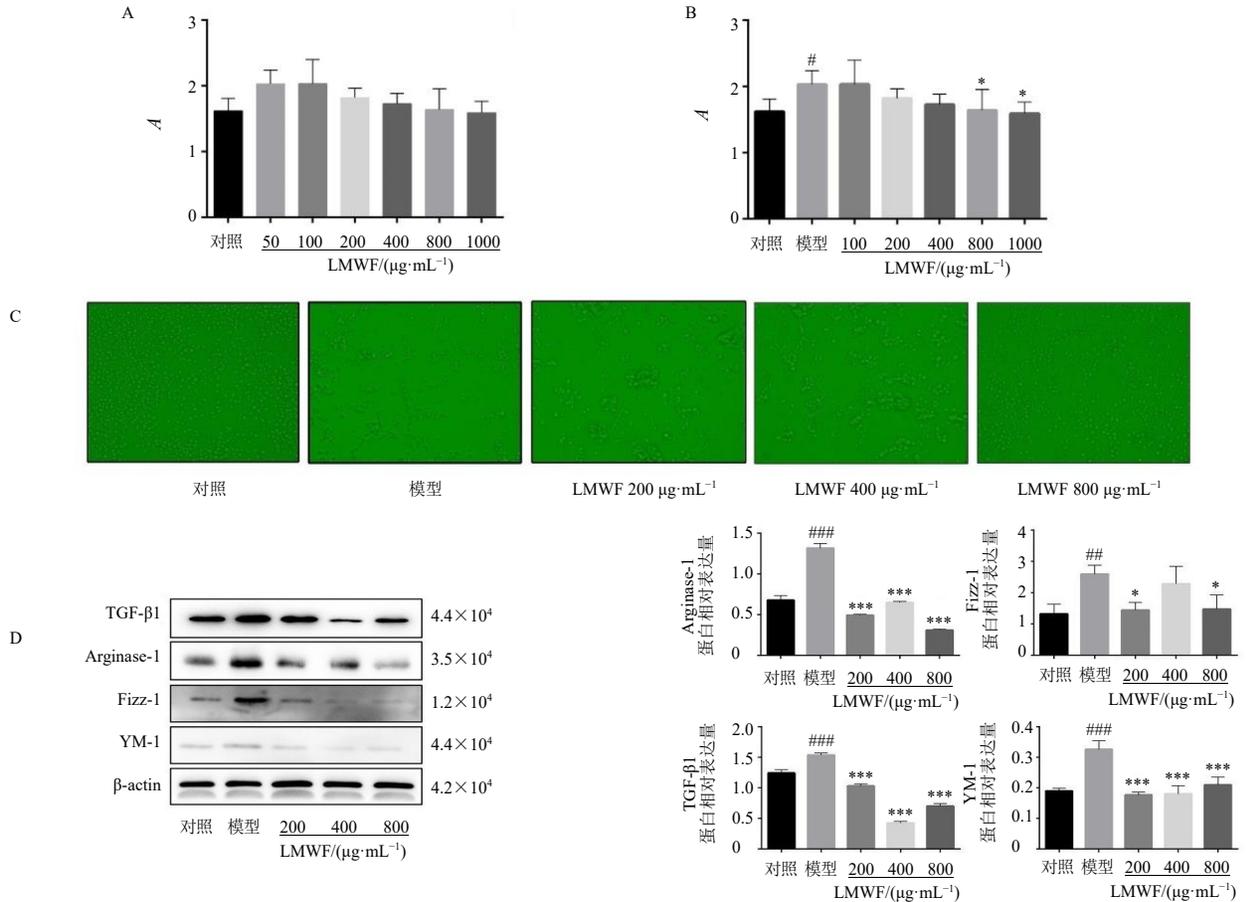
借助 LPS+IFN-γ 诱导 MH-S 细胞构建 M1 巨

噬细胞极化模型 (图 6-A)。诱导后细胞的形态学变化并不明显, 通过 CCK-8 试剂盒筛选有效浓度。结果表明, LMWF 对抑制炎症显示出效果, 并选择了 200、400、800 μg/mL 作为作用浓度 (图 6-B)。通过 Western blotting 和 qRT-PCR 检测 M1 巨噬细胞生物标志物的表达 (图 6-C、D)。结果显示 LPS 降低了 CD163 的表达 ($P < 0.001$), 增强了 iNOS、TNF-α、CD86 表达 ($P < 0.001$)。然而, LMWF 可以有效调节其表达 ($P < 0.01, 0.001$)。qRT-PCR 检测也显示出类似的结果。

4 讨论

通过前期研究发现 LMWF 可以有效地抑制肺纤维化进展, 尽管已经证实 LMWF 可以阻断 TGF-β/Smad 信号通路和核因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor E2 related factor 2, Nrf2) 抑制肺纤维化^[18-19], 然而对于 LMWF 抑制肺纤维化的具体作用机制仍需进一步探索。

在肺纤维化早期, 多种损伤、刺激可招募循环来源的单核细胞, 进入病变组织后分化为巨噬细胞^[31]。巨噬细胞分化可形成炎症状态截然不同的 2 个极端, 这一过程称为巨噬细胞极化。经典激活的 M1 型巨噬细胞和替代激活的 M2 型巨噬细胞是极化



A-LMWF对MH-S细胞活力的影响 ($n = 6$) B-LMWF对IL-4诱导的MH-S细胞活力的影响 ($n = 6$) C-LMWF对IL-4诱导的MH-S细胞形态的影响 ($\times 200$) D-LMWF对IL-4诱导的MH-S细胞M2巨噬细胞极化生物标志物表达的影响 ($n = 3$) 与对照组比较: $^{\#}P < 0.05$ $^{\#\#}P < 0.01$ $^{\#\#\#}P < 0.001$; 与模型组比较: $^*P < 0.05$ $^{**}P < 0.01$ $^{***}P < 0.001$, 下图同

A-effect of LMWF on viability of MH-S cells ($n = 6$) B-effect of LMWF on viability of IL-4-induced MH-S cells ($n = 6$) C-effect of C-LMWF on morphology of IL-4-induced MH-S cells ($\times 200$) D-effect of LMWF on expressions of polarization biomarkers of M2 macrophages in IL-4-induced MH-S cells ($n = 3$) $^{\#}P < 0.05$ $^{\#\#}P < 0.01$ $^{\#\#\#}P < 0.001$ vs control group; $^*P < 0.05$ $^{**}P < 0.01$ $^{***}P < 0.001$ vs model group, same as below figures

图4 LMWF对IL-4诱导的MH-S细胞M2型巨噬细胞标志物蛋白表达的影响

Fig. 4 Effect of LMWF on M2 macrophage polarization biomarkers protein expressions in IL-4-induced MH-S cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

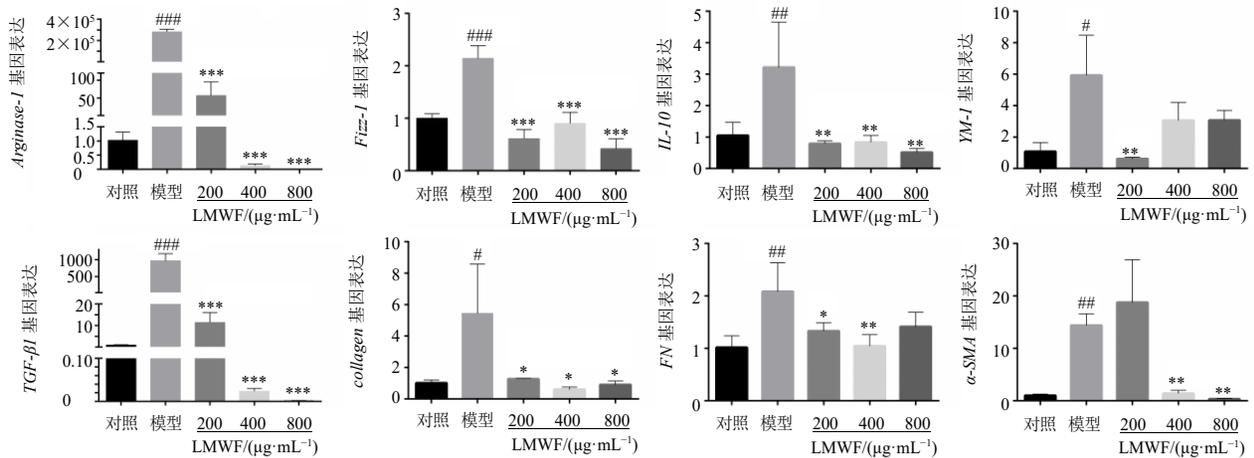
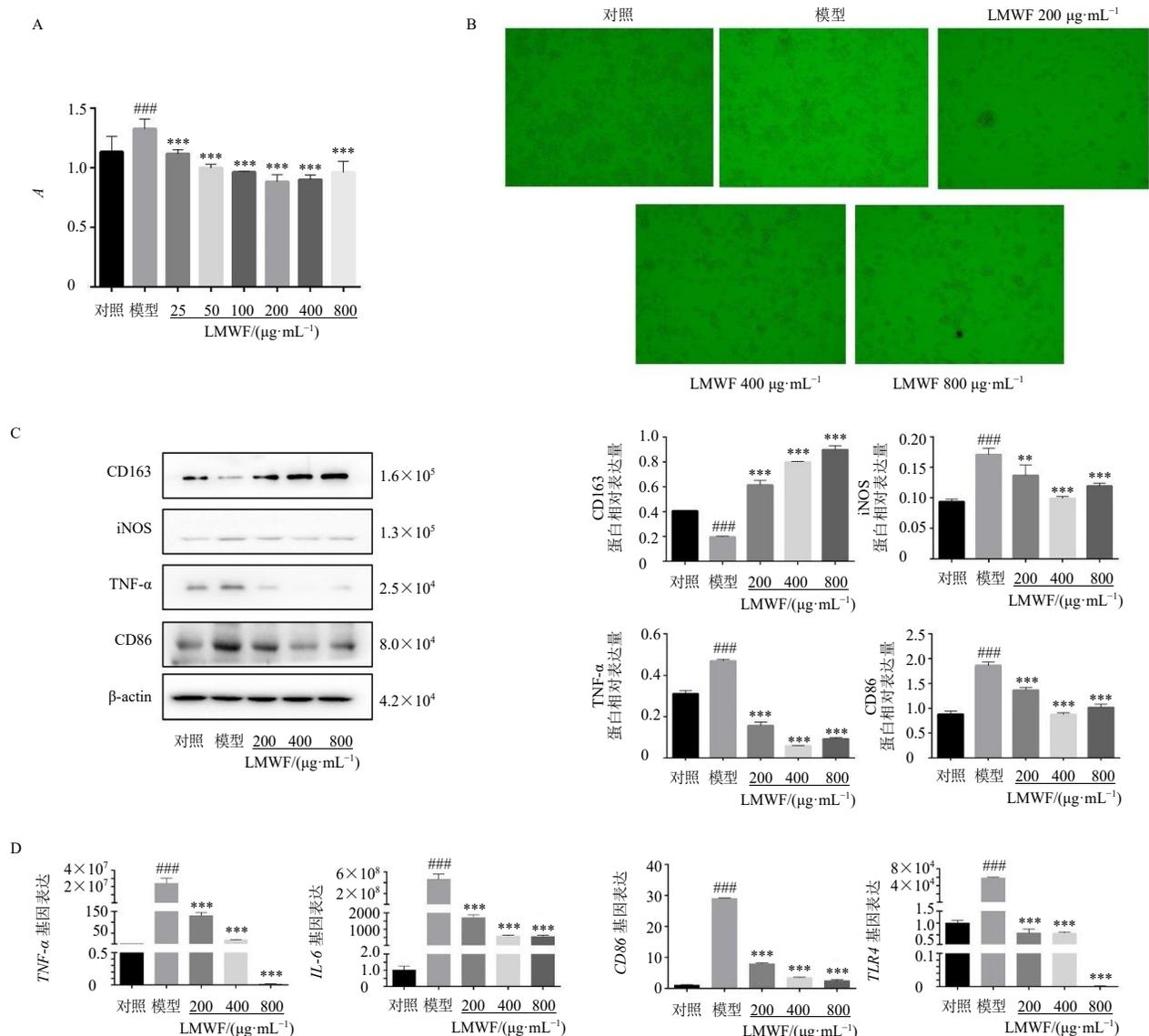


图5 LMWF对IL-4诱导的MH-S细胞M2型巨噬细胞标志物和纤维化标志物基因表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 5 Effect of LMWF on M2 macrophage polarization biomarkers and fibrosis markers gene expressions in IL-4-induced MH-S cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)



A-LMWF 对 LPS/IFN- γ 诱导的 MH-S 细胞活力的影响 ($n=6$) B-LMWF 对 LPS/IFN- γ 诱导的 MH-S 细胞形态的影响 ($\times 200$) C-LMWF 对 LPS/IFN- γ 诱导的 MH-S 细胞 M1 巨噬细胞极化生物标志物蛋白表达的影响 ($n=3$) D-LMWF 对 LPS/IFN- γ 诱导的 MH-S 细胞 M1 巨噬细胞生物标志物基因表达的影响 ($n=3$)

A-effect of LMWF on viability of LPS/IFN- γ -induced MH-S cells ($n=6$) B-effect of LMWF on morphology of LPS/IFN- γ -induced MH-S cells ($\times 200$) C-effect of LMWF on M1 macrophage polarization biomarkers protein expressions in LPS/IFN- γ -induced MH-S cells ($n=3$) D-effect of LMWF on polarization biomarkers of M1 macrophage biomarkers gene expressions in LPS/IFN- γ -induced MH-S cells ($n=3$)

图 6 LMWF 对 LPS/IFN- γ 诱导的 MH-S 细胞 M1 型巨噬细胞标志物表达的影响

Fig. 6 Effect of LMWF on M1 macrophage polarization biomarkers expressions in LPS/IFN- γ -induced MH-S cells

的 2 个亚群，二者具有截然不同的基因表达谱和蛋白标志物。组织损伤发生的早期，即急性炎症期，坏死凋亡细胞招募促炎性单核细胞聚集，分化为经典激活的 M1 型巨噬细胞，清除坏死组织并表达大量促炎细胞因子如 TNF- α 、IL-1、IL-6、IFN- γ 等。随后促炎信号受到抑制，更倾向于分化为替代激活的 M2 型巨噬细胞，表达高水平抗炎细胞因子和生长因子如 IL-4、IL-10、TGF- β 1 等，促进上皮和内

皮细胞分化增殖，恢复组织形态结构，并促使成纤维细胞发生表型转化，变为肌成纤维细胞，合成分泌细胞外基质，促进组织修复^[11]；但如果 M2 巨噬细胞持续激活，则促进肌成纤维细胞进一步分泌细胞外基质，形成纤维化^[32]。

为阐明 LMWF 通过巨噬细胞极化抑制肺纤维化的机制，本研究通过 Western blotting、qRT-PCR 和免疫组化法检测 M2 巨噬细胞生物标志物

(Arginase-1、Fizz-1、YM-1 和 TGF- β 1) 在肺组织中的表达水平。结果发现 LMWF 可以有效调节其表达水平,表明 LMWF 可以通过调节 M2 巨噬细胞的极化来抑制肺纤维化的发展。在肺纤维化晚期, M2 巨噬细胞占主导地位, 而最关键的调节因子是 TGF- β 1。LMWF 可以有效地阻断其分泌, 对抑制肺纤维化过程至关重要。此外, 炎症是肺纤维化的早期临床表现, 这也是本研究检测炎症因子表达的原因。研究发现, 炎症因子和 M1 巨噬细胞生物标志物在 qRT-PCR 结果中也出现高表达, 而 LMWF 可以有效降低其表达, 表明 LMWF 是可以通过早期抗炎作用和晚期调节 M2 巨噬细胞极化来抑制肺纤维化。

随后通过体外实验验证其作用机制。首先, 用 IL-4 诱导 MH-S 细胞, 构建 M2 巨噬细胞极化模型。发现 IL-4 处理后细胞的形态学发生明显变化。Western blotting 和 qRT-PCR 结果显示, M2 巨噬细胞生物标志物的表达增加, 而 LMWF 可以有效降低其表达, 尤其是降低 TGF- β 1 表达。这也表明 LMWF 可以调节 M2 巨噬细胞的极化, 体内实验的结果得到了验证。此外, 研究发现 IL-4 诱导后 collagen、FN 和 α -SMA mRNA 的表达增加, LMWF 干预后纤维化标志物表达明显降低。

本研究通过 LPS 和 IFN- γ 联合诱导 MH-S 细胞, 构建 M1 巨噬细胞极化模型。发现 LMWF 可以减少炎症因子 (iNOS 和 TNF- α) 的分泌, 并减少炎症的表达。表明 LMWF 可以通过其抗炎作用有效阻断 M1 巨噬细胞的极化并抑制炎症的发展, 与本课题组前期研究结果一致^[19]。结合体外实验研究证实 LMWF 可以调节 M1/M2 巨噬细胞的极化, 抑制炎症的发展, 阻断纤维化过程, 并在晚期阻断 M2 巨噬细胞的极化和抑制 TGF- β 1 表达。本研究结果表明 LMWF 可以通过调节 M1/M2 巨噬细胞的极化来抑制肺纤维化。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Hutchinson J, Fogarty A, Hubbard R, et al. Global incidence and mortality of idiopathic pulmonary fibrosis: A systematic review [J]. *Eur Respir J*, 2015, 46(3): 795-806.
- [2] Richeldi L, Collard H R, Jones M G. Idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Lancet*, 2017, 389(10082): 1941-1952.
- [3] Meyer K C. Pulmonary fibrosis, part I: Epidemiology, pathogenesis, and diagnosis [J]. *Expert Rev Respir Med*, 2017, 11(5): 343-359.
- [4] Laskin D L, Malaviya R, Laskin J D. Role of macrophages in acute lung injury and chronic fibrosis induced by pulmonary toxicants [J]. *Toxicol Sci*, 2019, 168(2): 287-301.
- [5] Yunna C, Mengru H, Lei W, et al. Macrophage M1/M2 polarization [J]. *Eur J Pharmacol*, 2020, 877: 173090.
- [6] Zhou D X, Huang C, Lin Z, et al. Macrophage polarization and function with emphasis on the evolving roles of coordinated regulation of cellular signaling pathways [J]. *Cell Signal*, 2014, 26(2): 192-197.
- [7] Kolahian S, Fernandez I E, Eickelberg O, et al. Immune mechanisms in pulmonary fibrosis [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2016, 55(3): 309-322.
- [8] Byrne A J, Maher T M, Lloyd C M. Pulmonary macrophages: A new therapeutic pathway in fibrosing lung disease? [J]. *Trends Mol Med*, 2016, 22(4): 303-316.
- [9] 蔡泽慧, 赵鹏, 张蓝熙, 等. 巨噬细胞活化参与肺纤维化机制研究进展 [J]. *中国老年学杂志*, 2022, 42(15): 3853-3857.
- [10] Guo Z J, Li S R, Zhang N, et al. Schisandra inhibit bleomycin-induced idiopathic pulmonary fibrosis in rats via suppressing M2 macrophage polarization [J]. *Biomed Res Int*, 2020, 2020: 5137349.
- [11] Wang Y, Zhang L, Wu G R, et al. MBD2 serves as a viable target against pulmonary fibrosis by inhibiting macrophage M2 program [J]. *Sci Adv*, 2021, 7(1): eabb6075.
- [12] Shapouri-Moghaddam A, Mohammadian S, Vazini H, et al. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease [J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233(9): 6425-6440.
- [13] Dong M, Zhou C P, Ji L, et al. AG1296 enhances plaque stability via inhibiting inflammatory responses and decreasing MMP-2 and MMP-9 expression in ApoE^{-/-} mice [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 489(4): 426-431.
- [14] Yao Y Y, Wang Y, Zhang Z J, et al. Chop deficiency protects mice against bleomycin-induced pulmonary fibrosis by attenuating M2 macrophage production [J]. *Mol Ther*, 2016, 24(5): 915-925.
- [15] Su S C, Zhao Q Y, He C H, et al. MiR-142-5p and miR-130a-3p are regulated by IL-4 and IL-13 and control profibrogenic macrophage program [J]. *Nat Commun*, 2015, 6: 8523.
- [16] Pan T, Zhou Q, Miao K, et al. Suppressing Sart1 to modulate macrophage polarization by siRNA-loaded liposomes: A promising therapeutic strategy for pulmonary fibrosis [J]. *Theranostics*, 2021, 11(3): 1192-1206.
- [17] Wang L, Zhang P, Li X P, et al. Low-molecular-weight fucoidan attenuates bleomycin-induced pulmonary

- fibrosis: Possible role in inhibiting TGF- β 1-induced epithelial-mesenchymal transition through ERK pathway [J]. *Am J Transl Res*, 2019, 11(4): 2590-2602.
- [18] Wu N, Li Z, Wang J, *et al.* Low molecular weight fucoidan attenuating pulmonary fibrosis by relieving inflammatory reaction and progression of epithelial-mesenchymal transition [J]. *Carbohydr Polym*, 2021, 273: 118567.
- [19] Dong H D, Xue T, Liu Y J, *et al.* Low molecular weight fucoidan inhibits pulmonary fibrosis *in vivo* and *in vitro* via antioxidant activity [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2022, 2022: 7038834.
- [20] Xu J G, Wang Y, Wang Z, *et al.* Fucoidan mitigated diabetic nephropathy through the downregulation of PKC and modulation of NF- κ B signaling pathway: *in vitro* and *in vivo* investigations [J]. *Phytother Res*, 2021, 35(4): 2133-2144.
- [21] Honda S, Akao E, Suzuki S, *et al.* High-performance liquid chromatography of reducing carbohydrates as strongly ultraviolet-absorbing and electrochemically sensitive 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone derivatives [J]. *Anal Biochem*, 1989, 180(2): 351-357.
- [22] Kawai Y, Seno N, Anno K. A modified method for chondrosulfatase assay [J]. *Anal Biochem*, 1969, 32(2): 314-321.
- [23] Dische Z, Shettles L B. A specific color reaction of methylpentoses and a spectrophotometric micromethod for their determination [J]. *J Biol Chem*, 1948, 175(2): 595-603.
- [24] Anders C B, Lawton T M W, Smith H L, *et al.* Use of integrated metabolomics, transcriptomics, and signal protein profile to characterize the effector function and associated metabotype of polarized macrophage phenotypes [J]. *J Leukoc Biol*, 2022, 111(3): 667-693.
- [25] Wculek S K, Dunphy G, Heras-Murillo I, *et al.* Metabolism of tissue macrophages in homeostasis and pathology [J]. *Cell Mol Immunol*, 2022, 19(3): 384-408.
- [26] Li X P, Li X H, Zhang Q B, *et al.* Low molecular weight fucoidan and its fractions inhibit renal epithelial mesenchymal transition induced by TGF- β 1 or FGF-2 [J]. *Int J Biol Macromol*, 2017, 105: 1482-1490.
- [27] Zhao P, Cai Z H, Tian Y G, *et al.* Effective-compound combination inhibits the M2-like polarization of macrophages and attenuates the development of pulmonary fibrosis by increasing autophagy through mTOR signaling [J]. *Int Immunopharmacol*, 2021, 101(Pt B): 108360.
- [28] Huang C R, Du W, Ni Y M, *et al.* The effect of short-chain fatty acids on M2 macrophages polarization *in vitro* and *in vivo* [J]. *Clin Exp Immunol*, 2022, 207(1): 53-64.
- [29] Lin Y H, Wang Y H, Peng Y J, *et al.* Interleukin 26 skews macrophage polarization towards M1 phenotype by activating cJUN and the NF- κ B pathway [J]. *Cells*, 2020, 9(4): 938.
- [30] Wang J, Zhang Q B, Zhang Z S, *et al.* Structural studies on a novel fucogalactan sulfate extracted from the brown seaweed *Laminaria japonica* [J]. *Int J Biol Macromol*, 2010, 47(2): 126-131.
- [31] Rao L Z, Wang Y, Zhang L, *et al.* IL-24 deficiency protects mice against bleomycin-induced pulmonary fibrosis by repressing IL-4-induced M2 program in macrophages [J]. *Cell Death Differ*, 2021, 28(4): 1270-1283.
- [32] Zhu L, Fu X, Chen X, *et al.* M2 macrophages induce EMT through the TGF- β /Smad2 signaling pathway [J]. *Cell Biol Int*, 2017, 41(9): 960-968.

[责任编辑 李亚楠]