

辛伐他汀对大鼠烟雾吸入性肺损伤中炎症反应的抑制作用

杨荣强¹, 崔正军¹, 刘建红², 郭鹏飞¹, 邹仕波¹, 王常印¹, 高 娅¹, 王晓博¹

摘要 目的 研究辛伐他汀对大鼠烟雾吸入性肺损伤中炎症反应的抑制作用。方法 将 18 只 SD 大鼠(雌雄不限)随机分为正常组、盐水组、辛伐他汀组,建立烟雾吸入性肺损伤模型。模型建立后 30 min 及 12 h,辛伐他汀组给予辛伐他汀溶液 50 mg/kg 灌胃,盐水组大鼠给予等量生理盐水灌胃,正常组大鼠正常饲养。于致伤后 24 h 取右上肺肺组织行病理检查并行病理学评分。经腹主动脉取全血离心留取上层血清,并行左侧支气管肺泡灌洗留取肺泡灌洗液(BALF),采用 ELISA 法检测血清及 BALF 中白介素(IL)-6、肿瘤坏死因子(TNF)- α 的含量。取右下肺部分肺组织以 Western blot 法检测蛋白提取物中 IL-6、TNF- α 及胞质中 NF- κ B p65 的蛋白表达情况。结果 光镜下观察正常组肺泡结构正常,盐水组肺泡间隔水肿,肺泡腔内可见大量的中性粒细胞浸润,而与盐水组相比,辛伐他汀组上述症状减轻且肺组织病理学评分降低($P < 0.05$)。盐水组、辛伐他汀组血清和 BALF 中 IL-6、TNF- α 的含量以及肺组织蛋白提取物中 IL-6、TNF- α 和 NF- κ B 的表达均较正常组明显升高($P < 0.05$)。而与盐水组相比,辛伐他汀组大鼠血清和 BALF 中 IL-6、TNF- α 的含量以及肺组织蛋白提取物中 IL-6、TNF- α 及 NF- κ B p65 的表达均降低($P < 0.05$)。结论 辛伐他汀通过抑制炎症介质的产生及炎症细胞的浸润,减轻吸入性肺损伤的炎症反应,对肺组织起到了一定的保护作用。

关键词 吸入性肺损伤;辛伐他汀;IL-6;TNF- α ;NF- κ B p65

中图分类号 R 965

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)09-1306-04
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.09.011

作为火焰烧伤的并发症之一,吸入性肺损伤组织基本病理变化包括肺水肿、肺泡萎缩、肺不张等,这些病理改变的存在使肺通气以及肺换气功能障碍,通气/血流比例失调,从而导致顽固性低氧血症,

严重时可发生呼吸功能衰竭。其临床表现多样,症状较轻者仅表现为刺激性咳嗽、胸闷不适,而严重者可出现顽固性低氧血症,甚至出现急性呼吸窘迫综合征或多器官功能障碍综合征。因此吸入性肺损伤成为烧伤患者死亡的重要原因之一。而辛伐他汀作为经典的 HMGCoA 还原酶抑制剂类药物,除具有降低胆固醇合成的作用外,其抗炎作用也得到了广泛认可。该实验通过使用辛伐他汀治疗早期烟雾吸入性肺损伤的大鼠模型,研究其抗炎特性以及其对于吸入性肺损伤的保护作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物 健康成年 SPF 级 SD 大鼠 18 只,雌雄不限,200 ~ 250 g,由河南省实验动物中心提供。

1.2 主要药物及试剂 辛伐他汀(浙江京新药业股份有限公司 40 mg/片);肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 试剂盒(深圳市达科为生物工程技术有限公司);大鼠白介素-6 (interleukin-6, IL-6) 试剂盒、Rabbit Anti-TNF- α 、Rabbit Anti-IL-6 (武汉博士德生物技术有限公司);NF- κ B Polyclonal Antibody (上海拜力生物科技有限公司);光学显微镜(日本 OLYMPUS 公司);微量加样器、酶标仪(上海巴玖公司)等。

1.3 实验分组及动物模型建立 将 18 只 SD 大鼠随机分为正常组、盐水组、辛伐他汀组,每组 6 只,将盐水组及辛伐他汀组大鼠置于带有发烟装置的密闭容器中,在 8 g 碎木屑产生的烟雾中暴露 6 min,并控制装置内的温度在 55 ~ 70 °C,从而制作烟雾吸入性肺损伤大鼠模型^[1]。动物模型建立后 30 min 及 12 h,使用大鼠灌胃器给予辛伐他汀组大鼠辛伐他汀溶液 50 mg/kg 灌胃^[2],而盐水组则以等量生理盐水灌胃,正常组大鼠正常饲养。致伤 24 h 后 3 组大鼠给予 10% 水合氯醛 350 mg/kg 腹腔注射麻醉。

1.4 留取肺组织 麻醉成功后打开胸腔,肉眼观察肺组织大体变化。后逐层分离组织,游离至气管分叉处,结扎大鼠右侧主支气管,切取右上肺组织浸入 4% 中性缓冲甲醛溶液中固定 24 h 后常规石蜡包

2017-05-12 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:U1604188);2015 年河南省重点科技攻关项目(编号:152102410065)

作者单位:¹ 郑州大学第一附属医院烧伤与修复重建外科,郑州 450002

² 中国人民解放军火箭军总医院礼士路门诊部,北京 100820

作者简介:杨荣强,男,硕士研究生;

崔正军,男,主任医师,教授,博士生导师,责任作者,E-mail:13937197452@163.com

埋,常规苏木精-伊红(HE)染色,光镜下观察肺组织病理改变,依照参考文献^[3]并根据肺组织内中性粒细胞的渗出、肺泡间隔的水肿、肺泡腔内出血以及肺泡腔内纤维蛋白的渗出,分为“无、轻、中、重”,分别记为“0、1、2、3”分,每张病理切片随机选取5个视野,取平均值,并采取单因素方差分析进行数据统计分析。

1.5 留取血清及肺泡灌洗液 经腹主动脉取全血2 ml,常温下静置1 h后,放入离心机内以1 000 r/min离心15 min,留取上层血清。使用5号采血针(去针头)置于左侧支气管内,5号丝线结扎后,10 ml注射器抽取5 ml生理盐水,反复抽洗5次后,留取肺泡灌洗液3 ml左右,放入离心机内以1 000 r/min离心10 min,留取上清液2 ml^[4]。采用ELISA法检测血清及肺泡灌洗液中的IL-6、TNF- α 的含量,具体步骤参照试剂盒说明书进行。

1.6 肺组织蛋白的测定 取右下肺组织-80℃保存,提取组织蛋白后采取Western blot法检测IL-6、TNF- α 及NF- κ B p65的表达情况,根据蛋白提取试剂盒的操作步骤分离胞质蛋白,SDS-PAGE电泳分离蛋白样品后电转移至PVDF膜上。经5%脱脂奶粉封闭后,4℃环境下分别与IL-6抗体(稀释度为1:200)、TNF- α (稀释度为1:300)、NF- κ B p65抗体(稀释度为1:500)、 β -actin抗体(稀释度为1:500)孵育过夜, β -actin作为胞质蛋白的内参,充分洗膜后,加入二抗(稀释度1:2 000)室温孵育1 h,曝光洗片,采用Image J软件分析条带以观察目的蛋白的表达情况。

1.7 统计学处理 采用SPSS 17.0统计软件进行单因素方差分析,实验数值以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用LSD-*t*法进行组间比较。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 病理学结果 大体观察肺组织:盐水组及辛伐

他汀组可见肺体积增大,明显充血,水肿,局部表面可见针尖样出血点。光镜下正常组肺组织肺泡腔结构完整,肺泡间隔均匀一致,腔内无渗出物,亦无白细胞浸润。盐水组肺组织局部可见出血,肺泡间隔水肿,并见大量的中性粒细胞浸润。肺泡腔内可见大量的炎细胞及红细胞渗出。而辛伐他汀组光镜下上述炎症反应明显减轻。根据病理学评分,对数据结果进行方差分析,与正常组相比,盐水组及辛伐他汀组病理学评分增高($P < 0.05$),与盐水组相比,辛伐他汀组病理学评分降低($P < 0.05$)。见图1。

2.2 各组大鼠血清及肺泡灌洗液中IL-6、TNF- α 的含量比较 与正常组相比,盐水组及辛伐他汀组血清及肺泡灌洗液中IL-6、TNF- α 的含量均升高。而与盐水组相比,辛伐他汀组血清及肺泡灌洗液中IL-6、TNF- α 的含量则明显下降($P < 0.05$)。见表1。

表1 ELISA法测定IL-6、TNF- α 的含量(pg/ml, $\bar{x} \pm s$)

组别	肺泡灌洗液		血清	
	IL-6	TNF- α	IL-6	TNF- α
正常组	25.16 \pm 6.36	60.65 \pm 4.68	37.97 \pm 13.78	105.20 \pm 11.17
盐水组	322.03 \pm 28.05*	127.32 \pm 8.91*	390.30 \pm 39.35*	194.50 \pm 10.13*
辛伐他汀组	267.55 \pm 18.74* #	107.07 \pm 6.67* #	279.41 \pm 34.41* #	166.29 \pm 4.44* #

与正常组比较:* $P < 0.05$;与盐水组比较:# $P < 0.05$

2.3 肺组织蛋白提取物中IL-6、TNF- α 及NF- κ B的表达情况 与正常组相比,盐水组及辛伐他汀组肺组织蛋白提取物中IL-6、TNF- α 及NF- κ B p65的表达均增加($P < 0.05$),盐水组肺组织蛋白提取物中IL-6、TNF- α 及NF- κ B p65的表达较辛伐他汀组增加($P < 0.05$)。见图2。

3 讨论

目前吸入性肺损伤发生的机制尚不十分不明确,有学者认为呼吸道热力损伤导致支气管上皮细

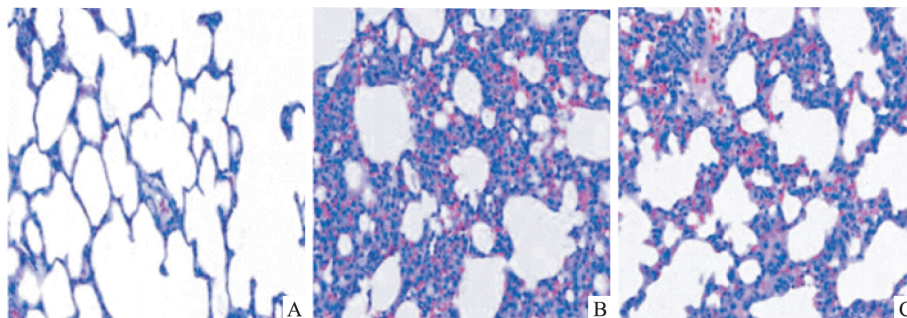


图1 大鼠肺组织病理学切片 HE染色 $\times 200$

A:正常组;B:盐水组;C:辛伐他汀组

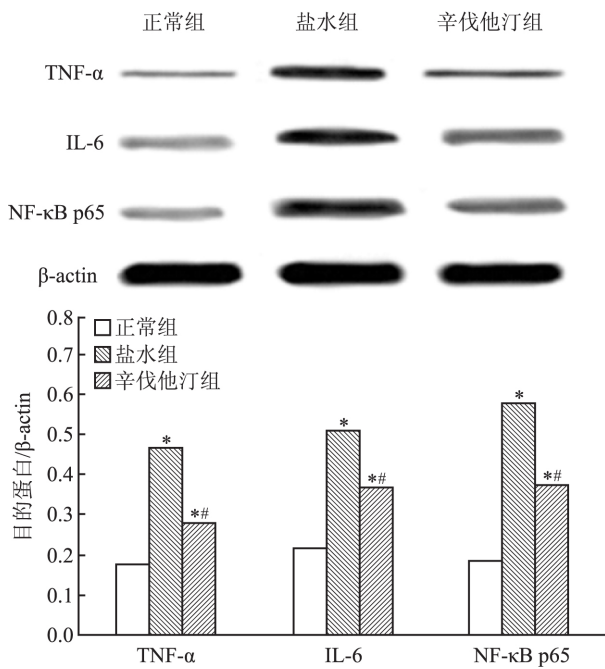


图2 Western-blot 法检测蛋白的表达情况
与正常组比较: * P < 0.05; 与盐水组比较: # P < 0.05

胞受损,局部炎症细胞浸润并释放炎性介质及细胞因子^[5]。此外也有部分研究者认为吸入的烟雾中含有多种化学物质包括 NO、CO、NO₂、SO₂ 等,这些物质导致局部气管痉挛,并对呼吸道产生化学性损伤^[6]。但大量研究^[7]表明炎症反应在吸入性肺损伤的发生及发展过程中起着重要作用,在吸入性肺损伤发生的早期,大量中性粒细胞聚集在肺组织内,产生大量的炎症介质,从而介导炎症反应的发生。

而作为机体内重要的炎症介质 IL-6、TNF-α 均参与机体内的炎症反应。其中 TNF-α 作为体内重要的促炎因子,在吸入性肺损伤的炎症发生中的作用尤为明显,不仅能诱导多形核中性粒细胞向炎症部位的聚集,同时还能促进 IL-1、IL-6 的分泌,从而导致炎症反应进一步加重^[8]。Stromps et al^[9] 通过动物实验证明合并吸入性肺损伤的烧伤动物模型中,在烧伤后的前 24 h 动物体内 IL-6、TNF-α 含量增加,并且与皮肤烧伤的深度存在一定的关联。NF-κB 作为基因转录的核因子几乎存在于所有的细胞内,并广泛参与机体的防御反应、免疫、炎症、应激及凋亡等。NF-κB 在炎症的信号转导中起重要作用,是介导 TNF-α、IL-1、IL-6、IL-8 等细胞因子信号转导的主要通路之一,同时也和肺部炎症细胞的激活密切相关。李志清等^[10]通过实验证明在烧伤动物模型中 NF-κB 的活化对于烧伤后的大鼠体内组织细胞因子 TNF-α、IL-8 mRNA 的合成及释放起到

了重要作用,此外也证明 NF-κB 通过启动细胞因子的释放诱导多形核中性粒细胞向肺组织聚集,导致肺内组织细胞损伤。

当前对于吸入性肺损伤仍缺乏有效的治疗措施,但随着基础研究的发展对于吸入性肺损伤发病机制的认识也逐渐深入,目前临床上常用包括糖皮质激素、抗生素、抗氧化剂、抗凝剂、NOS 抑制剂、维生素等并辅助物理治疗的综合疗法。其中糖皮质激素作为炎症反应的抑制药物广泛应用于吸入性肺损伤的治疗^[11]。作为经典的 HMGC0A 还原酶抑制剂,他汀类药物能显著改善冠心病患者的预后,降低不良事件的发生率,而大量的临床数据分析发现此结果的产生并不能单纯的用其调脂功能来解释,经过研究^[12]显示他汀类药物还具有明显的抗炎作用。而对于他汀类药物抗炎作用产生的机制,相关研究^[13]显示他汀类药物能降低外周血 CD14⁺ 单核细胞表面的 Toll 样受体 4 (TLR4) 的表达及其下游的信号传导通路。而 TLR4 作为最早在人体内发现的 Toll 样蛋白,当 TLR4 与其配体结合后可激活下游的核转录因子 NF-κB,合成多种炎症因子及细胞趋化因子参与炎症反应^[14]。而 Chello et al^[15]发现辛伐他汀可以通过降低 CRP、TNF-α、IL-6 和其他促炎因子来减轻体内的炎症反应。因此辛伐他汀作为抗炎药物对于吸入性损伤时发生的炎症反应具有一定的抑制作用。

本实验通过病理学检验及病理学评分证明辛伐他汀组与盐水组相比,中性粒细胞浸润及纤维渗出减少,肺泡间隔水肿减轻。并通过炎症因子的测定证明辛伐他汀组肺泡灌洗液及血清中 IL-6、TNF-α 较盐水组降低,且辛伐他汀组肺组织中 IL-6、TNF-α 及 NF-κB 与盐水组相比降低。说明辛伐他汀通过抑制烟雾吸入性肺损伤过程中产生的炎症因子而对肺组织产生一定的保护作用。

综上所述,目前辛伐他汀对于吸入性损伤的治疗作用已经得到多数研究者的认可,但对于其抗炎作用产生的机制尚不十分明确,抗炎作用与抗氧化作用是否平行,以及其治疗效果的产生是否具有剂量依赖关系,需要进一步的实验研究。

参考文献

[1] 谢尔凡,杨宗城,王 孰,等.大鼠烟雾吸入性损伤模型的制作[J].中国实验动物学杂志,1994,4(4):219-22.

[2] 程 冰,刘 群,张建明,等.辛伐他汀对烟雾吸入性损伤大鼠肺的保护作用[J].中华损伤与修复杂志(电子版),2012,7(1):44-8.

- [3] Koziar A, Schilling T, Freden F, et al. One-lung ventilation induces hyperperfusion and alveolar damage in the ventilated lung: an experimental study [J]. *Br J Anaesth* 2008, 100(4):549-59.
- [4] 刘文彬. 大鼠支气管肺泡灌洗方法的研究进展 [J]. *临床肺科杂志* 2012, 17(4):704-6.
- [5] 荣艳华, 刘维, 王成, 等. 吸入性损伤犬上呼吸道温度分布研究 [J]. *中华烧伤杂志* 2012, 28(4):320.
- [6] 刘涛, 任成山. 炎症介质在急性肺损伤/急性呼吸窘迫综合征发病机制中的作用 [J]. *中华肺部疾病杂志(电子版)* 2013, 6(3):60-3, 70.
- [7] 冯胜娟, 贾赤宇, 刘真, 等. 重度烟雾吸入性损伤发病机制及治疗研究进展 [J]. *中华烧伤杂志* 2016, 32(2):122-5.
- [8] Abali A E, Karakayali H, Ozdemir B H, et al. Destructive pulmonary effects of smoke inhalation and simultaneous alterations in circulating IL-6, TNF- α , and IFN- γ Levels at different burn depths: an experimental study on rats [J]. *J Burn Care Res* 2013, 34(3):334-41.
- [9] Stromps J P, Fuchs P, Demir E, et al. Intraalveolar TNF- α in combined burn and inhalation injury compared with intraalveolar interleukin-6 [J]. *J Burn Care Res* 2015, 36(2):e55-61.
- [10] 李志清, 黄跃生, 杨宗城, 等. 核因子- κ B 活化对大鼠烧伤早期肺组织表达促炎细胞因子的作用 [J]. *南方医科大学学报* 2007, 27(10):1496-7, 500.
- [11] 孙磊, 李代波, 曹佳. 急性烟雾吸入性肺损伤药物治疗的研究进展 [J]. *中华哮喘杂志(电子版)* 2011, 5(4):292-7.
- [12] 蔡佳, 贺娟, 徐贵丽, 等. 他汀类药物的临床应用研究进展 [J]. *中国医院用药评价与分析* 2015, 15(2):281-3.
- [13] Methe H, Kim J O, Kofler S, et al. Expansion of circulating Toll-like receptor 4-positive monocytes in patients with acute coronary syndrome [J]. *Circulation* 2005, 111(20):2654-61.
- [14] Dou W, Zhang J, Sun A, et al. Protective effect of naringenin against experimental colitis via suppression of Toll-like receptor 4/NF- κ B signaling [J]. *Br J Nutr* 2013, 110(4):599-608.
- [15] Chello M, Anselmi A, Spadaccio C, et al. Simvastatin increases neutrophil apoptosis and reduce inflammatory reaction after coronary surgery [J]. *Ann Thorac Surg* 2007, 83(4):1374-80.

Inhibitory effect of simvastatin on inflammatory response in rats with smoke-induced lung injury

Yang Rongqiang¹, Cui Zhengjun¹, Liu Jianhong², et al

(¹Dept of Burn and Repair Reconstruction Surgery, The First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450002; ²The Rockets Army General Hospital of PLA, Beijing 100820)

Abstract Objective To explore the protective effects of simvastatin on inhalation lung injury by the mean of restraining the inflammation reaction in rats. **Methods** 18 healthy standard SD rats were divided into 3 groups randomly, which were normal group, saline group, simvastatin group, with 6 rats in each group. Simvastatin solution (50 mg/kg) was given to the rats in simvastatin group via anorogastric route at 30 min and 12 h after the establishment of the model. Rats in saline group were given equal volume of normal saline and the rats in normal group were fed normally. The rats were given intra-peritoneal injection of anesthesia 24 h later. The pathological examination was performed on the right lung and the pathological changes of the lung were scored. The whole arterial blood was centrifuged to take the upper serum. The bronchoalveolar lavage fluid (BALF) was collected from the left lung and the levels of interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in serum and BALF were measured by ELISA. The expression of nuclear factor- κ B p65 (NF- κ B p65) in cytoplasm, IL-6 and TNF- α of protein extraction was detected by Western blot in the lung tissue of right lower lung. **Results** Under microscope observation shows, the alveolar structure of normal group was normal, the alveolar septal edema and the neutrophil infiltration in alveolar cavity in saline group were observed. Compared with saline group, the above symptoms were reduced and the pathological score of lung tissue was decreased in simvastatin group ($P < 0.05$). The levels of IL-6 and TNF- α both in BALF and serum of saline group and simvastatin group were significantly higher than those in normal group ($P < 0.05$). Compared with saline group, the levels of IL-6 and TNF- α in BALF and serum in simvastatin group were decreased ($P < 0.05$). Same results were emerged in the detection of IL-6, TNF- α and NF- κ B p65 in the extraction of the proteins of lung tissue. **Conclusion** Simvastatin plays a beneficial role in smoke inhalation injury by the mean of inhibiting the production of inflammatory mediators and the infiltration of inflammatory cells and restraining the inflammation reaction to some extent.

Key words inhalation lung injury; simvastatin; IL-6; TNF- α ; NF- κ B p65