

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2017.21.002

文章编号: 1005-8982(2017)21-0007-05

布地奈德联合辛伐他汀对慢性阻塞性肺疾病 大鼠炎症因子与肺组织病理的影响*

刘晓姝, 郭璐

(四川省医学科学院·四川省人民医院 呼吸内科, 四川 成都 610072)

摘要:目的 探讨布地奈德联合辛伐他汀对慢性阻塞性肺疾病(COPD)大鼠模型炎症因子与肺组织病理的影响,为药物干预方案提供实验依据。**方法** 根据不同的药物干预方案将 COPD 大鼠分为模型组(M组)、布地奈德组(BD组)、辛伐他汀组(SV组)及布地奈德联合辛伐他汀组(BD+SV组),比较不同组别 COPD 大鼠血清和支气管肺泡灌洗液(BLAF)中的白细胞介素 6(IL-6)、白细胞介素 8(IL-8)、白三烯 B4(LTB4)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)水平及肺组织病理的改变。**结果** 血清炎症因子水平:BD组 IL-6、TNF- α ,SV组 IL-6,(BD+SV)组 IL-6、IL-8 及 TNF- α 分别较 M 组降低(均 $P < 0.05$);(BD+SV)组 IL-8 水平较 SV 组下降($P < 0.05$)。BALF 炎症因子水平:BD组 IL-6、IL-8,SV组 IL-6、TNF- α , (BD+SV)组 IL-6、IL-8、LTB4 及 TNF- α 水平分别较 M 组降低(均 $P < 0.05$)。(BD+SV)组 BALF 中 IL-8、LTB4 及 TNF- α 水平较 BD 组降低,IL-8、LTB4 水平较 SV 组下降(均 $P < 0.05$)。BD组、SV组、(BD+SV)组肺组织病理半定量评分较 M 组降低(均 $P < 0.05$),病理均显示肺气肿囊腔变小、支气管炎症减轻。**结论** 使用布地奈德联合辛伐他汀可以有效降低 COPD 大鼠全身和气道炎症反应,改善肺组织病理。

关键词: 肺疾病;慢性阻塞性;炎症;布地奈德;辛伐他汀

中图分类号: R563.3

文献标识码: A

Synergistic effect of Budesonide and Simvastatin on cytokines and lung histological injury in rat models of COPD*

Xiao-Shu Liu, Lu Guo

(Department of Respiratory Medicine, Sichuan Provincial People's Hospital, Sichuan Academy of Medical Sciences, Chengdu, Sichuan 610072, China)

Abstract: Objective To investigate synergistic effect of Budesonide and Simvastatin on cytokines and pulmonary histological injury in rat models of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) so as to provide indications for novel pharmacological intervention. **Methods** Rats were randomly divided into model (M) group, Budesonide (BD) group, Simvastatin (SV) group and Budesonide combined with Simvastatin (BD+SV) group. Levels of interleukin 6 (IL-6), interleukin 8 (IL-8), leukotriene B4 (LTB4) and tumor necrosis factor alpha (TNF- α) in serum and bronchoalveolar lavage fluid (BALF) were measured. Histological injury was graded in rat lung slices. **Results** Inflammatory cytokines in serum: compared with the M group, levels of IL-6 and TNF- α in the BD group, IL-6 in the SV group, and IL-6, IL-8 and TNF- α in the BD+SV group were decreased ($P < 0.05$). The level of IL-8 was attenuated in the BD+SV group compared with those in the SV group ($P < 0.05$). Inflammatory cytokines in BALF: the levels of IL-6 and IL-8 in the BD group, IL-6 and TNF- α in the SV group, and IL-6, IL-8, LTB4 and TNF- α in the BD+SV group were reduced compared with those in the M group ($P < 0.05$). Levels of IL-8, LTB4 and TNF- α in the BD+SV group were decreased in comparison with those in the BD group. Levels of IL-8 and LTB4 could be diminished by BD+SV

收稿日期:2017-03-20

* 基金项目:四川省科技厅基础研究计划项目(No:2013JY0177)

[通信作者] 郭璐.E-mail:18981838226@163.com; Tel:18981838226

treatment when compared with the SV group ($P < 0.05$). Semi-quantitative scores of pathological changes of lung tissues in the BD group, the SV group and the BD+SV group were lower than those in the M group ($P < 0.05$), the lung tissues showed reduced cyst cavities and alleviated bronchitis. **Conclusions** Budesonide combined with Simvastatin could synergistically relieve systematic and airway inflammation, and attenuate histological injury in the lungs of COPD rat models.

Keywords: chronic obstructive pulmonary disease; inflammation; Budesonide; Simvastatin

慢性阻塞性肺疾病 (chronic obstructive pulmonary diseases, COPD) 是一种以气道和全身炎症为特征的疾病^[1], 死亡率高且不断增长, 预计到 2020 年将成为世界第 3 大死因, 因此需积极干预, 以控制症状、减少急性加重和降低死亡率。在 COPD 稳定期的治疗中, 吸入性糖皮质激素 (inhaled corticosteroid, ICS) 能减少气道和全身炎症, 减少 COPD 急性加重次数^[2]。他汀类药物在关于 COPD 的观察性研究中, 与减慢肺功能下降、降低 COPD 急性加重发生率、死亡率有关^[3-4]; 亦有报道他汀可增加 ICS 的局部抗炎作用^[5], 两者联合可改善 COPD 临床症状^[6-7], 但证据较少。本研究使用布地奈德联合辛伐他汀干预 COPD 大鼠模型, 观察其血清和支气管肺泡灌洗液 (bronchoalveolar lavage fluid, BALF) 中炎症因子表达量和肺组织病理的改变, 探讨 ICS 联合他汀对 COPD 大鼠炎症的影响及是否存在协同作用和联合应用的可能。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

Wistar 大鼠, 180 ~ 200 g, 全为雄性, 无特定病原体级 (specific pathogen free, SPF) (购自北京维通利华实验动物技术有限公司), 脂多糖 (LPS) (购自 SIGMA 公司, 批号 L2880-10, 10 mg/支), 娇子 (时代阳光) 牌香烟 (购自四川省成都川渝中烟工业公司, 焦油量: 12 mg), 辛伐他汀片 (购自美国默沙东制药有限公司), 吸入用布地奈德混悬液 (购自英国阿斯利康制药有限公司)。

1.2 仪器与设备

自制有机玻璃烟熏箱 80 cm × 60 cm × 50 cm, Hamilton 微量进样器, 鱼跃超声雾化器 402AI (江苏鱼跃医疗设备股份有限公司); Riester LED 光纤检耳镜 (中国 Aglaia healthcare 公司), 生物显微镜 (麦克奥迪实业集团有限公司), Bio-Road 公司酶标仪 (上海科华实验系统有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 模型复制

45 只 SPF 级大鼠, 适应性饲养 10 d

后随机分为模型组 (M 组)、布地奈德组 (BD 组)、辛伐他汀组 (SV 组) 及布地奈德联合辛伐他汀组 (BD+SV) 组 4 组, 每组 15 只。M 组处理方案参照文献^[8], 烟熏时间共计 60 d; BD 组、SV 组、(BD+SV) 组烟熏、滴注 LPS 同 M 组。BD 组: 试验第 15 天开始雾化吸入布地奈德气雾剂 0.5 mg, 每次 15 min, 2 次/d; SV 组: 试验第 15 天开始, 每日烟熏前, 给予辛伐他汀 (5 mg/kg) 灌胃, 1 次/d; (BD+SV) 组: 试验第 15 天开始加用辛伐他汀 (5 mg/kg), 1 次/d 灌胃治疗, 雾化吸入布地奈德气雾剂 0.5 mg, 15 min/次, 2 次/d。饲养过程中观察行为学变化淘汰异常大鼠。

1.3.2 血清检测 实验第 60 天, 称重所有大鼠, 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉后将大鼠仰卧固定于操作台, 分离腹主动脉, 抽取动脉血 5 ml, 离心分离血清, Elisa 法测定血清白细胞介素 6 (interleukin, IL-6)、白细胞介素 8 (interleukin, IL-8)、白三烯 B4 (Leukotriene B4, LTB4) 和肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α) 含量。

1.3.3 BALF 检测 切开暴露胸部, 结扎右主支气管, 于隆突上用套管针刺至左肺, 以 2 ml 生理盐水灌注, 缓慢回抽, 每次回收约 1.5 ml, 反复灌注 3 次, 回收率要求达到 75%, 混匀灌洗液, 离心后取上清液 Elisa 法测 IL-6、IL-8、LTB4 及 TNF- α 浓度。

1.3.4 肺组织观察 取新鲜右肺下叶组织, 经 10% 中性福尔马林固定 48 h, 梯度酒精脱水, 二甲苯透明, 石蜡包埋, 连续 4 μ m 切片 4 张, HE 染色, 光镜下观察右肺下叶病理改变并进行半定量分析。

1.4 统计学方法

数据分析采用 SPSS 22.0 统计软件, 计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 应用单因素方差分析, 若方差齐则两两比较用 LSD- t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠血清炎症因子水平比较

各组大鼠血清炎症因子中 LTB4 水平差异无统计学意义 ($F = 1.185, P = 0.329$), IL6、IL-8 及 TNF- α

水平差异有统计学意义($F=6.826, 7.212$ 及 $5.329, P=0.001, 0.001$ 及 0.004)。与 M 组比较, BD 组血清炎症因子 IL-6、TNF- α 水平降低, SV 组 IL-6 降低, BD+SV 组 IL-6、IL-8 及 TNF- α 水平降低(均 $P<0.05$), 差异有统计学意义; 与 BD 组比较, BD+SV 组血清炎症因子 IL-6、IL-8、LTB4 及 TNF- α 水平差异无统计学意义($P>0.05$); 与 SV 组比较, BD+SV 组血清炎症因子 IL-8 水平降低($P<0.05$), 差异有统计学意义。见表 1。

2.2 各组大鼠 BALF 中炎症因子水平比较

各组大鼠 BALF 炎症因子水平中, IL-6、IL-8、LTB4 及 TNF- α 水平差异有统计学意义($F=4.249, 13.437, 7.693$ 及 $8.436, P=0.011, 0.000, 0.000$ 及 0.001)。与 M 组比较, BALF 中炎症因子 BD 组 IL-6、IL-8 水平减低, SV 组 IL-6、TNF- α 水平降低, BD+SV 组 IL-6、IL-8、LTB4 及 TNF- α 水平降低(均 $P<0.05$), 差异有统计学意义。与 BD 组比较, BD+SV 组 IL-8、LTB4、TNF- α 降低(均 $P<0.05$), 差异有统计学意义。与 SV 组比较, BD+SV 组 BALF 中 IL-8、LTB4 水平降低(均 $P<0.05$), 差异有统计学意义。见表 2。

2.3 肺组织光镜观察

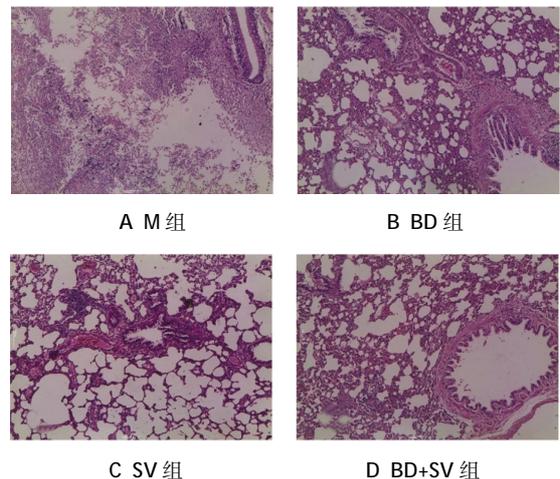
2.3.1 各组大鼠肺组织病理

M 组大鼠肺组织可见支气管纤毛柱状上皮细胞部分剥脱, 纤毛粘连倒伏, 杯状细胞增生, 黏膜下层炎性细胞浸润, 支气管平滑

肌增厚, 管腔内充满中性粒细胞、肺泡巨噬细胞及粘液分泌物, 终末细支气管远端狭窄, 呼吸细支气管及肺泡管囊状扩张, 有肺气肿和肺大疱形成。BD 组、SV 组、BD+SV 组大鼠肺组织上皮结构完整, 可见部分支气管纤毛, 肺泡结构完整, 部分肺泡壁变薄, 肺泡腔扩大, 但较 M 组肺气肿囊腔可见变小、各级支气管炎症可见减轻。见附图。

2.3.2 各组大鼠肺组织病理半定量评分比较

各组大鼠肺组织病理半定量评分差异有统计学意义($F=4.382, P=0.010$)。与 M 组比较, BD 组、SV 组及 BD+SV 组肺组织病理半定量评分降低, 差异有统计学意义(均 $P<0.05$); BD 组、SV 组及 BD+SV 组 3 组间两两比较肺组织病理半定量评分差异无统计学意义。见表 3。



附图 不同组别大鼠肺组织病理比较 (HE × 100)

表 1 不同组别 COPD 大鼠血清炎症因子水平比较 (ng/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	例数	IL-6	IL-8	LTB4	TNF- α
M 组	9	3.8 ± 0.2	167.6 ± 13.0	358.5 ± 23.9	129.4 ± 8.7
BD 组	10	3.4 ± 0.4	164.0 ± 6.5	379.3 ± 29.3	120.4 ± 4.8
SV 组	10	3.4 ± 0.3	175.0 ± 11.5	376.6 ± 25.5	122.3 ± 4.4
BD+SV 组	11	3.2 ± 0.3	154.1 ± 10.0	357.0 ± 10.7	118.5 ± 6.7
F 值		6.826	7.212	1.185	5.329
P 值		0.001	0.001	0.329	0.004

表 2 不同组别 COPD 大鼠 BALF 中炎症因子水平比较 (ng/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	例数	IL-6	IL-8	LTB4	TNF- α
M 组	9	10.7 ± 1.7	97.1 ± 8.4	196.3 ± 17.6	46.0 ± 3.5
BD 组	10	9.1 ± 0.8	88.8 ± 5.1	192.6 ± 12.1	43.0 ± 3.2
SV 组	10	9.0 ± 0.4	92.0 ± 4.6	182.7 ± 12.1	41.7 ± 3.8
BD+SV 组	11	9.1 ± 1.2	81.1 ± 5.0	172.1 ± 13.8	38.1 ± 2.8
F 值		4.249	13.437	7.693	8.436
P 值		0.011	0.000	0.000	0.001

表 3 不同组别大鼠肺组织病理半定量评分比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	肺组织病理半定量评分
M 组	9	2.0 ± 0.7
BD 组	10	1.2 ± 0.4
SV 组	10	1.4 ± 0.5
BD+SV 组	11	1.2 ± 0.4
F 值		4.382
P 值		0.01

3 讨论

感染、氧化应激和蛋白酶 / 抗蛋白酶的失衡等因素引起 IL-6、IL-8、LTB4 及 TNF- α 等多种炎症介质的释放, 刺激中性粒细胞和巨噬细胞等炎症细胞活化、聚集, 造成 COPD 患者气道、肺实质和血管持续炎症状态, 导致 COPD 急性加重的发展和肺功能降低。因

此,下调 COPD 炎症反应在 COPD 的治疗中是一项重要环节。COPD 的药物干预措施中,布地奈德具有抗炎抗过敏作用,通过阻断花生四烯酸代谢和减少白三烯与前列腺合成解除支气管平滑肌痉挛,减缓呼吸道症状的进展^[9-10];辛伐他汀为羟甲基戊二酰辅酶 A 还原酶抑制剂,降脂保护血管功效外还具有抗炎和调节免疫的作用,近年来较多证据支持其能降低 COPD 急性加重次数和死亡率^[11-13]。布地奈德联合辛伐他汀能否对 COPD 炎症反应起到协同干预作用,目前尚无相关探讨。

在参与 COPD 的炎性介质中,IL-6 是具有多种生物功能的炎症细胞因子,其参与气道炎症的发生、发展过程^[14],导致 COPD 患者气道粘液高分泌和气道重塑;IL-8 是主要的炎症细胞趋化因子,亦可引起炎症细胞的活化和氧自由基的释放,损伤肺泡上皮细胞和微血管,其水平高低与 COPD 的临床结局呈正相关性^[15];LTB4 是选择性中性粒细胞趋化剂,可导致支气管壁黏膜炎症细胞浸润增多而进一步扩大局部炎症反应^[16];TNF- α 是炎症进程、免疫应答以及宿主防御系统的关键介质,并参与肺气肿的形成和上皮细胞损伤^[17]。研究结果显示,相比 BD 组或 SV 组仅存在少数或个别血清炎症因子水平的降低,BD+SV 组血清中 IL-6、IL-8 和 TNF- α 水平均出现降低,尤其观察到 IL-8 下降的水平较 SV 组更低,说明布地奈德联合辛伐他汀能有效抑制 COPD 大鼠由 IL-6、IL-8 及 TNF- α 介导的全身炎症反应,且对 COPD 发病机制起关键作用的 IL-8 下调幅度较使用辛伐他汀组更大,分析布地奈德联合辛伐他汀不仅发挥各自抗炎、抗氧化作用外还有协同效应。已有研究显示,辛伐他汀通过增加 IL-10 的表达增强 ICS 的抗炎效应^[6],并能减少 ICS 使用后的急诊事件^[18];而 ICS 亦可增加 COPD 患者使用他汀类药物的益处,两者联合有利于改善 COPD 患者预后。

布地奈德联合辛伐他汀在下调气道局部炎症水平方面更具优势,BD+SV 组大鼠出现 BALF 中,IL-6、IL-8、LTB4 及 TNF- α 的水平全面降低,其中,IL-8、LTB4 及 TNF- α 水平较 BD 组,IL-8、LTB4 水平较 SV 组下降,提示布地奈德联合辛伐他汀较两药分别单用在下调气道局部炎症方面更突出、效应更广泛,进一步证实两种药物抗炎、抗氧化和免疫调节作用外还有协同效应。病理观察到 BD 组、SV 组、BD+SV 组肺气肿囊腔变小、支气管炎症减轻,肺组织病理半定量评分降低,说明 3 种治疗方案干预 COPD 大鼠后肺

组织炎症均得到一定程度的改善,但 3 组间肺组织病理半定量评分无差异,分析与病理改变滞后于炎症反应以及实验观察周期较短有关。

综上所述,布地奈德联合辛伐他汀既可降低 COPD 大鼠全身炎症反应水平,又可广泛的下调 COPD 大鼠气道局部炎症,两药联合具有协同抗炎作用,进而推测 ICS 联合他汀可从抑制炎症介质角度使 COPD 患者受益,可考虑作为 COPD 患者稳定期的干预措施。该研究不足之处,观察周期短,未能观察到病死率、肺功能的改善,需要大规模、多中心、随机双盲的临床实验以进一步证实。

参 考 文 献:

- [1] SIN D D, PAUL MAN S F. Cooling the fire within: inhaled corticosteroids and cardiovascular mortality in COPD[J]. *Chest*, 2006, 130(3): 629-631.
- [2] MAGNUSSEN H, DISSE B, RODRIGUEZ-ROISIN R, et al. Withdrawal of inhaled glucocorticoids and exacerbations of COPD[J]. *N Engl J Med*, 2014, 371(14): 1285-1294.
- [3] JANDA S, PARK K, FITZGERALD J M, et al. Statins in COPD: a systematic review[J]. *Chest*, 2009, 136(3): 734-743.
- [4] WANG M T, LO Y W, TSAI C L, et al. Statin use and risk of COPD exacerbation requiring hospitalization[J]. *Am J Med*, 2013, 126(7): 598-606.
- [5] MANEECHOTESUWAN K, EKJIRATRAKUL W, KASETSIN-SOMBAT K, et al. Statins enhance the anti-inflammatory effects of inhaled corticosteroids in asthmatic patients through increased induction of indoleamine 2, 3-dioxygenase[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2010, 126(4): 754-762.
- [6] 付晓丽, 张会凯, 赵红军. 信必可都保联合阿托伐他汀钙对慢性阻塞性肺疾病急性加重期患者炎症因子、肺功能的影响[J]. *河南科技大学学报(医学版)*, 2015, 33(2): 93-96.
- [7] 谢伟武, 陈崔. 辛伐他汀与布地奈德对慢性阻塞性肺病患者血细胞因子与肺功能的影响研究[J]. *医学理论与实践*, 2014, 27(12): 1543-1558.
- [8] 刘君波, 黄梦珊, 余晨曦, 等. 气管内反复滴入脂多糖法建立大鼠慢性阻塞性肺疾病模型[J]. *中国实验动物学报*, 2011, 19(2): 129-133.
- [9] AGARWAL R, AGGARWAL A N, GUPTA D, et al. Inhaled corticosteroids vs placebo for preventing COPD exacerbations: a systematic review and metaregression of randomized controlled trials[J]. *Chest*, 2010, 137(2): 318-325.
- [10] CELLI B R, THOMAS N E, ANDERSON J A, et al. Effect of pharmacotherapy on rate of decline of lung function in chronic obstructive pulmonary disease: results from the TORCH study[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2008, 178(4): 332-338.
- [11] ALEXEEFF S E, LITONJUA A A, SPARROW D, et al. Statin use reduces decline in lung function: VA normative aging study[J].

- Am J Respir Crit Care Med, 2007, 176 (8): 742-747.
- [12] INGEBRIGTSEN T S, MAROTT J L, NORDESTGAARD B G, et al. Statin use and exacerbations in individuals with chronic obstructive pulmonary disease[J]. Thorax, 2015, 70(1): 33-40.
- [13] LAWES C M, THORNLEY S, YOUNG R, et al. Statin use in COPD patients is associated with a reduction in mortality: a national cohort study[J]. Prim Care Respir J, 2012, 21(1): 35-40.
- [14] 陈宁,徐燕,董晓岑,等.慢性阻塞性肺病大鼠外周血中 Foxp3+ 调节性 T 细胞及 IL-17、IL-6 水平的变化 [J]. 中国现代医学杂志, 2014, 24(27): 24-28.
- [15] CELIK H, AKPINAR S, KARABULUT H, et al. Evaluation of IL-8 nasal lavage levels and the effects of nasal involvement on disease severity in patients with stable chronic obstructive pulmonary disease[J]. Inflammation, 2015, 38(2): 616-622.
- [16] PEPPELMAN M, WOLBERINK E A, GERRITSEN M J, et al. Application of leukotriene B4 and reflectance confocal microscopy as a noninvasive in vivo model to study the dynamics of skin inflammation[J]. Skin Res Technol, 2015, 21(2): 232-240.
- [17] LEPPKES M, ROULIS M, NEURATH M F, et al. Pleiotropic functions of TNF- α in the regulation of the intestinal epithelial response to inflammation[J]. Int Immunol, 2014, 26(9): 509-515.
- [18] TSE S M, CHARLAND S L, STANEK E, et al. Statin use in asthmatics on inhaled corticosteroids is associated with decreased risk of emergency department visits[J]. Curr Med Res Opin, 2014, 30(4): 685-693.