

# 普伐他汀对烟熏大鼠肺部急性炎症抑制作用的初步研究

张 燕 陈雨虹 梅晓冬

**摘要** 目的 探讨雾化吸入普伐他汀对烟熏大鼠肺部急性炎症的影响。方法 32只6~8周龄的SD大鼠,随机分为正常对照组、烟熏组、生理盐水组和普伐他汀组。正常对照组大鼠不予特殊处理,其它3组予以香烟烟雾暴露1周,生理盐水组、普伐他汀组分别在烟熏同时雾化吸入生理盐水或普伐他汀。1周后处死大鼠,比较各组大鼠的体重、肺泡灌洗液细胞数、血浆白介素(IL)-10、IL-17浓度及IL-10/IL-17的比值,以及肺组织中炎症的变化。结果 接受烟熏处理的大鼠体重增加均有所减少,各组之间差异无统计学意义,烟熏组大鼠肺内有明显的急性炎症改变,肺泡灌洗液中炎症细胞数量及血浆中IL-10浓度明显增高,与正常对照组相比,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。雾化吸入普伐他汀组大鼠肺内炎症病理变化明显减轻,IL-10浓度增高较弱,IL-10/IL-17比值接近1。结论 雾化吸入普伐他汀对烟熏导致的大鼠急性肺部炎症有一定的抑制作用。

**关键词** 普伐他汀;吸烟;急性炎症;雾化吸入

中图分类号 R 163.1

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)06-0802-04  
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.06.005

慢性阻塞性肺疾病是一种肺部对有害颗粒特别是香烟烟雾暴露引起的异常炎症反应,以持续气流受限为特征的慢性炎症性疾病。目前主要治疗药物为长效 $\beta$ 受体激动剂联合糖皮质激素吸入治疗,能够降低慢性阻塞性肺疾病患者肺功能降低的速度,减少急性加重的频度,但不能有效控制慢性阻塞性肺疾病的炎症,控制逆转患者肺功能损害。近年来有研究<sup>[1]</sup>显示,临床上应用广泛的他汀类降脂药物对肺部炎症有抑制作用。研究<sup>[2]</sup>报道,有关临床试验中口服他汀类药物用于慢性阻塞性肺疾病患者并没有获得期望中的疗效<sup>[3]</sup>。该研究推测由于他汀类药物具有明显的与剂量相关的不良反应,以及常规剂量并通过口服给药,肺部药物浓度可能不能达

到期望的抑制炎症水平,导致临床研究的失败,而增高剂量会增加相关风险。雾化吸入给药方法能在支气管局部形成较高的药物浓度,同时所需用药剂量小,对全身影响小,副作用也相对较少。近年来在呼吸道疾病的使用中,雾化吸入糖皮质激素取代口服或静脉给药已经成为共识<sup>[4]</sup>。该研究拟采用雾化吸入给药方法,观察他汀类药物对抑制肺部炎症的作用,探讨改变给药途径是否可能克服目前他汀类药物治疗慢性阻塞性肺疾病的困境。

## 1 材料与方法

**1.1 试验动物** 清洁级雄性SD大鼠32只,6~8周龄,180~200g,购自上海斯莱克实验动物有限责任公司,动物饲养于安徽省立医院动物实验室。本研究经安徽医科大学附属省立医院伦理委员会批准(批准号:20130042)。

**1.2 主要试剂与仪器** 红三环牌香烟(安徽中烟工业公司,焦油量15mg/支,烟气烟碱量1.2mg/支,烟气一氧化碳15mg/支);白介素(interleukin, IL)-10、IL-17 ELISA试剂盒(上海源叶生物科技有限公司)。

**1.3 动物模型建立** 32只大鼠按照随机数字表法分为正常对照组、烟熏组、生理盐水组、普伐他汀组,每组各8只。适应性喂养1周后,正常对照组继续常规饲养,其余3组参照参考文献<sup>[5]</sup>放置于雾化箱内,予以香烟烟雾暴露7d,每天2次,每次烟熏30min。生理盐水组烟熏前30min雾化生理盐水,普伐他汀组雾化吸入普伐他汀生理盐水5mg/ml溶液。处理1周后处死。

**1.4 样本制备** 于烟熏及雾化后分别处死大鼠,使用10%的水合氯醛麻醉,5mg/kg腹主动脉取血后处死,取左肺灌洗,右肺结扎做病理标本。全血标本离心10min,取血清于-80℃保存。

**1.5 肺组织病理标本制备及形态定量分析** 右肺叶注入10%中性甲醛0.2ml内固定后,石蜡包埋切片后HE染色。参考文献<sup>[6]</sup>测量大鼠气管及血管旁中性粒细胞浸润,气道黏膜水肿以及肺组织损伤积分。肺组织损伤评分基于以下因素:出血、肺间质

2017-02-05 接收

基金项目:安徽省自然科学基金(编号:1308085MH115)

作者单位:安徽医科大学附属省立医院呼吸内科,合肥 230001

作者简介:张 燕,女,硕士研究生;

梅晓冬,男,教授,主任医师,硕士生导师,责任作者,

E-mail: hfmxd@sina.com

水肿、坏死、中性粒细胞浸润、肺不张；损伤的严重程度判断有以下标准：无损伤 = 0 分，25% 损伤 = 1 分，50% 损伤 = 2 分，75% 损伤 = 3 分，弥漫性损伤 = 4 分。由病理科医师进行盲法阅片，分别计算每个变量，分数汇总，复合评分。

**1.6 检测 IL-10 和 IL-17 浓度及大鼠肺泡灌洗液细胞数** 按照 ELISA 试剂盒说明书测定血清 IL-10、IL-17 水平。在显微镜下计数肺泡灌洗液细胞数。

**1.7 统计学处理** 采用 Graphpad 作图软件进行分析，正态分布计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示；多组间比较采用单因素方差分析，组内两两比较 SNK 法，相关性分析采用 Pearson 相关性分析。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 大鼠烟熏前后体重变化情况** 正常对照组大鼠皮毛光亮，反应敏捷，食量正常，其余 3 组大鼠烟熏暴露 1 周时皮毛灰暗发黄，反应较差，食量减少。正常对照组大鼠体重增长迅速，其余 3 组体重增长缓慢，与正常对照组相比，体重变化差异均有统计学意义 ( $F = 14.42, P < 0.05$ )。其余 3 组之间体重变化差异均无统计学意义，见图 1A。

**2.2 大鼠烟熏前后肺泡灌洗液细胞数变化情况** 4

组大鼠肺泡灌洗液中细胞计数显示，烟熏组细胞数最多，生理盐水组及普伐他汀组细胞数其次，正常对照组最少。正常对照组与烟熏组、生理盐水组比较，差异均有统计学意义 ( $F = 18.78, P < 0.05$ )，普伐他汀组与烟熏组、生理盐水组比较，差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。其余各组比较差异无统计学意义。见图 1B。

**2.3 大鼠血清 IL-10 浓度的变化** 与正常对照组相比，烟熏组显著增高，生理盐水组与普伐他汀组均有所降低。方差齐性分析显示其差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )，除正常对照组与普伐他汀组，烟熏组与生理盐水组比较差异无统计学意义，其余各组比较差异均有统计学意义 ( $F = 23.95, P < 0.05$ )。见图 1C。

**2.4 大鼠血清中 IL-17 浓度测定** 4 组大鼠血清中 IL-17 浓度比较，各组大鼠 IL-17 水平方差齐性比较，差异无统计学意义。

**2.5 大鼠血清 IL-10/IL-17 浓度比值** 比较 4 组大鼠血清 IL-10/IL-17 浓度比值，4 组方差齐性 ( $F = 8.29, P < 0.05$ )。正常对照组与烟熏组、生理盐水组比较，差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。普伐他汀组与烟熏组、生理盐水组比较，差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见图 1D。

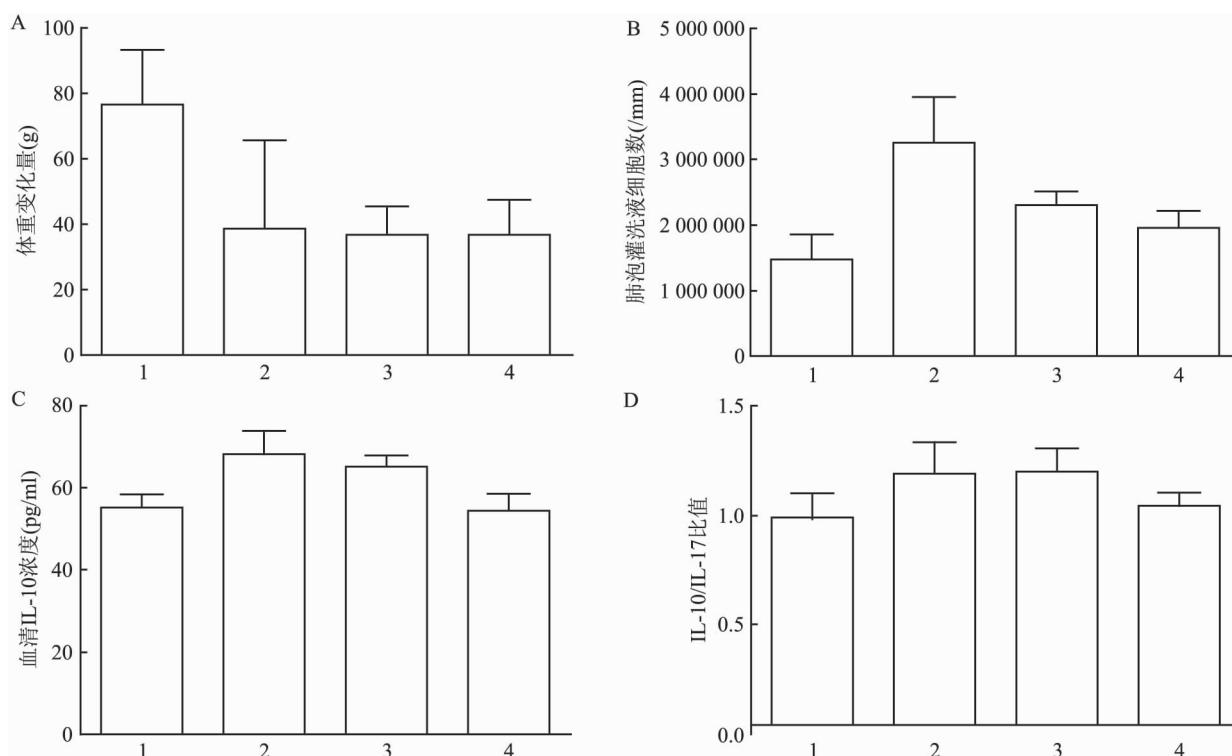


图 1 各组大鼠体重、肺泡灌洗液中细胞浓度、IL-10 及 IL-10/IL-17 比值

A: 各组大鼠体重变化; B: 各组大鼠肺泡灌洗液细胞计数; C: 各组大鼠血清 IL-10 变化; D: 各组大鼠血清 IL-10/IL-17 比值变化; 1: 正常对照组; 2: 烟熏组; 3: 生理盐水组; 4: 普伐他汀组

2.6 4组大鼠肺组织病理变化 烟雾暴露后,与正常对照组(图2A)大鼠相比较,烟熏组(图2B)大鼠支气管纤毛部分倒伏断裂,大气道及血管壁浸润大量中性粒细胞,小肺泡周边少量中性粒细胞浸润,肺间质有少量水肿,气管黏膜肿胀,血管腔内有大量血细胞渗出。与烟熏组比较,生理盐水组(图2C)气道及血管周围炎性渗出,气道水肿无明显减轻。普伐他汀组炎性改变较烟熏组及生理盐水组明显减轻(图2D)。见表1。

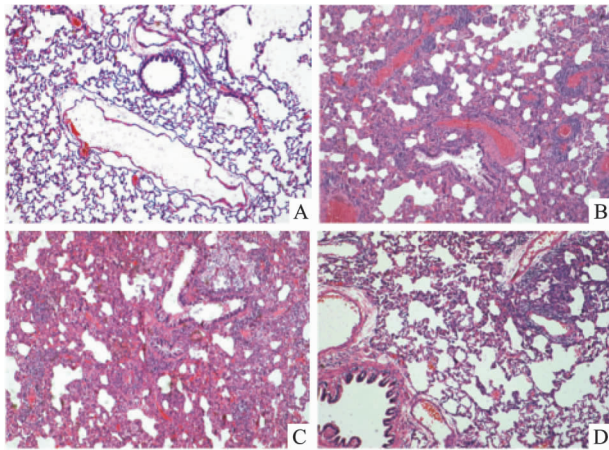


图2 各组大鼠肺部病理变化 HE×400  
A:正常对照组;B:烟熏组;C:生理盐水组;D:普伐他汀组

表1 大鼠肺部炎症病理变化评分( $\bar{x} \pm s$  n=8)

组别	气道中性粒细胞 浸润程度分级	气道黏膜水肿 程度分级	肺组织 损伤评分
正常对照	0.51 ± 0.22	0.43 ± 0.27	4.64 ± 0.72
烟熏	3.63 ± 0.41* #	3.45 ± 0.62*	16.71 ± 2.61* #
生理盐水	3.02 ± 0.48* #	3.77 ± 0.84*	15.49 ± 1.13* #
普伐他汀	2.07 ± 0.36*	2.21 ± 0.49*	9.12 ± 0.97*

与正常对照组比较: \* P < 0.05; 与普伐他汀组比较: # P < 0.05

### 3 讨论

他汀类药物由于具有降脂以外的药理效应,已经从单一的降脂药发展为一类重要的抗动脉粥样硬化药,而广泛用于动脉粥样硬化性心血管疾病。由此也带来了其单效性与多效性的讨论。而他汀类药物对慢性阻塞性肺疾病是否有治疗效果,也尚有争议<sup>[6]</sup>。此外,长期大剂量口服他汀类药物还可能存在着横纹肌溶解综合征、肝损伤、血糖异常等潜在风险<sup>[7]</sup>。

雾化吸入给药通过雾化方法将药物直接送达肺部,药物在肺部的浓度显著增高,在达到所需要的局部药物浓度同时,减少了药物的使用量,减少不良反应的发生。他汀类药物存在水溶性与脂溶性的利弊

之争,普伐他汀是一种亲水性较强的他汀类药物。药理学提示,通过雾化给药,亲水性更强的普伐他汀有更高的吸收性,也减少了因药物沉积所致的脂质肺炎的发生。而药物作用的靶点是否为肝脏,还是在肺组织相关细胞中直接代谢发挥作用尚需深入研究。

慢性阻塞性肺疾病的发生是一个长期的慢性病变过程,现代医学推测,慢性阻塞性肺疾病并不是仅仅局限于肺组织局部炎症性疾病,同时,慢性阻塞性肺疾病还伴随着体内免疫改变,存在免疫异常<sup>[8]</sup>。有关慢性阻塞性肺疾病患者体内 Th1/Th2 细胞平衡研究较多,但 Th17 与 Treg 细胞之间的免疫调节作用研究较少。Th17 参与炎症反应,能促进炎症损伤和慢性化变化。而 Treg 细胞具有诱导机体免疫耐受,减轻炎症反应的作用。本研究观察了 IL-10 与 IL-17 两种免疫分子。IL-10 是一种主要由 Th2 细胞分泌产生的具有双向调节作用的细胞因子,可以抑制前炎症因子产生,可促进 B 细胞分化增殖,减少肺组织局部中性粒细胞的浸润与活化,降低中性粒细胞对血管内皮与肺泡上皮细胞的黏附,从而减轻损伤。IL-10 还能抑制 Th1 型细胞因子,抑制 Th1 型细胞应答,降低患者的免疫反应,促进 Treg 细胞的增殖分化,诱导机体的免疫耐受,导致炎症的持续存在<sup>[9]</sup>。在烟熏实验动物中气道内可有明显的 IL-10 增高<sup>[10]</sup>。本研究中烟熏组大鼠血 IL-10 水平显著增高,吸入普伐他汀组大鼠血 IL-10 浓度明显降低,提示普伐他汀雾化吸入能够降低烟熏导致的大鼠肺部炎症因子水平,可能具有抑制烟熏导致的肺部急性炎症的作用。

IL-17 由 IL-23 诱导 Th17 产生,是一种重要的炎症因子,与慢性炎症密切相关。其能够诱导效应细胞 DC 细胞、上皮细胞等合成分泌 IL-6、IL-8 等炎症因子,通过促进释放前炎症因子来扩大炎症反应<sup>[11]</sup>,导致肺部出现持续的慢性炎症和损伤。而 IL-17 有 IL-17A 及 IL-17F,其中效应最强为 IL-17A,通过激活 NF-κB、MAPK 诱导下游基因<sup>[12]</sup>,但 IL-17A 只能微弱地激活 NF-κB 信号通路,影响炎症反应,但具体的分子机制尚待研究<sup>[13]</sup>。本研究中大鼠烟熏处理后血清中 IL-17 浓度变化不明显,使用生理盐水或普伐他汀吸入后亦无明显变化。本研究推测可能是与本研究动物模型有关,本研究采用的是香烟烟雾烟熏 1 周的急性炎症模型,而非慢性肺部炎症模型,因此,与慢性炎症密切相关的 IL-17 变化不明显。IL-17 在慢性阻塞性肺疾病发病机制中的

作用, 以及他汀类药物对其有无影响, 还需要进一步通过慢性炎症动物模型进行深入研究。

综上所述, 烟熏能够导致大鼠肺部出现急性炎症病理变化, 伴有血中炎症因子的增高, 雾化吸入普伐他汀能够抑制烟熏导致的急性炎症病理变化, 降低炎症因子水平, 减轻急性炎症反应。由于他汀类药物的多效性尚存争议以及慢性阻塞性肺疾病是一种慢性气道炎症性疾病, 可进一步研究雾化吸入普伐他汀抑制肺部炎症反应的作用靶点以及药物对慢性气道炎症的影响。

### 参考文献

- [1] de Groot M C, Klungel O H, Leufkens H G, et al. Sources of heterogeneity in case-control studies on associations between statins, ACE-inhibitors, and proton pump inhibitors and risk of pneumonia [J]. *Eur J Epidemiol* 2014, 29(10):767-75.
- [2] Cao C, Wu Y, Xu Z, et al. The effect of statins on chronic obstructive pulmonary disease exacerbation and mortality: a systematic review and meta-analysis of observational research [J]. *Sci Rep*, 2015, 5:16461.
- [3] Carlson A A, Smith E A, Reid D J. The stats are in: an update on statin use in COPD [J]. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*, 2015, 10:2277-84.
- [4] Vestbo J, Hurd S S, Agustí A G, et al. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary [J]. *Am J Respir Crit Care Med* 2013, 187(4):347-65.
- [5] Carlson A A, Smith E A, Reid D J. The stats are in: an update on statin use in COPD [J]. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*, 2015, 10:2277-84.
- [6] 岳盈盈, 李鹏, 李志会, 等. 呼吸道合胞病毒感染兔呼吸系统组织病理学的改变和相关指数评分标准的建立 [J]. *中国比较医学杂志* 2010, 20(6):21-5, 88.
- [7] Collins R, Reith C, Emberson J, et al. Interpretation of the evidence for the efficacy and safety of statin therapy [J]. *Lancet*, 2016, 388(10059):2532-61.
- [8] Zhang M Q, Wan Y, Jin Y, et al. Cigarette smoking promotes inflammation in patients with COPD by affecting the polarization and survival of Th/Tregs through up-regulation of muscarinic receptor 3 and 5 expression [J]. *PLoS One*, 2014, 9(11):e112350.
- [9] Ogawa Y, Duru E A, Mercedes B T. Role of IL-10 in the resolution of airway inflammation [J]. *Curr Mol Med* 2008, 8(5):437-45.
- [10] Stenvinkel P, Ketteler M, Johnson R J, et al. IL-10, IL-6, and TNF- $\alpha$ : central factors in the altered cytokine network of uremia—the good, the bad, and the ugly [J]. *Kidney Int*, 2005, 67(4):1216-33.
- [11] 陈怡丽, 姜悦. Th17 细胞及其在神经免疫疾病中的作用 [J]. *国际检验学杂志*, 2011, 32(2):242-4.
- [12] Yao Z, Fanslow W C, Seldin M F, et al. Herpesvirus Saimiri encodes a new cytokine, IL-17, which binds to a novel cytokine receptor [J]. *Immunity*, 1995, 3(6):811-21.
- [13] 施沛青, 朱书, 钱友存. IL-17 的信号传导及功能研究 [J]. *中国细胞生物学学报* 2011, 33(4):345-57.

## Effect of inhaled pravastatin on acute lung inflammation in cigarette smoking-exposed rat

Zhang Yan, Chen Yuhong, Mei Xiaodong

(Dept of Respiratory Medicine, The Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230001)

**Abstract Objective** To investigate the effect of inhaled pravastatin on the acute inflammation of lung in smoked rats. **Methods** 32 male SD rats were randomly divided into four groups ( $n = 8$  per group), as the controls, cigarette-smoking exposure group, saline or pravastatin treatment groups. The rats in the control group were treated routinely, the other groups were exposed to cigarette smoking for one week. Rats in saline or pravastatin group were treated with saline or pravastatin inhalation respectively. During smoking exposure period rats were weighted before and after the treatment, executed at day eight, blood, bronchoalveolar lavage fluid (BALF), and lung tissue were collected. The morphological alternations of lung tissue were observed. Total cell numbers in BALF were counted. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect the levels of serum IL-10 and IL-17 content. **Results** The increase of body weight of smoke-exposed rats were less than that of the controls. In smoking-exposed rats, acute inflammatory changes were remarkable in the lung. The total cell numbers in BALF and levels of IL-10 were increased significantly ( $P < 0.05$ ). These changes were mitigated in pravastatin treated rats and an IL-10/IL-17 rebalance was observed. **Conclusion** Inhalation of pravastatin sodium has a certain inhibitory effect on cigarette smoke-induced acute lung inflammation in rats.

**Key words** pravastatin; smoking; inflammatory; inhalation