

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2021.02.007

辛伐他汀对慢性阻塞性肺疾病模型大鼠炎症因子表达的影响*

刘 青¹, 孙伯坚², 任冬飞¹, 李 林¹, 杨智晖¹, 梁瑞凯¹

(1. 河北省老年病医院, 河北 石家庄 050021; 2. 河北医科大学第一医院, 河北 石家庄 050000)

摘要:目的 研究辛伐他汀对慢性阻塞性肺疾病(COPD)模型大鼠炎症因子表达的影响。方法 将 50 只大鼠随机分为空白对照组(等体积生理盐水)、模型组(等体积生理盐水)和辛伐他汀高、中、低剂量组(15, 10, 5 mg/kg)。灌胃给药, 每日 1 次, 连续灌胃 56 d(除烟熏日外)。除空白对照组外, 其余各组大鼠分别于灌胃第 29, 43 天气管内注入脂多糖 200 μ g, 并确保大鼠持续吸烟 30 min, 以建立 COPD 大鼠模型。采用免疫组化法检测大鼠肺组织白细胞介素 17(IL-17)、白细胞介素 22(IL-22)、视黄酸相关孤儿受体 γ t(ROR γ t)表达水平, 以及气道间隔和支气管黏膜上皮组织炎症因子阳性细胞数。结果 与空白对照组比较, 模型组大鼠气道间隔及支气管黏膜上皮组织 IL-17, IL-22, ROR γ t 阳性细胞数显著增加($P < 0.05$); 与模型组比较, 辛伐他汀高、中剂量组大鼠气道间隔及支气管黏膜上皮组织 IL-17, IL-22, ROR γ t 阳性细胞数显著减少($P < 0.05$)。结论 辛伐他汀可有效减弱 COPD 模型大鼠炎症因子的表达, 减轻气道及肺部炎症反应。

关键词:慢性阻塞性肺疾病; 辛伐他汀; 白细胞介素 17; 白细胞介素 22; 视黄酸相关孤儿受体 γ t; 大鼠

中图分类号: R965; R974

文献标志码: A

文章编号: 1006-4931(2021)02-0024-04

Effect of Simvastatin on the Expression of Inflammatory Factors in Rats with Chronic Obstructive Pulmonary Disease

LIU Qing¹, SUN Bojian², REN Dongfei¹, LI Lin¹, YANG Zhihui¹, LIANG Ruikai¹

(1. Hebei Geriatric Hospital, Shijiazhuang, Hebei, China 050021; 2. The First Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang, Hebei, China 050000)

Abstract: Objective To study the effect of simvastatin on the expression of inflammatory factors in rats with chronic obstructive pulmonary disease(COPD). **Methods** Totally 50 rats were randomly divided into the blank control group(equal volume of 0.9% normal saline), model group(equal volume of normal saline) and simvastatin high-dose, medium-dose and low-dose groups(15, 10, 5 mg/kg). The rats were intragastrically administered once a day for 8 weeks(except for smoking day). Except for the rats in the blank control group, the rats in other groups were injected with lipopolysaccharide(LPS) 200 μ g on the 29th day and 43rd day of intragastric administration respectively, and the rats were kept smoking for 30 min to establish COPD rat models. The expression levels of interleukin-17(IL-17), interleukin-22(IL-22) and retinoid-related orphan nuclear receptor γ t(ROR γ t) in lung tissue, the number of inflammatory factor positive cells in airway septum and bronchial epithelial tissue were detected by immunohistochemistry. **Results** Compared with those in the blank control group, the levels of IL-17 and IL-22, and the ROR γ t positive cells in the airway septum and bronchial epithelial tissue in the model group were significantly increased($P < 0.05$). Compared with those in the model group, the levels of IL-17 and IL-22, and the ROR γ t positive cells in the airway septum and bronchial epithelial tissue in simvastatin high-dose group and medium-dose group were significantly decreased($P < 0.05$). **Conclusion** Simvastatin can effectively reduce the expression of inflammatory factors in COPD model rats, and reduce the inflammatory response in the airway and lung.

Key words: chronic obstructive pulmonary disease; simvastatin; interleukin-17; interleukin-22; retinoid-related orphan nuclear receptor γ t; rats

慢性阻塞性肺疾病(COPD)是临床常见的以气流受限为主要特征的慢性呼吸系统疾病,且病情呈进行性发展,发病率及致死率均较高^[1-2]。目前,临床认为 COPD 发病基础为气道慢性炎症,主要累及气道和肺实质,炎症细胞在气道内的浸润会促进气道内黏液分泌,加重炎症反应,造成气道恶性循环,故炎症细胞及其细胞因子在 COPD 发病过程中扮演重要角色^[3-4]。炎症因子包括白细胞介素(IL)家族大部分成员、肿瘤坏死因子(TNF)

家族成员及基质金属蛋白等,其中白细胞介素 17(IL-17)、白细胞介素 22(IL-22)均参与 COPD 发病过程,故有效阻断 IL-17, IL-22 等炎症因子的释放对于减轻炎症反应尤为关键^[5-6]。目前,临床对 COPD 的治疗多以减轻症状、预防感染、抑制病情继续恶化为主,出现重度及极重度气流受限症状的患者常使用糖皮质激素类药物,以减轻气道炎症程度,但长期服用易出现药品不良反应,不利于康复^[7-8]。近年来相关研究发现,他汀类药

*基金项目:河北省医学科学研究重点课题[20160442]。

第一作者:刘青,女,硕士研究生,主治医师,研究方向为慢性阻塞性肺疾病,(电子信箱)vj0238@163.com。

物在 COPD 的预防及治疗中具有广阔前景,但具体抗炎机制及药理作用尚不清楚^[9]。本研究中观察了辛伐他汀对 COPD 模型大鼠 IL-17 和 IL-22 表达的影响。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 仪器、试剂与动物

1.1.1 仪器

CX32RTSF 型显微镜(日本 Olympus 公司);RM2235 型石蜡切片机、EG1160 型石蜡包埋机(德国 Leica 公司);MLS-3750 型全自动高压蒸汽锅(日本 Sanyo 公司);BI-2000 型医学图像分析系统(成都泰盟科技有限公司);LHP-400B 型培养箱(江苏省金坛市双捷实验仪器厂)。

1.1.2 试剂

辛伐他汀(北大医药股份有限公司,批号为 20193359,规格为每片 20 mg);10% 水合氯醛(青岛宇龙海藻有限公司,批号为 20141001);脂多糖(LPS,美国 Sigma 公司,批号为 L2880);视黄酸相关孤儿受体 γ t (ROR γ t,上海研卉生物科技有限公司,批号为 ab219496);香烟(滁州烟卷厂,规格为每支含尼古丁 1.2 mg、焦油 19 mg);其余试剂均为分析纯,水为纯化水。

1.1.3 动物

清洁级 SD 大鼠 50 只,雄性,体质量 0.18~0.22 kg,周龄 6~8 周,购自河北医科大学动物管理中心[实验动物许可证号 SCXK(冀)2013-1-003]。标准条件饲养 7 d,自由进食、饮水,适宜温度、湿度,人工黑暗和光照交替。

1.2 方法

1.2.1 模型建立

分别于第 29、43 天以水合氯醛(0.5 mg/100 g)麻醉大鼠,然后向气管内注入 LPS 200 μ g;每日上午将大鼠放于密封的 1 m³ 烟室内,持续放入香烟烟雾,确保大鼠持续吸烟 30 min,每日 1 次,每次 15 支,复制模型共用 56 d。建模成功标准:大鼠行动灵敏度及活动力均下降,进食量减少,毛发逐渐失去光泽,出现干涩枯黄,对外界刺激的敏感度下降,体质量明显减轻;病理学改变,开胸可见肺脏萎陷,肺脏体积明显增大,呈灰暗色;苏木精-伊红(HE)染色见典型肺气肿表现。

1.2.2 分组与给药

将 50 只大鼠随机分为空白对照组(等体积生理盐水)、模型组(等体积生理盐水)和辛伐他汀高、中、低剂量组(15, 10, 5 mg/kg),灌胃给药,每日 1 次,连续灌胃 8 周(除烟熏日外)。

1.2.3 免疫组化检测

腹腔注射 10% 水合氯醛(0.5 mg/100 g)麻醉大鼠,

开胸后心脏放血处死大鼠^[10]。2 叶右肺标本离体后用 10% 甲醛溶液固定 24 h,脱水、石蜡包埋、切片。以 HE 染色,置显微镜下、选取 6 个视野观察,分析白细胞介素 17 (IL-17)、白细胞介素 22 (IL-22) 及 ROR γ t 表达水平。细胞胞浆内呈棕黄色颗粒即为阳性表达,颜色与表达呈正比,棕黄色颗粒越多即表达水平越强;细胞胞浆内未出现棕黄色颗粒即为阴性。

1.2.4 炎症因子表达水平检测

取上述切片,置显微镜下,以图像分析软件分析支气管黏膜上皮细胞阳性细胞百分数。选取内径 < 2 mm 的小气道,统计出气道间隔阳性细胞数,以每 1 m³ 阳性细胞数表示。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 23.0 统计学软件分析。计量资料以 $\bar{X} \pm s$ 表示,行 t 检验;计数资料以率(%)表示,行 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 对大鼠肺组织切片炎症因子表达的影响

结果见图 1(因篇幅所限,仅选取辛伐他汀高剂量组作为代表)。

2.2 对大鼠气道间隔炎症因子阳性细胞数的影响

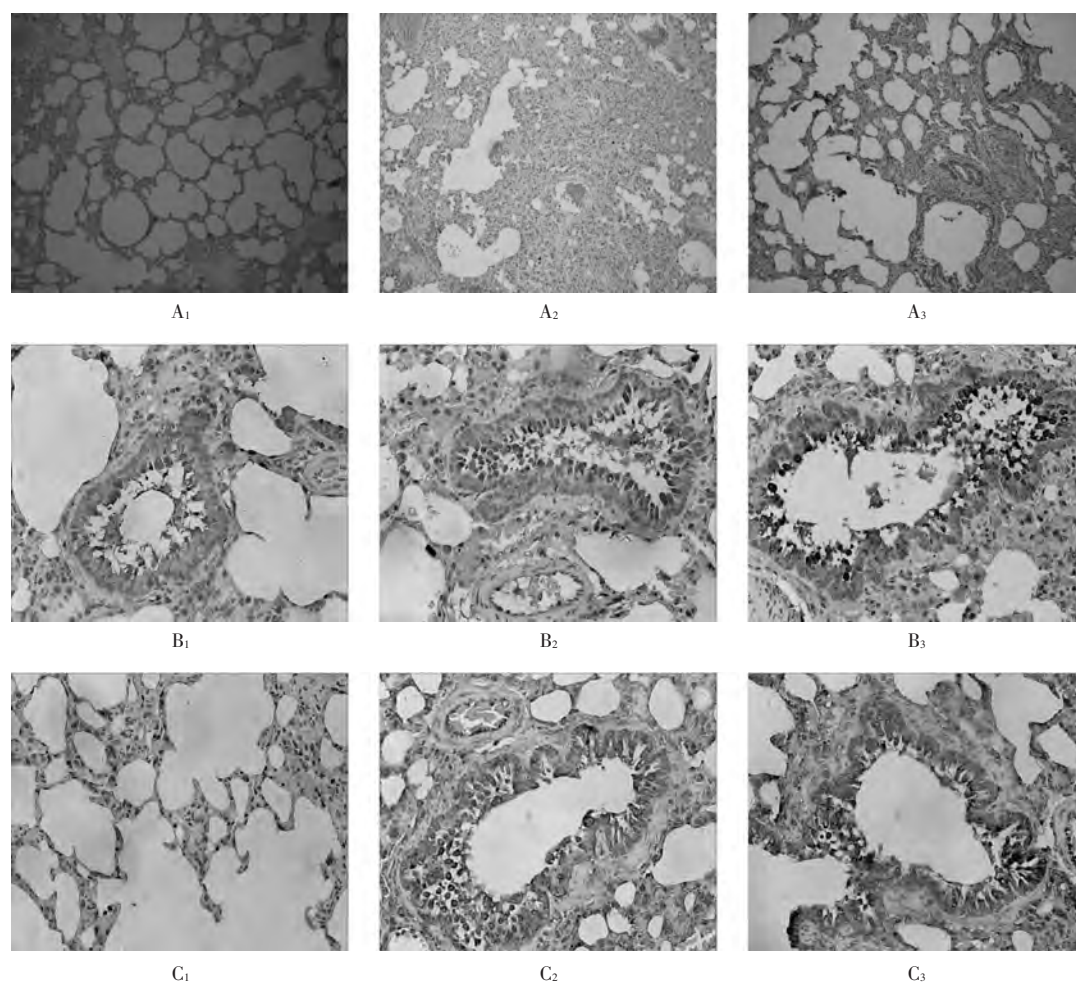
与空白对照组比较,模型组大鼠气道间隔 IL-17, IL-22, ROR γ t 阳性细胞数显著增加($P < 0.05$);与模型组比较,辛伐他汀高、中剂量组大鼠气道间隔 IL-17, IL-22, ROR γ t 阳性细胞数显著减少($P < 0.05$)。详见表 1。

2.3 对大鼠支气管黏膜上皮组织炎症因子阳性细胞数的影响

与空白对照组比较,模型组大鼠支气管黏膜上皮组织 IL-17, IL-22, ROR γ t 阳性细胞数显著增加($P < 0.05$);与模型组比较,辛伐他汀高、中剂量组大鼠支气管黏膜上皮组织 IL-17, IL-22, ROR γ t 阳性细胞数显著减少($P < 0.05$)。详见表 2。

3 讨论

COPD 作为临床常见病及多发病,发病机制较复杂,且目前临床针对该疾病的基础研究及防治均无关键性突破^[11-12]。COPD 动物模型应具备慢性气道阻塞、小气道受阻增大及肺顺应性降低、与 COPD 相似的诱因、出现气道重塑及气道高反应性等特征^[13-14]。目前,临床认为啮齿类动物可作为建模的最佳动物,其基因测序与人类极为相似;且其价格低廉,繁殖周期较快^[15]。本研究中实施吸烟加气道内注射内毒素多因素诱导方案,香烟中含有甘油的尼古丁及氢氰酸等有毒物质可破坏气管纤毛上皮细胞,导致上皮细胞组织出现损伤或坏死,且



A. IL-17 B. IL-22 C. ROR γ t
A₁, B₁, C₁. 空白对照组 A₂, B₂, C₂. 模型组 A₃, B₃, C₃. 辛伐他汀高剂量组

图 1 免疫组化图(HE, ×400)

A. IL-17 B. IL-22 C. ROR γ t
A₁, B₁, C₁. Blank control group A₂, B₂, C₂. Model group A₃, B₃, C₃. Simvastatin high-dose group

Fig. 1 Immunohistochemical image(HE staining, ×400)

表 1 各组大鼠气道间隔炎性因子阳性细胞数比较($\bar{X} \pm s, \%$, $n=10$)

Tab. 1 Comparison of the positive cells of inflammatory factors in the airway septum of rats among the five groups($\bar{X} \pm s, \%, n=10$)

组别	IL-17	IL-22	ROR γ t
空白对照组	5.34 ± 3.25	8.64 ± 3.15	6.82 ± 4.34
模型组	95.34 ± 15.34 ^a	64.98 ± 9.68 ^a	77.68 ± 12.34 ^a
辛伐他汀 低剂量组	85.64 ± 13.24	58.61 ± 7.16	71.64 ± 10.36
中剂量组	76.35 ± 11.28 ^b	52.61 ± 6.34 ^b	62.13 ± 8.24 ^b
高剂量组	65.84 ± 8.64 ^b	38.64 ± 4.02 ^b	54.36 ± 6.87 ^b

注:与空白对照组比较,^a $P < 0.05$;与模型组比较,^b $P < 0.05$ 。
表 2 同。

Note: Compared with those in the blank control group, ^a $P < 0.05$; compared with those in the model group, ^b $P < 0.05$; as well as Tab. 2.

气道及肺组织在烟雾作用下,通透性增加,易被蛋白酶攻击,损伤肺组织,最终诱发 COPD^[16-17]。

表 2 各组大鼠支气管黏膜上皮组织炎性因子阳性细胞数比较($\bar{X} \pm s, \%, n=10$)

Tab. 2 Comparison of the positive cells of inflammatory factors in the bronchial epithelial tissue of rats among the five groups($\bar{X} \pm s, \%, n=10$)

组别	IL-17	IL-22	ROR γ t
空白对照组	8.57 ± 4.72	6.28 ± 5.04	7.58 ± 3.57
模型组	78.68 ± 10.98 ^a	58.97 ± 9.35 ^a	79.46 ± 11.24 ^a
辛伐他汀 低剂量组	70.15 ± 8.34	51.31 ± 8.25	71.54 ± 10.64
中剂量组	65.34 ± 6.25 ^b	46.35 ± 7.02 ^b	65.34 ± 9.15 ^b
高剂量组	58.64 ± 4.21 ^b	38.64 ± 4.25 ^b	52.31 ± 7.21 ^b

IL-17 主要来源于 CD4⁺T 淋巴的 Th17 细胞,通过特异性转录因子 ROR γ t 编码产生的效应因子,促进中性粒细胞及巨噬细胞的聚集及基质金属蛋白酶-9 的分泌^[18-19]。此外,IL-17 还可促进支气管上皮细胞中气道黏液蛋白的产生,增强气道炎性反应,参与疾病发生与发展^[20-22]。IL-22 主要由 Th17 细胞及自然杀伤(NK)

细胞产生,可诱导中性粒细胞的分泌,加重气道炎症程度,加快 COPD 进程^[23]。他汀类药物是 3-羟基-3-甲基-戊二酰辅酶 A 还原酶抑制剂,主要在肝脏内合成,临床常用于血管疾病并发症预防及调脂治疗^[24]。相关研究表明,他汀类药物可发挥抗炎、抗氧化及抑制黏附分子表达等作用^[25]。本研究中,与模型组比较,辛伐他汀高、中剂量组大鼠气道间隔和支气管黏膜上皮组织 IL-17, IL-22, ROR γ t 阳性细胞数显著减少。辛伐他汀抑制气道及肺组织中性粒细胞渗出及炎症因子的释放,减轻全身炎症反应,破坏炎症细胞包膜上抑制蛋白及脂筏结构的异戊二烯化修饰,继而起到抗炎作用。本研究仍有一定局限性,如未针对不同剂量辛伐他汀用于 COPD 模型大鼠的不良反应进行研究,今后需进一步增加对不同剂量辛伐他汀治疗 COPD 安全性问题的分析。

综上所述,辛伐他汀可有效减弱 COPD 模型大鼠炎症因子的表达,减轻气道及肺部炎症反应。

参考文献

- [1] 曾强林,王小明,李珊娜,等. 慢性阻塞性肺疾病急性加重患者血嗜酸粒细胞增高的发生情况及临床特征[J]. 中华医学杂志, 2017,97(40):3166-3170.
- [2] 陈伟,马强,朱镇镇. 慢性阻塞性肺疾病合并支气管扩张症患者临床特征及预后相关因素分析[J]. 实用临床医药杂志, 2019,23(7):72-75.
- [3] 毛成晔,吴添沐. 慢性阻塞性肺疾病患者炎症反应与营养不良的相关性研究[J]. 实用临床医药杂志, 2016,20(17):41-43.
- [4] 郭庆玲. 慢性阻塞性肺疾病患者外周血 CD $_4^+$ 和 CD $_8^+$ T 淋巴细胞和 GDF-15 水平与其血清炎症因子水平的关系[J]. 实用医学杂志, 2016,32(4):597-599.
- [5] 吴亮亮,陈乐蓉,袁小兰,等. PM $_2.5$ 对大鼠 COPD 模型肺泡灌洗液 IL-8、IL-17、TNF- α 影响及意义[J]. 国际呼吸杂志, 2017,37(17):1300-1304.
- [6] ROUZIC OL, PICHAVANT M, FREALLE E, et al. Th17 cytokines: Novel potential therapeutic targets for COPD pathogenesis and exacerbations[J]. European Respiratory Journal, 2017, 50(4): 1602434.
- [7] 单淑香,徐向英,刘艳霞,等. 噻托溴铵吸入治疗 COPD 患者痰液炎症细胞计数及相关炎症因子表达变化[J]. 山东医药, 2016,56(3):74-75.
- [8] RODRIGUEZ JM, MONSALVES-ALVAREZ M, HENRIQUEZ S, et al. Glucocorticoid Resistance in Chronic Diseases[J]. Steroids, 2016,115:182-192.
- [9] 张雪,费霞,张旻. COPD 患者糖皮质激素不敏感的发生机制和应对策略研究进展[J]. 国际呼吸杂志, 2016, 36(21):1643-1647.
- [10] 中华人民共和国科学技术部. 关于善待实验动物指导性意见 [EB/OL]. (2006-09-30) [2020-03-10]. http://www.most.gov.cn/fggw/zfwj/zfwj2006/200609/t20060930_54389.htm.
- [11] 范韵鑫,张景熙,白冲. 外泌体在 COPD 发病机制及诊治中的研究进展[J]. 国际呼吸杂志, 2018,38(12):945-949.
- [12] 查干,吴小军. 特异性和非特异性免疫细胞在 COPD 发病机制中的作用[J]. 国际呼吸杂志, 2017,37(16):1258-1263.
- [13] 曹念,代阅,许建强,等. 姜黄素对慢性阻塞性肺疾病大鼠的保护作用研究[J]. 贵州医药, 2018,42(4):10-13.
- [14] 宋淑范,辛平. 炎症细胞因子 IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-8 对慢性阻塞性肺疾病模型小鼠肺癌生长及转移的影响[J]. 临床与病理杂志, 2017,37(11):2323-2331.
- [15] 程羽,陶伟利,张晓梅,等. 建立慢性阻塞性肺疾病动物模型的实验研究[J]. 世界中西医结合杂志, 2016,11(4): 445-448.
- [16] 张兰英,张婧,欧阳瑶. 烟熏诱导慢性阻塞性肺疾病小鼠模型的建立及验证[J]. 山东医药, 2016,56(32):35-38.
- [17] 李飞飞,张爱珍,段鹏鹏. 加味六君子汤对慢性阻塞性肺疾病模型大鼠外周血肿瘤坏死因子- α 白细胞介素-8 含量及肺组织病理变化的影响[J]. 中国药物与临床, 2016,16(4): 492-494.
- [18] LI FF, ZHANG AZ, DUAN PP. Effect of modified Liujunzi decoction on peripheral blood tumor necrosis factor- α , interleukin-8 contents and pathological changes of pulmonary tissues in model rats with chronic obstructive pulmonary disease[J]. Chinese Remedies and Clinics, 2016,16(4):492-494.
- [19] 李玲春. 慢性阻塞性肺疾病患者辅助性 T 细胞 17/调节性 T 细胞变化及其与肺功能的相关性研究[J]. 实用心脑血管病杂志, 2016,24(6):38-41.
- [20] DIGE A, MAGNUSSON MK, UHRENHOLT C, et al. Effects of Anti-TNF α Treatment on Mucosal Expression of IL-17A, IL-21, and IL-22 and Cytokine-Producing T Cell Subsets in Crohn's Disease[J]. Mediators Inflamm, 2018,2018:3279607.
- [21] 张占强,吴春艳,方彬,等. Th17/Treg、IL-17 在慢性阻塞性肺疾病患者中的表达及与肺功能的相关性[J]. 现代中西医结合杂志, 2018,27(22):2419-2423.
- [22] 王强. 慢性阻塞性肺疾病患者血清中 CAPI 含量检测及其与病情严重程度的相关关系[J]. 国际呼吸杂志, 2018, 38(21):1646-1650.
- [23] 朱卫波. 甲强龙联合多索茶碱对慢性阻塞性肺病患者血清脂联素、MMP-9、IL-17、IL-10 及 TNF- α 水平的影响[J]. 海南医学院学报, 2016,22(12):1214-1216.
- [24] FRANCESCONI LP, ANDRÉ T VICTORINO, SALAH IA, et al. Proinflammatory and anti-inflammatory biomarkers in schizophrenia and influence of simvastatin on the interleukin-6[J]. Int Clin Psychopharmacol, 2018,34(2):84-88.
- [25] 孟雄,王兮,郭芮伶. 辛伐他汀对脂多糖诱导的急性肺损伤小鼠保护作用及对 HMGB1/TLR4/NF- κ B 信号通路的影响[J]. 职业与健康, 2019,35(11):1470-1475.

(收稿日期:2020-03-17;修回日期:2020-06-27)