

紫杉醇对博来霉素诱导的肺纤维化大鼠模型炎症反应和氧化应激的影响

肖瑶 陈柯宇 田媛媛 陈强 李萍*

(长沙医学院 湖南长沙 410219)

摘要: 目的: 探讨紫杉醇对博来霉素诱导的大鼠肺纤维化过程中炎症反应和氧化应激的影响。方法: 选择 40 只 SPF 级的健康 SD 大鼠, 然后随机地将这些大鼠分成对照组、模型组、低剂量紫杉醇组、中剂量紫杉醇组以及高剂量紫杉醇组, 共 5 组, 每组 8 只。除了对照组以外, 对其他的实验组都采用博来霉素气管内滴注的方法构建肺纤维化大鼠模型。采取 Masson 染色的方法用于观察大鼠肺纤维化的程度; 采取酶联免疫吸附法用于检测外周血的炎症指标 (MIP-1 α 、MCP-1 及 IL- β) 和氧化应激指标 (MDA、GSH) 的水平。结果: 相比于对照组, 模型组肺纤维化的程度呈显著加强, 外周血的 MIP-1 α 、MCP-1 及 IL- β 、MDA 呈显著升高与模型组相比低剂量紫杉醇组的肺纤维化得到改善同时外周血的 MIP-1 α 、MCP-1 及 IL- β 、MDA 有所下降; 相比于低剂量紫杉醇组, 中剂量和高剂量紫杉醇组的肺纤维化呈显著改善同时外周血的 MIP-1 α 、MCP-1 及 IL- β MDA 水平呈显著降低 ($P < 0.05$)。结论: 紫杉醇可以降低博来霉素诱导的肺纤维化大鼠血浆当中的炎症因子 MIP-1 α 、MCP-1 及 IL- β 和氧化应激指标 MDA 和 GSH 的含量, 以抑制大鼠肺纤维化的发展, 轻肺纤维化的程度。

关键词: 紫杉醇; 肺纤维化; 炎症因子; 氧化应激

肺纤维化 (pulmonary fibrosis, PF) 是一种慢性持续性的间质性肺疾病, 会出现细胞外基质的大量增生和过分堆积, 进而使肺组织结构发生重构, 它的发病率为 1.7/10000, 并且呈日益上升的趋势^[1]。肺纤维化主要的病理改变是肺泡的结构遭到损伤、肺成纤维细胞会生长增殖以及细胞外基质的过分沉积, 从而导致了肺组织内广泛瘢痕的形成, 临床主要表现体现在进行性呼吸困难和进行性的肺功能恶化。目前仍然没有发现针对于肺纤维化的特效治疗药物, 其病死率非常高。在数多的实验研究中表明, 部分致炎因子能够使肺内大量的炎性细胞活化, 使其释放出趋化因子, 促进了早期肺纤维化的发生。趋化因子包括了 C-C 家族和 CXC 家族, C-C 家族成员包括了单核细胞炎性蛋白-1 α (MIP-1 α) 和巨噬细胞趋化蛋白-1 (MCP-1), 二者对免疫反应和炎症反应细胞有着显著的趋化活性, 并且能够调整控制效应细胞的功能^[2], 是调节肺损伤、肺的免疫功能和与之相关的细胞因子网络的重要成员^[3]。肺纤维化发生时, 各种炎性细胞在肺组织内发生聚集, 纤维增生, 大量胶原过分沉积于肺间质内, 导致肺功能受到损伤, 患者出现呼吸困难症状, 晚期时大多数患者死于呼吸衰竭。目前临床上大部分采用糖皮质激素联合免疫抑制剂的方法治疗肺纤维化, 但是就治疗的效果来看采用这种治疗方法会导致很大的毒副作用, 而且这种治疗方法的效果也不精确。因此, 寻找一种有效的肺纤维化的治疗方法迫在眉睫, 研究肺纤维化发病的生物学机制、找到治疗肺纤维化的特效治疗药物也越来越受到广大民众的重视。

有研究发现, 紫杉醇可以作用于抗肿瘤和抗癌, 在临床治疗上, 多种癌症及肿瘤等疾病的治疗中都有广泛应用到紫杉醇。现有研究显示, 紫杉醇对肝纤维化具有一定的保护作用^[4], 但关

于紫杉醇对博来霉素诱导的肺纤维化的作用, 目前还没有有关的研究有报道, 对于它对肺纤维化的作用机制尚未明确。目前报道的关于紫杉醇对肺纤维化的研究不多, 本次实验研究中我们使用博来霉素对大鼠进行诱导肺纤维化, 再对肺纤维化大鼠模型进行低、中、高剂量的紫杉醇的注射, 探讨紫杉醇对肺纤维化的影响, 通过观察紫杉醇对博来霉素诱导的纤维化相关炎症和氧化应激的影响, 进一步研究 MIP-1 α 、MCP-1 及 IL- β 等炎症因子在肺纤维化发病中的作用影响机制, 为早期诊治肺纤维化提供依据。

1. 材料与方法

1.1 动物与分组

选取 SPF 级的健康雄性 SD 大鼠共 40 只, 各大鼠的体质量在 180~200g 之间, 通过北京维通利华实验动物有限公司 (合格证编号: SCXK2012-001) 采购购入。然后将这些大鼠全部放置于标准动物房进行饲养, 自由进食水。适应性饲养 1 周以后, 随机化地将这些大鼠进行分组, 分为对照组、模型组、低剂量紫杉醇组、中剂量紫杉醇组和 剂量紫杉醇组, 共 5 组, 每组 8 只。

1.2 药物与试剂

采取盐酸博来霉素 (辉瑞制药有限公司, 批号: 16023511) 和紫杉醇 (南京绿叶制药有限公司) 进行注射。MIP-1 α 、MCP-1 及 IL- β 检测试剂盒 (南京建成生物有限公司)、MDA 和 GSH 检测试剂盒 (武汉博士德生物有限公司)。

1.3 主要仪器

EG11508 组织包埋机 (德国徕卡), RM2255 全自动轮转式切片机 (德国徕卡)。

1.4 造模与给药

使用气管内滴注博来霉素 (4mg/kg) 的方式制备肺纤维化

大鼠模型。在手术之后的第二天开始经鼠尾静脉注射紫杉醇和溶剂，紫杉醇剂量分别为低剂量（1mg/kg）、中剂量（2mg/kg）以及高剂量（4mg/kg）。每天注射1次，连续28d给药。对照组为注射同等剂量的溶剂。

1.5 观察指标

1.5.1 Masson 染色评估肺纤维化程度

将各组大鼠的部分肺组织采用石蜡包埋的方法制作成石蜡切片，按照 Masson 染色试剂盒上的方法，使用蒸馏水将切片进行冲洗，依次将其浸入二甲苯和不同浓度梯度的乙醇溶液中，并使用无水乙醇进行脱水处理，按照说明书依次使用试剂盒里的A、B染色液进行染色，之后再清洗，最后加入HE染液，用乙醇和二甲苯进行透明处理，用中性树脂封片，在光镜下观察，进行分析。

1.5.2 炎性指标检测

应用10%的水合氯醛对大鼠进行麻醉，从颈总动脉进行插管取血1ml，经离心之后，检测各组血清炎性指标（MIP-1 α 、MCP-1及IL- β ）的含量，检测方法严格按照试剂盒上的说明书进行。

1.5.3 氧化应激指标检测

从颈总动脉进行插管取血1ml，经离心之后，检测各组血清氧化应激指标（MDA、GSH）的含量，检测方法严格按照试剂盒上的说明书进行。

1.6 统计学分析

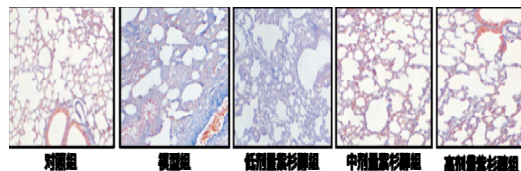
应用SPSS18.0软件统计学分析，计量资料用均数 \pm 标准差（ $\bar{x} \pm s$ ）表示，采用单因素方差分析，组间应用LSD进行多重比较。以P<0.05为差异有统计学意义。

2.结果

2.1 各组大鼠肺纤维化水平

相比较于对照组，模型组大鼠的肺泡组织结构破坏明显，可以观察到大量的炎性细胞浸润和红细胞渗出，同时可以观察

到胶原纤维呈显著增多，而与模型组相比，低剂量紫杉醇组的肺纤维化状况得到改善；相比低剂量紫杉醇组，中剂量和高剂量紫杉醇组的肺纤维化程度显著改善（P<0.05），见图。



2.2 各组大鼠炎性指标水平

相比于对照组，模型组的炎性指标（MIP-1 α 、MCP-1及IL- β ）呈显著上调，与模型组相比，低剂量紫杉醇组上述的炎性指标有所降低；相比低剂量紫杉醇组，中剂量和高剂量紫杉醇组上述的炎性指标显著改善（P<0.05），见表1。

表1 各组大鼠炎性指标水平

组别	例数	MIP-1 α (μ g/ml)	MCP-1 (μ g/ml)	IL- β (μ g/ml)
对照组	8	8.95 \pm 1.30	14.58 \pm 2.14	9.23 \pm 1.45
模型组	8	19.35 \pm 2.10 ^a	27.55 \pm 2.86 ^a	21.23 \pm 2.34 ^a
低剂量紫杉醇组	8	14.40 \pm 1.68 ^b	19.45 \pm 2.45 ^b	15.35 \pm 1.86 ^b
中剂量紫杉醇组	8	10.25 \pm 1.55 ^c	16.15 \pm 1.90 ^c	12.35 \pm 1.79 ^c
高剂量紫杉醇组	8	9.80 \pm 1.40 ^c	15.86 \pm 1.40 ^c	11.89 \pm 1.85 ^c

注：与对照组比较，^aP<0.05；与模型组比较，^bP<0.05；与低剂量紫杉醇组比较，^cP<0.05。

2.3 氧化应激指标水平

相比较于对照组，模型组的氧化应激指标MDA呈显著上调，而GSH呈显著下调，与模型组相比，低剂量紫杉醇组的MDA呈显著降低，而GSH呈显著升高；相比低剂量紫杉醇组，中剂量和高剂量紫杉醇组的MDA呈显著降低，而GSH呈显著升高（P<0.05），见表2。

表2 各组大鼠氧化应激指标水平

组别	例数	MDA(nmol/mg)	GSH(U/mg)
对照组	8	11.90 \pm 1.86	25.48 \pm 3.26
模型组	8	26.57 \pm 2.30 ^a	10.35 \pm 2.70 ^a
低剂量紫杉醇组	8	19.42 \pm 2.14 ^b	15.39 \pm 2.17 ^b
中剂量紫杉醇组	8	13.46 \pm 1.85 ^c	21.10 \pm 1.86 ^c
高剂量紫杉醇组	8	13.08 \pm 1.65 ^c	21.56 \pm 1.95 ^c

注：与对照组比较，^aP<0.05；与模型组比较，^bP<0.05；与低剂量紫杉醇组比较，^cP<0.05。

3. 讨论

当细胞因子网络的调节控制出现不平衡时，会引起大量的

趋化因子的释放,进而能够导致大量的炎性细胞的聚集和活化,最终致使肺纤维化发生,调节控制趋化因子的表达可以防止肺纤维化的发生,因此寻找一种调节控制趋化因子表达的药物对肺纤维化的治疗至关重要。大量研究表明,在肺纤维化的发展进程中,各种炎性细胞被激活并聚集在肺组织内。在肺纤维化早期时候,会出现中性粒细胞大量增殖渗出,引起 MIP-1 α 的高表达。而 MIP-1 α 又能够引起各种炎性细胞活化,使其聚集在肺组织内,从而能够促进 MCP-1 的表达。因此,抑制 MIP-1 α 、MCP-1 的激活及其生物活性,可以使肺纤维化发生早期的中性粒细胞在肺组织内的聚集显著减少,中性粒细胞的渗出减少,后期肺泡巨噬细胞的聚集也减少^[5]。同时,中性粒细胞、巨噬细胞等多种炎症细胞能够释放肺组织 IL- β 炎症因子,它可以对肺泡上皮细胞造成损害,并且能够引起肺组织发生水肿,进而影响患者的通气水平以及血氧浓度下降,造成呼吸困难,最终导致患者呼吸衰竭死亡。目前国内外大多数的学者认为,肺纤维化的发病机制涉及炎症细胞及其释放的多种细胞因子,它们在肺纤维化中扮演着至关重要的角色。IL-1 β 是前炎症细胞因子之一,其在机体内的作用最强,它能够广泛地参与机体内多种疾病的发生和发展。

肺纤维化发病的关键因素是脂质过氧化,而反映脂质过氧化的指标有 GSH、MDA 等。GSH 是超氧阴离子自由基的中和剂,对机体自由基诱发的过氧化反应有较强的抑制作用,可维持氧化和抗氧化的平衡^[6]。通过测试机体 GSH 的水平,可以了解氧化应激对机体造成的损害程度,并评估相应的治疗手段的效果。GSH 是一种重要的抗氧化剂,是评估机体组织纤维化程度的重要指标。MDA 是脂质过氧化的终产物,被认为是反映过氧化损伤的重要参考指标^[7]。本研究利用测量肺纤维化大鼠肺组织 MDA 和 GSH 的含量,发现紫杉醇能够降低大鼠肺组织中的 MDA 水平,同时升高 GSH 的含量。这一结果表明紫杉醇能够改善脂质过氧化状态以抑制博来霉素诱发的肺纤维化进程。

本实验通过采取博来霉素气管内滴注的方法,建立肺纤维化大鼠模型,并观察 Masson 染色图像。我们发现模型组大鼠的肺组织中有明显的炎症细胞浸润,肺泡壁增厚,大量的胶原纤维沉积,明显表现出肺纤维化的病理改变,上述肺纤维化的结果表明了实验中肺纤维化大鼠模型造模成功。本实验研究使用紫杉醇作为干预药物,从而比较不同浓度的紫杉醇对肺纤维化大鼠的作用,实验的结果显现出紫杉醇能够有效地减轻肺纤维化肺组织中的炎症反应和纤维化的程度,同时,它还可以降

低氧化应激指标的水平,该结果表明紫杉醇可以使博来霉素诱导的肺纤维化大鼠血浆当中炎症因子 MIP-1 α 、MCP-1 及 IL- β 和氧化应激指标 MDA 和 GSH 的含量都得到降低,对博来霉素诱导的肺纤维化大鼠模型有一定治疗作用。

综上所述,紫杉醇可以通过抑制纤维化大鼠肺组织炎症进展以及降低氧化应激反应以降低博来霉素诱导的大鼠肺纤维化的程度。

参考文献:

- [1]Martinez F J, Collard H R, Pardo A, et al. Idiopathic pulmonary fibrosis [J]. Nat Rev Dis Primers, 2017,3:17074.
 - [2]Smith R E, Strieter R M, Phan S H. Production and function of murine macrophage inflammatory protein-1 α in bleomycin-induced lung injury. J Immunol 1994,153:470
 - [3]Tsay W C, Strieter R M, Zisman D A et al. Nitric oxide is required for effective innate immunity against Klebsiella pneumoniae. Infection and Immunity 1997,65(5):1870
 - [4]边虹铮,刘丽芳.紫杉醇对牛血清白蛋白诱导大鼠肝纤维化的抑制作用及机制[J].中国普通外科杂志,2018,27(8):1014-1021.
 - [5]Hasegawa M, Sato S, Takehara K. Augment production of chemokines (monocyte chemoattractant protein-1(MCP-1) macrophage inflammatory protein-1 α (MIP-1 α) and MIP-1 β) in patients with systemic sclerosis: MCP-1 and MIP-1 α may be involved in the development of pulmonary fibrosis. Clin Exp Immunol 1999 117(1):159
 - [6]Duan C, Kuang L, Xiang X, et al. Drp1 regulates mitochondrial dysfunction and dysregulated metabolism in ischemic injury via Clec16a-, BAX-, and GSH-pathways [J]. Cell Death Dis. 2020 Apr 20;11(4):251.
 - [7]Adiguzel C, Kalender Y. Bendiocarb-induced nephrotoxicity in rats and the protective role of vitamins C and E [J]. Environ Sci Pollut Res Int. 2020,27(6):6449-6458.
- 第一作者:肖瑶(2002.11.11-),女,汉族,湖南省邵阳市,本科在读,口腔医学专业
- 通讯作者:李萍(1988.04.15-),女,汉族,湖南省邵阳市,硕士,讲师,研究方向:呼吸生理
- 基金项目:湖南省大学生创新创业训练计划项目:湘教通(2019)219号-2414