

辛伐他汀对慢性阻塞性肺疾病大鼠肺部及系统性炎症反应的影响

黄炎明¹, 熊萍¹, 左万里¹, 张春来¹, 周伟²

1. 江门市中心医院呼吸内科, 广东 江门 529030; 2. 江门市中心医院病理科, 广东 江门 529030

摘要: **目的** 探讨辛伐他汀早期干预对慢性阻塞性肺疾病(慢阻肺)大鼠肺部及系统性炎症反应的影响。**方法** 将 40 只雄性 Wistar 大鼠随机均分为正常组(A 组)、辛伐他汀组(B 组)、慢阻肺模型组(C 组)、辛伐他汀干预组(D 组), 每组 10 只。C 组和 D 组采用反复香烟烟雾暴露法制备慢阻肺模型。B 组和 D 组大鼠采用辛伐他汀 $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 灌胃, 其他两组用等体积的生理盐水灌胃, 共 16 周。造模结束后留取血液标本测定系统性炎症指标[外周血白细胞计数(WBC)及血清超敏 C 反应蛋白(hs-CRP)]; 制作肺组织病理切片进行病理学观察, 计数平均肺内衬间隔(MLI)和平均肺泡数(MAN)。**结果** C 组与 D 组的气道炎症病理评分、MLI、外周血 WBC 及血清 hs-CRP 水平均较 A、B 组明显增高(P 均 < 0.01), MAN 则较 A、B 组明显减低(P 均 < 0.01)。与 C 组比较, D 组气道炎症病理评分、MLI、外周血 WBC 及血清 hs-CRP 均明显减低(P 均 < 0.01), MAN 较 C 组增高($P < 0.01$)。外周血 WBC、血清 hs-CRP 水平与气道内炎症病理评分成正相关($r = 0.598, P < 0.01; r = 0.767, P < 0.01$), 与 MAN 则成负相关($r = -0.657, P < 0.01; r = -0.702, P < 0.01$)。**结论** 辛伐他汀可抑制肺部及系统性炎症反应, 减轻肺气肿的程度, 从而有可能延缓肺功能的下降。

关键词: 慢性阻塞性肺疾病; 辛伐他汀; 系统性炎症反应; 气道炎症病理学评分; 肺内衬间隔; 肺泡数

中图分类号: R-33 R 563 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-8182(2016)06-0730-04

Influence of simvastatin on pulmonary and systemic inflammatory responses in COPD rats

HUANG Yan-ming*, XIONG Ping, ZUO Wan-li, ZHANG Chun-lai, ZHOU Wei

* Department of Respiratory Medicine, Jiangmen Central Hospital, Jiangmen, Guangdong 529030, China

Corresponding author: XIONG Ping, E-mail: xiongp2011@126.com

Abstract: Objective To explore the influence of simvastatin early intervention on the pulmonary and systemic inflammatory responses in rats with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). **Methods** Forty male Wistar rats were randomly divided into four groups ($n = 10$ each): control group (group A), simvastatin group (group B), COPD group (group C) and simvastatin intervention group (group D). The COPD model was established by repeatedly exposing rats to the smog environment of cigarette in group C and D. Simvastatin ($5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) was given by gavage in group B and D, and equal volume of normal saline gavage was given in group A and C for 16 weeks. After modeling, the blood samples were taken to detect systemic inflammatory indexes including white cell count of peripheral blood (WBC) and serum hypersensitive C-reactive protein (hs-CRP). Pathological section of lung tissue was made to observe the pathology and calculate pulmonary mean linear intercept (MLI) and mean alveolar number (MAN). **Results** Compared with group A and B, the airway inflammation and pathology scores, MLI, WBC of peripheral blood and serum hs-CRP levels significantly increased, while MAN significantly decreased in group C and D (all $P < 0.01$). Compared with group C, the airway inflammation and pathology scores, MLI, WBC of peripheral blood and serum hs-CRP levels significantly decreased, while MAN significantly increased in group D (all $P < 0.01$). WBC of peripheral blood and serum hs-CRP levels were positively correlated with airway inflammation and pathology scores ($r = 0.598, P < 0.01; r = 0.767, P < 0.01$), while were negatively correlated with MAN ($r = -0.657, P < 0.01; r = -0.702, P < 0.01$). **Conclusions** Simvastatin can inhibit the pulmonary and systemic inflammatory responses, reduce the degree of emphysema, thus it may delay the decline of lung functions.

Key words: Chronic obstructive pulmonary disease; Simvastatin; Systemic inflammatory response; Airway inflammation

and pathology scores; Pulmonary linear intercept; Alveolar number

慢性阻塞性肺疾病(慢阻肺)的关键特征是气道、肺实质及系统性的慢性炎症反应及进行性肺功能减退^[1]。目前糖皮质激素及支气管扩张剂仍为其主要治疗药物,但尚无有效方法抑制气道与肺实质炎症反应,延缓慢阻肺的进展。他汀类药物为羟甲基戊二酸单酰辅酶 A 还原酶抑制剂,除了有降脂作用外,更具有潜在的多效性,包括抗炎、抗氧化、抗血栓和改善血管内皮功能等。近来国内外许多学者研究发现慢阻肺患者使用他汀类药物可以获益^[2]。本研究采用香烟烟雾暴露法制备慢阻肺大鼠模型,利用辛伐他汀进行干预,探讨其对慢阻肺大鼠肺部及系统性炎症反应的影响。

1 材料与方法

1.1 动物分组及模型建立 雄性 SPF 级 Wistar 大鼠 40 只,体重(220.0 ± 7.8)g;随机均分为 4 组:正常对照组(A 组)、辛伐他汀组(B 组)、慢阻肺模型组(C 组)、辛伐他汀干预组(D 组),每组 10 只。动物提供及饲养均为中山大学动物实验中心[动物合格证号:SCXK(粤)2011-0029]。参考文献[3]自制大鼠实验性吸烟装置,将 C 组与 D 组大鼠置于 100 cm × 57 cm × 60 cm 的有机玻璃箱内,将点燃的香烟接于烟嘴上,用 60 ml 注射器连续抽吸烟雾并通过三通注入箱内,12 支/次,抽吸完后等待 30 min,2 次/d,2 次烟熏时间间隔 4 h 以上。从第 1 日开始 B 组与 D 组(烟熏前)给予辛伐他汀(5 mg/kg)灌胃 1 次,其他两组用等体积的生理盐水灌胃,共 16 周。

1.2 标本采集 造模结束后,给予 1% 戊巴比妥钠 50 mg/kg 腹腔内注射麻醉大鼠后,开胸腹,取下腔静脉血 3 ml 置于抗凝管中,1 h 内测定外周血白细胞计数(WBC),另取 5 ml 血置促凝的聚丙烯试管中,静置 30 min ~ 1 h 后 3 000 r/min 低温离心 15 min 后分离血清,吸取上部清亮的血清, -70 °C 保存待测。给予 1% 戊巴比妥钠 50 mg/kg 腹腔内注射麻醉大鼠后,开胸腹,结扎大鼠左支气管,取左肺,用冷生理盐水洗净血,吸干水分,置细胞裂解液中制成肺组织匀浆,10 000 r/min 低温离心 10 min,吸取上清液置 -70 °C 冰箱保存待测。大鼠右支气管在持续 25 cm H₂O (1 cm H₂O = 0.098 kPa)压力下注入 4% 的多聚甲醛溶液至右肺膨胀,边缘变锐,胸膜展平。结扎右支气管取右肺浸入 4% 多聚甲醛溶液中固定 24 h 以上,行 HE 染色,光镜下观察。

1.3 检测项目

1.3.1 外周血 WBC 及血清超敏 C 反应蛋白(hs-CRP)检测 WBC 计数用血细胞计数仪(美国贝克曼库尔特有限公司)测定,血清 hs-CRP 的含量采用酶联免疫分析法(ELISA 法)测定,上述 ELISA 检测试剂盒购自上海蓝基生物科技有限公司,测量数据由微机处理。

1.3.2 肺泡腔及肺泡密度病理评分标准 (1)平均肺内衬间隔(mean linear intercept, MLI):以视野正中为中心划十字交叉,计数通过该交叉线的肺泡间隔数,MLI = 十字线总长度/肺泡间隔数,其数值反映肺泡平均直径;(2)平均肺泡数(mean alveolar number, MAN):计数各视野内肺泡数,测出各视野面积,平均肺泡数 = 视野内肺泡数/各视野面积,该数值反映肺泡密度^[3]。

1.3.3 气道炎症病理学评分 选取 300 ~ 1 100 μm 的支气管,观察以下指标:(1)上皮脱落、糜烂和溃疡形成;(2)上皮杯状细胞增生肥大;(3)管壁有炎症细胞浸润,管腔有渗出;(4)管壁有淋巴小结形成;(5)支气管管腔狭窄;(6)呼吸道平滑肌增殖紊乱;(7)气管管壁结缔组织增生;(8)黏膜细胞鳞状化生;(9)管壁充血、水肿;(10)管壁色素沉积。各项指标满分为 3 分,各病理切片任意选取 3 个小气管,每项指标得分 = 总分 × 100/3。每只大鼠的病理学评分为得分和 × 100/30^[4]。

1.4 统计学处理 应用 SPSS17.0 统计软件进行分析。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示;多组样本间的比较采用单因素方差分析,两两比较用 SNK-*q* 检验;两变量间的相关性采用 Spearman 相关分析。 $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠小气道病理改变 (1)4 组 HE 染色光镜下观察:A 组和 B 组气道内上皮完整,纤毛排列整齐,无断裂、脱落,黏膜下层及肌层无炎症细胞浸润。C 组气道内黏膜上皮脱落、糜烂,纤毛倒伏,气管黏膜下层及肌层可见大量炎症细胞浸润,局部有淋巴小结形成,黏膜杯状细胞增生明显,肌层平滑肌增殖紊乱。D 组气道有不同程度的上述病理改变,但较 C 组明显减轻。见图 1。(2)4 组气道炎症病理评分:A、B、C、D 组气道炎症病理评分分别为(66.57 ± 0.70)、(66.70 ± 2.50)、(297.63 ± 2.62)和(176.80 ± 3.08)分;C 组与 D 组分别较 A、B 组明显增高(P 均 < 0.01),D 组虽有增高,但较 C 组明显减低($P <$

0.01)。

2.2 大鼠肺组织病理改变 (1)4 组肺组织病理改变: A 组和 B 组肺腺泡结构、大小正常, 肺泡腔内无渗出, 肺泡间隔未见增厚及炎症细胞浸润。C 组可见肺泡壁变薄、断裂, 肺泡融合, 腔内可见分泌物, 肺泡间隔增厚, 可见炎症细胞浸润, 肺泡周围毛细血管扩张充血。D 组上述肺泡病理改变较 C 组减轻。见图 2。
(2)4 组 MAN、MLI 比较: C 组和 D 组的 MAN 分别较 A、B 组明显减低(P 均 <0.01), MLI 则增高(P 均 <0.01); 与 C 组比较, D 组 MAN 增高($P < 0.01$), MLI 减低($P < 0.01$); A、B 两组间 MAN、MLI 无明显差异(P 均 >0.05)。见表 1。

2.3 外周血 WBC 及血清 hs-CRP 水平的比较 C 组外周血 WBC 及血清 hs-CRP 水平较 A、B、D 组均明显增高(P 均 <0.01)。D 组的血清 hs-CRP 水平较 A、B 组增高(P 均 <0.01), 但低于 C 组($P < 0.01$); D 组外周血 WBC 水平与 A、B 组间的差异无统计学意义(P 均 >0.05)。见表 2。

2.4 系统性炎症指标(WBC、hs-CRP)与慢阻肺相关参数的相关性分析 外周血 WBC、血清 hs-CRP 水平与气道炎症病理评分成正相关($r = 0.598, P < 0.01$; $r = 0.767, P < 0.01$), 与 MAN 则成负相关($r = -0.657, P < 0.01$; $r = -0.702, P < 0.01$)。见表 3。

表 1 4 组大鼠肺组织 MLI 和 MAN 比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	MLI(μm)	MAN(个/ nm^2)
A 组	10	46.76 \pm 1.24 ^{*Δ}	400.84 \pm 7.16 ^{*Δ}
B 组	10	47.55 \pm 1.09 ^{*Δ}	408.89 \pm 6.84 ^{*Δ}
C 组	10	61.69 \pm 1.29	239.57 \pm 8.25
D 组	10	53.11 \pm 1.38 [*]	338.69 \pm 12.60 [*]

注: 与 C 组比较, ^{*} $P < 0.01$; 与 D 组比较, ^{Δ} $P < 0.01$ 。

表 2 4 组大鼠血清 hs-CRP 及外周血 WBC ($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	hs-CRP(ng/ml)	WBC($\times 10^9/\text{L}$)
A 组	10	25.82 \pm 2.09 ^{*Δ}	2.95 \pm 0.21 [*]
B 组	10	24.37 \pm 1.92 ^{*Δ}	3.26 \pm 0.17 [*]
C 组	10	69.45 \pm 2.39	4.53 \pm 0.20
D 组	10	42.17 \pm 3.50 [*]	3.35 \pm 0.19 [*]

注: 与 C 组比较, ^{*} $P < 0.01$; 与 D 组比较, ^{Δ} $P < 0.01$ 。

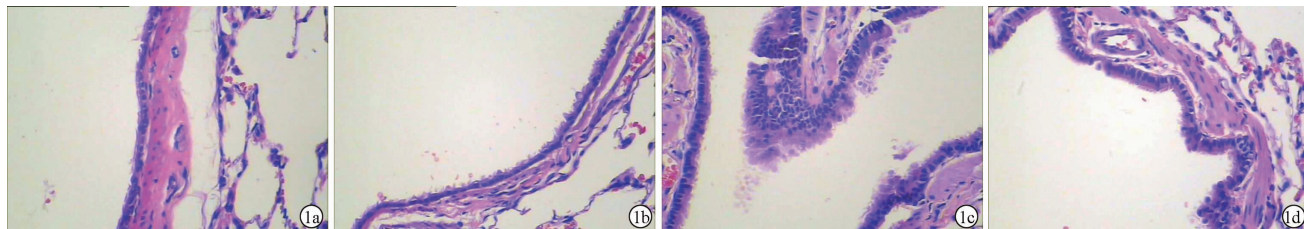
表 3 WBC、hs-CRP 水平与气道炎症病理评分及 MAN 相关分析

指标	气道炎症病理评分		MAN	
	r 值	P 值	r 值	P 值
WBC	0.598	<0.01	-0.657	<0.01
hs-CRP	0.767	<0.01	-0.702	<0.01

3 讨论

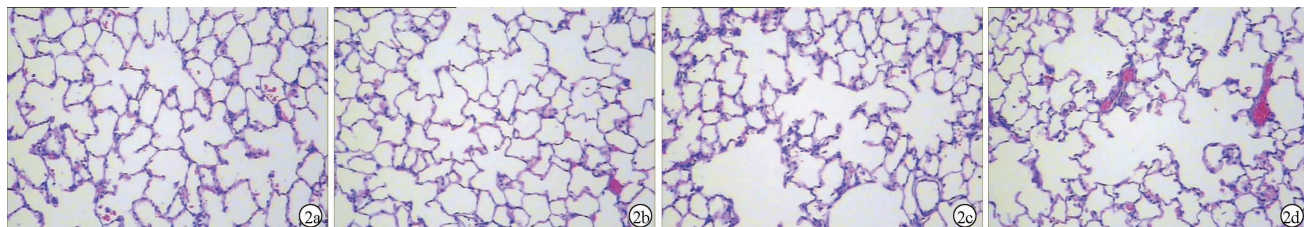
慢阻肺是一种以气流受限, 肺实质炎症和系统性炎症为主要特征性疾病, 吸烟是 COPD 的主要危险因素^[5]。故本研究采用香烟烟雾暴露的方法建立慢阻肺大鼠模型。造模结束后 C 组大鼠肺组织病理切片可见大鼠支气管黏膜部分上皮脱落、糜烂, 纤毛倒伏, 杯状细胞增生, 黏膜下层及肌层大量炎症细胞浸润, 肺泡结构破坏, 大小不一, 肺泡壁变薄、断裂, 肺泡相互融合, 肺泡间隔可见大量炎症细胞浸润, 周围毛细血管扩张、充血, 符合慢阻肺的病理特征, 提示香烟烟雾暴露法可成功建模。

虽然目前对慢阻肺的临床表现和系统合并症存在两种不同的观点: 一种观点认为系统性炎症反应是慢阻肺肺部炎症的爆发, 慢阻肺是整个过程的中心, 另一种观点认为慢阻肺是系统性炎症反应引起的多脏器病变之一^[6-7]。但近年来慢阻肺是一种慢性系



注: 1A: 正常组; 1B: 辛伐他汀组; 1C: 慢阻肺模型组; 1D: 辛伐他汀干预组。

图 1 各组大鼠气道光镜下观察(HE 染色, $\times 200$)



注: 2A: 正常组; 2B: 辛伐他汀组; 2C: 慢阻肺模型组; 2D: 辛伐他汀干预组。

图 2 各组大鼠肺组织病理改变(HE 染色, $\times 200$)

统性炎症反应性疾病的观点越来越得到大家的认可。系统性炎症也被认为是多种合并症的高危因素,包括动脉粥样硬化、恶病质、厌食、骨质疏松等,更有趣的是这些合并症都存在于慢阻肺患者中^[8]。他汀类药物为羟甲基戊二酸单酰辅酶 A 还原酶抑制剂,为临床降脂的一线药物,其主要作用机制是通过作用于甲羟戊酸通路来抑制类异戊二烯类中间产物的产生,从而减少各种炎症介质的释放^[9]。国内外均有研究表明他汀可降低慢阻肺患者血清 CRP 水平,从而减轻全身性炎症反应^[10]。

CRP 及血 WBC 均是系统炎症反应的重要指标,这些系统炎症指标是来源于肺组织还是一些合并症作用于肺部引起,目前仍不是很清楚^[8]。有研究发现慢阻肺患者血清中可见 CRP 增高,特别是感染或者急性加重时,且在轻度到中度稳定期慢阻肺患者中,血清 CRP 水平与病死率相关^[11]。hs-CRP 是对于慢阻肺能量代谢和功能能力受损、呼吸系统症状困扰的一种标志物^[12]。而本研究发现 C 组外周血 WBC 及血清 hs-CRP 水平均升高,而 D 组的血清 hs-CRP 和 WBC 则明显低于 C 组,提示他汀药物可以通过降低外周血 WBC 及血清 hs-CRP 水平来减轻系统性炎症反应。进一步数据分析可见,上述两项指标水平与气道炎症病理评分及肺气肿程度呈正相关,因此,提示辛伐他汀有可能通过减轻系统性炎症反应来减轻肺气肿程度及气道炎症反应,从而有可能延缓肺功能的下降。这一发现与 Keddissi 等^[13]的研究结果不谋而合,他们的研究指出不管是在吸烟还是已戒烟者中,他汀使用者肺功能下降较未使用者明显减低。

目前应用于临床治疗慢阻肺的药物种类很多,但迄今为止尚没有一种药物能阻断慢阻肺病情的进展、延缓肺功能逐年下降、提高远期生存率。而他汀类药物在减轻气道炎症及系统性炎症反应方面的潜在价值及其直接的抗炎作用,有望为我们提供新的药物选择。但由于目前辛伐他汀在慢阻肺临床领域的研究还较少,尤其是对慢阻肺患者远期疗效的影响,仍需大量临床研究证实。

参考文献

[1] MacNee W. Systemic inflammatory biomarkers and co-morbidities of

chronic obstructive pulmonary disease[J]. *Ann Med*, 2013, 45(3): 291-300.

- [2] Howard ML, Vincent AH. Statin Effects on Exacerbation Rates, Mortality, and Inflammatory Markers in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease: A Review of Prospective Studies[J]. *Pharmacotherapy*, 2016, 36(5): 536-547. Epub 2016 Apr 13.
- [3] 宋一平, 崔德健, 茅培英, 等. 慢性阻塞性肺疾病大鼠模型气道重塑及生长因子的研究[J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2001, 24(5): 283-287.
- [4] 夏熙郑, 巨春蓉. Smads 蛋白和转化生长因子 β_1 在大鼠慢性阻塞性肺疾病中的表达[J]. *中国呼吸与危重监护杂志*, 2006, 5(3): 193-197.
- [5] Rabe KF, Hurd S, Anzueto A, 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*, 2007, 176(6): 532-555.
- [6] Sevenoaks MJ, Stockley RA. Chronic Obstructive Pulmonary Disease, inflammation and co-morbidity-a common inflammatory phenotype? [J]. *Respir Res*, 2006, 7: 70.
- [7] Fabbri LM, Rabe KF. From COPD to chronic systemic inflammatory syndrome? [J]. *Lancet*, 2007, 370(9589): 797-799.
- [8] Agustí AG, Noguera A, Sauleda J, et al. Systemic effects of chronic obstructive pulmonary disease[J]. *Eur Respir J*, 2003, 21(2): 347-360.
- [9] Matera MG, Calzetta L, Rinaldi B, et al. Treatment of COPD: moving beyond the lungs [J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2012, 12(3): 315-322.
- [10] Kaczmarek P, Sladek K, Skucha W, et al. The influence of simvastatin on selected inflammatory markers in patients with chronic obstructive pulmonary disease[J]. *Pol Arch Med Wewn*, 2010, 120(1/2): 11-17.
- [11] Dahl M, Vestbo J, Lange P, et al. C-reactive protein as a predictor of prognosis in chronic obstructive pulmonary disease[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2007, 175(3): 250-255.
- [12] Broekhuizen R, Wouters EF, Creutzberg EC, et al. Raised CRP levels mark metabolic and functional impairment in advanced COPD[J]. *Thorax*, 2006, 61(1): 17-22.
- [13] Keddissi JI, Younis WG, Chbeir EA, et al. The use of statins and lung function in current and former smokers[J]. *Chest*, 2007, 132(6): 1764-1771.

收稿日期: 2016-03-29 修回日期: 2016-04-19 编辑: 周永彬