

雾化吸入粉防己碱对博来霉素致肺纤维化大鼠的药效作用

王翼遥, 宋 玲, 高云航, 陈腾飞, 侯红平, 彭 博, 叶祖光, 李 晗*, 张广平*

中国中医科学院中药研究所, 北京 100700

摘要: 目的 探讨雾化吸入粉防己碱对博来霉素诱导肺纤维化大鼠模型的药效作用。方法 将100只SD大鼠随机分为对照组、假手术组、模型组、粉防己碱(5 mg·mL⁻¹)雾化10、30 min(单次实际给药剂量为0.072、0.220 mg·kg⁻¹)组, 每组10只, 并采用气管注入博来霉素方法制备大鼠肺纤维化模型, 造模24 h后雾化给药。连续给药第14、28 d, 观察大鼠肺系数、肺功能, HE染色后观察肺组织病理, Masson染色后观察胶原纤维变化, 天狼星红染色检测大鼠肺组织中I型与III型胶原纤维; 并采用Western blotting检测肺组织中波形蛋白(Vimentin)、 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)和转化生长因子- β 1(TGF- β 1)表达; 酶联免疫吸附(ELISA)法检测大鼠肺组织中羟脯氨酸(HYP)和纤连蛋白(FN)含量。结果 粉防己碱雾化后中位粒径为2.98 μ m; 给药28 d时效果更优, 与模型组比较, 雾化30 min组的气道阻力显著降低($P < 0.05$), 肺顺应性显著升高($P < 0.05$), 肺系数显著降低($P < 0.05$); 肺泡炎症评分、肺纤维化评分显著降低($P < 0.05$), I型和III型胶原纤维明显减少; Vimentin和TGF- β 1的表达显著下调($P < 0.01$); 显著下调HYP和FN的水平($P < 0.05$)。结论 雾化吸入粉防己碱具有抗大鼠肺纤维化作用, 其中雾化给药28 d效果更优。

关键词: 肺纤维化; 粉防己碱; 博来霉素; 雾化; 药效学

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2023)12-2592-09

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2023.12.013

Pharmacodynamic study of atomized tetrandrine on bleomycin induced pulmonary fibrosis in rats

WANG Yiyao, SONG Ling, GAO Yunhang, CHEN Tengfei, HOU Hongping, PENG Bo, YE Zuguang, LI Han, ZHANG Guangping

Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China

Abstract: Objective To explore the pharmacological effect of atomized tetrandrine on a rat model of pulmonary fibrosis induced by bleomycin. **Methods** Totally 100 SD rats were randomly divided into blank group, sham operation group, 10 and 30 min atomization of tetrandrine (5 mg·mL⁻¹) group, with 10 rats in each group. A rat pulmonary fibrosis model was prepared by tracheal injection of bleomycin. The model was established for 24 hours and atomized, and samples were taken on the 14th and 28th days of administration. Determined the lung coefficient, lung function, lung tissue pathology, and collagen fiber changes in rats. Vimentin, α -smooth muscle actin (α -SMA) and transforming growth factors- β 1(TGF- β 1) expression in lung tissue was detected by Western blotting. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for detecting hydroxyproline (HYP) and fibronectin (FN) levels in rat lung tissue. **Results** The median particle size of powder tetrandrine after atomization is 2.98 μ m. The effect was better after 28 days of administration. Compared with the model group, the 30 min atomization of tetrandrine group showed a significant decrease in airway resistance ($P < 0.05$), a significant increase in lung compliance ($P < 0.05$), and a significant decrease in lung coefficient ($P < 0.05$). The scores of alveolar inflammation and pulmonary fibrosis were significantly reduced ($P < 0.05$), and the number of type I and III collagen fibers was significantly reduced. The expression of Vimentin and TGF- β 1 was significantly downregulated ($P < 0.01$). The levels of HYP and FN were significantly downregulated ($P < 0.05$). **Conclusion** Atomized inhalation of tetrandrine has an anti pulmonary fibrosis effect in rats, with a better effect after 28 days of administration.

收稿日期: 2023-06-19

基金项目: 国家自然科学基金青年项目(82204740); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金资助(ZXKT22045); 中国中医科学院中药研究所中药药理创新团队项目(CI2021B015); 中国中医科学院科技创新工程重大攻关项目(CI2021A04615)

第一作者: 王翼遥(2000—), 女, 中国中医科学院研究生, 从事中药药理研究。E-mail: 17861527735@163.com

*共同通信作者: 李 晗(1989—), 女, 副研究员, 硕士生导师, 主要从事中药药理研究。E-mail: wzf38@126.com

张广平(1975—), 男, 研究员, 硕士生导师, 主要从事中药药理研究。E-mail: iamzgp@163.com

Key words: pulmonary fibrosis; tetrandrine; bleomycin; atomization; pharmacodynamics

肺纤维化是由多种因素引发肺泡上皮反复修复、成纤维细胞异常增殖并大量分化为肌成纤维细胞,造成大量细胞外基质持续沉积,最终导致肺间质、肺泡结构破坏,肺功能下降的慢性、致死性肺疾病^[1-3]。随着人们医学意识的提高与医疗条件的不断改善,肺纤维化的诊断患者较之前明显增多,临床常规疗法多选用免疫抑制剂和糖皮质激素,然而治疗效果欠佳,且患者适应性差^[4]。因此,研发新的药物对于临床治疗肺纤维化具有重要的意义。

粉防己碱又称汉防己甲素,分子式为 $C_{38}H_{42}N_2O_6$,相对分子质量为622.750 00,无色针晶状物质,为粉防己主要活性成分。主要用于治疗关节炎、矽肺和肺癌等^[5-6]。本课题组前期研究发现,粉防己碱能有效抑制由转化生长因子- $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$)诱导的体外肺纤维化模型中I型胶原蛋白(Col-I)、纤连蛋白(FN)升高^[7],提示粉防己碱有治疗肺纤维化的可能性。目前粉防己碱在临床中的常用剂型主要为片剂和注射剂,但粉防己碱片生物利用度差,而注射剂长期使用会导致注射部位皮肤溃烂、血红蛋白尿以及轻度贫血等不适,限制了其在临床上的应用。而雾化吸入是目前较为流行的一种呼吸系统给药方式,相较于传统的片剂与注射剂,药物通过雾化器以雾状微粒的形式进入呼吸道,能够增加药物的靶向性并避免首关效应^[8-9]。

本研究通过气管内注射博来霉素建立大鼠肺纤维化模型,观察雾化吸入粉防己碱对肺纤维化模型大鼠的肺功能、肺系数、肺组织病理、胶原纤维和肺纤维化相关生物标志物的影响,以期粉防己碱开发和临床治疗肺纤维化提供实验基础。

1 材料

1.1 实验动物

SPF级健康SD大鼠,雄性,鼠龄8~10周,体质量180~220 g,由北京维通利华实验动物技术有限公司购进,实验动物生产许可证号SCXK(京)2021-0011。饲养于北京医疗器械研究所SPF级动物实验中心,大鼠饲养条件:12 h明暗交替、温度(23±1)℃、湿度(50±15)%、自主饮水及进食。本实验经中国中医科学院中药研究所医学伦理委员会审核通过,实验动物伦理审查编号为2022B0008。

1.2 药物和主要试剂

注射用博来霉素(瀚晖制药有限公司,批号19033911);粉防己碱注射液(江西银涛药业有限公

司,批号H20066570);BCA蛋白定量试剂盒(美国Thermo SCIENTIFIC公司,批号SK258368),Western blotting配胶试剂盒(北京康为世纪公司,批号CW0022M);一抗波形蛋白(Vimentin)抗体(英国Abcam公司,批号ab92547); α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)抗体(英国Abcam公司,批号ab32575);TGF- $\beta 1$ 抗体(英国Abcam公司,批号ab92486);二抗辣根酶标记山羊抗兔IgG抗体(北京康为世纪公司,批号A0208);大鼠羟脯氨酸(HYP)和FN酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(武汉华美生物科技有限公司,批号CSB-E08838r、CSB-E04551h);其他试剂均为国产分析纯。

1.3 主要仪器

口鼻雾化吸入装置与RC系统(美国DSI公司);Turbo BOYN雾化器(德国PARI公司);CEL-712 Microdust Pro监测仪(英国CASELLA公司);Spraytec实时喷雾粒度分析仪(英国Malvern公司);Bioprep-24生物样品均质仪(杭州奥盛仪器有限公司);Finesse 325切片机、Varistain Gemini ES染色机(美国Thermo公司);Centrifuge 5810R型台式高速离心机(德国Eppendorf公司);CKX53型倒置显微镜(日本Olympus公司);SpectraMax i3x型多标记酶标仪(美国Molecular Devices公司);Western blotting电泳槽与转膜仪(美国Bio-Rad);凝胶成像仪(美国GE公司)。

2 方法

2.1 雾化粉防己碱的粒径及浓度测定

采用马尔文帕纳科Spraytec喷雾粒度分析仪测定粉防己碱雾化粒径,将雾化装置与激光衍射仪连接,设置空压机流量 $15\text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$,采样时间5 min,持续监测粒径分布(Dv 10、Dv 50、Dv 90)和激光强度。根据公式计算实际给药剂量。

$$W=C*t*f*TV$$

C为药物平衡浓度, t 为给药时间, f 为平均呼吸频率,TV为平均潮气量

2.2 动物分组、造模与给药

100只雄性SD大鼠,检疫后备用,大鼠适应性饲养5 d后,根据体质量随机分为5组,分别为对照组、假手术组、模型组和粉防己碱雾化10、30 min组(简称雾化10、30 min组),每组20只。实验采用经典造模方式,即气管内注射博来霉素致肺纤维化^[10-11],具体方法如下:大鼠ip 1%的戊巴比妥钠,麻

醉后仰面将头部与四肢固定于鼠板上,颈部脱毛后,手术部位碘伏消毒,手术剪纵向剪开颈部皮肤,钝性分离皮下组织和肌肉,暴露气管,快速注射博来霉素溶液($2.5 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$),其中假手术组注射相同剂量的生理盐水。并继续用注射器推注 0.2 mL 空气,以使溶液到达肺部并混匀,最后缝合皮肤,待自然苏醒后常规饲养。对照组不予任何处理。造模 24 h 后采用鼻部暴露系统以雾化吸入的方式进行给药,雾化 10 min 组每只大鼠雾化吸入 $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 粉防己碱溶液,持续 10 min;雾化 30 min 组每只大鼠雾化吸入 $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 粉防己碱溶液,持续 30 min;每日 1 次,连续雾化 14、28 d。

2.3 肺功能检测

大鼠 ip 1% 的戊巴比妥钠,待大鼠麻醉后暴露气管,插入软管后将大鼠转移至 RC 系统的密闭腔体中。实时监测并记录大鼠潮气量($\text{mL} \cdot \text{kg}^{-1}$)、气道阻力(cmH_2O)及肺顺应性($\text{mL} \cdot \text{cmH}_2\text{O}^{-1}$)。

2.4 肺系数测定

待肺功能检测完成后,大鼠股动脉放血,随后打开大鼠胸腔,充分暴露并剥离左右肺组织,生理盐水清洗,滤纸拭干肺组织表面水分后称质量记录,并计算肺系数。

肺系数 = 肺脏质量/体质量

2.5 大鼠肺组织病理学观察

取左肺转移至 4% 的多聚甲醛溶液中,固定 24 h 后,进行常规脱水、石蜡包埋、切片,随后进行 HE 与 Masson 染色,光学显微镜下观察其病理形态。HE 染色用于判断肺泡炎症程度,Masson 染色用于判断肺纤维化程度,肺泡炎症及纤维化程度的半定量评分标准依照 Szapiel 和 Ashcroft^[10,12] 等方法进行。

2.6 天狼星红染色检测大鼠肺组织中 I 型与 III 型胶原纤维

取大鼠肺部石蜡切片,二甲苯脱蜡后水洗,置于 0.1% 苦味酸天狼星红染液中 1 h,流动水冲洗,置于 Harris's 苏木素染液中 5 min,乙醇脱水后进行封片,并置于偏振光显微镜下观察^[13-14]。

2.7 Western blotting 法检测肺组织中 Vimentin、 α -SMA 与 TGF- β 1 的表达

将右肺剪成 1 cm^3 左右小块放入冻存管中,于 -80°C 冰箱中保存。实验时从 -80°C 冰箱中取出右肺组织,称取肺组织 100 mg,加入蛋白裂解液后匀浆,冰上裂解 30 min,离心后提取上清,采用 BCA 法进行蛋白质含量测定,煮沸变性后蛋白经 8% SDS-

PAGE 电泳分离,将蛋白转移至 NC 膜,5% 脱脂牛奶封闭 1 h,分别孵育 Vimentin(1:500)、 α -SMA(1:1 000)、TGF- β 1(1:1 000)与 GAPDH(1:1 000)的一抗,洗膜后,孵育二抗(1:1 000),洗膜后,加入 ECL 化学发光,显影后进行图像分析。

2.8 ELISA 法检测肺组织 HYP 和 FN 的表达

蛋白提取与含量检测方法同“2.7”项,按照 ELISA 检测试剂盒说明书进行检测。

2.9 统计学方法

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 的形式表示,采用 SPSS Statistics 20 统计软件对各组数据进行统计分析,采用单因素方差分析(One-Way-Anova)进行组间比较分析。

3 结果

3.1 雾化粉防己碱的粒径及实际给药剂量

雾化粉防己碱的中位粒径为 $2.98 \mu\text{m}$,符合在下呼吸道沉积的药物粒径要求。经计算得雾化 10、30 min 组单次实际给药剂量为 0.072 、 $0.220 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。

3.2 雾化吸入粉防己碱对大鼠肺功能的影响

结果显示,给药 14 d 时,与假手术组比较,模型组大鼠的各项肺功能指标出现较为明显的改变,主要表现为潮气量及动态肺顺应性显著降低($P < 0.001$);与模型组比较,吸入雾化粉防己碱后大鼠的肺功能有所改善,其中雾化 30 min 组的肺顺应性显著升高($P < 0.05$);给药 28 d 时,与假手术组比较,模型组大鼠的肺功能指标出现明显改变,潮气量、动态肺顺应性显著降低($P < 0.01$ 、 0.001),气道阻力显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,雾化 30 min 组的气道阻力显著降低($P < 0.05$),肺顺应性显著升高($P < 0.05$)。结果见表 1。

3.3 雾化吸入粉防己碱对大鼠肺系数的影响

结果显示,给药 14、28 d 时,与假手术组比较,模型组大鼠的肺系数显著升高($P < 0.001$),与模型组比较,雾化 30 min 组的肺系数显著降低($P < 0.05$)。结果见表 2。

3.4 雾化吸入粉防己碱对大鼠肺组织病理学的影响

给药 14 d 时,HE 染色结果显示,对照组及假手术组大鼠肺组织结构正常,未见纤维组织增生,未见明显病变;模型组大鼠肺组织肺泡间隔增厚,肺泡腔内有炎性渗出,还可见泡沫细胞聚集;雾化 10 min 组大鼠肺组织有轻度炎细胞浸润,轻度肺泡壁间隔增厚;雾化 30 min 组大鼠肺组织出现轻度炎细胞浸润。肺泡炎症评分也显示,与假手术组比

表1 雾化吸入粉防己碱对大鼠肺功能的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)Table 1 Effect of atomized tetrandrine on lung function in rats ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	14 d			28 d		
		潮气量/ (mL·kg ⁻¹)	气道阻力/ cmH ₂ O	顺应性/ (mL·cmH ₂ O ⁻¹)	潮气量/ (mL·kg ⁻¹)	气道阻力/ cmH ₂ O	顺应性/ (mL·cmH ₂ O ⁻¹)
对照	—	1.99±0.27	0.60±0.06	0.29±0.06	1.06±0.04	0.69±0.11	0.24±0.09
假手术	—	1.61±0.28	0.61±0.06	0.29±0.05	1.06±0.09	0.65±0.09	0.24±0.09
模型	—	0.82±0.01***	0.77±0.23	0.13±0.03***	0.58±0.22***	1.34±0.45**	0.07±0.02**
雾化 10 min	0.072	0.88±0.16	0.76±0.14	0.18±0.08	0.60±0.11	1.24±0.33	0.09±0.06
雾化 30 min	0.220	1.09±0.20	0.66±0.13	0.25±0.05 [#]	0.74±0.17	0.88±0.06 [#]	0.14±0.03 [#]

与假手术组比较: ** $P<0.01$ *** $P<0.001$; 与模型组比较: $^{\#}P<0.05$; 1 cmH₂O=0.1 kPa** $P<0.01$ *** $P<0.001$ vs sham surgery group; $^{\#}P<0.05$ vs model group; 1 cmH₂O=0.1 kPa表2 雾化吸入粉防己碱对大鼠肺系数的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)Table 2 Effect of atomized tetrandrine on lung coefficient in rats ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	肺系数/(mg·g ⁻¹)	
		14 d	28 d
对照	—	4.88±0.33	4.05±0.49
假手术	—	4.94±0.35	4.10±0.53
模型	—	11.14±2.05***	9.09±1.52***
雾化 10 min	0.072	12.03±2.56	8.61±2.59
雾化 30 min	0.220	7.79±2.01 [#]	6.78±1.03 [#]

与假手术组比较: *** $P<0.001$; 与模型组比较: $^{\#}P<0.05$ *** $P<0.001$ vs sham surgery group; $^{\#}P<0.05$ vs model group

较,模型组评分显著升高($P<0.001$);与模型组比较,雾化10 min组的肺泡炎症评分显著降低($P<0.05$)。同时,Masson染色后,纤维组织特异性的被染色为蓝色,模型组大鼠的肺部出现明显的纤维组织增生,雾化吸入粉防己碱后大鼠肺部胶原纤维含量均低于模型组,结果见图1。

给药28 d时,HE染色结果显示,对照组及假手术组大鼠肺组织结构正常,未见纤维组织增生,未见明显病变;模型组大鼠肺组织可见炎细胞浸润,肺泡壁增厚,泡沫样细胞增生,肺脏基本结构全部破坏;雾化10 min组大鼠肺组织肺组织有轻微的炎细胞浸润和肺泡壁间隔增厚;雾化30 min组大鼠肺组织出现轻微的肺泡壁间隔增厚。肺泡炎症评分也显示,与假手术组比较,模型组评分显著升高($P<0.001$);与模型组比较,雾化30 min组的肺泡炎症评分显著降低($P<0.05$)。同时,Masson染色结果显示,与假手术组比较,模型组大鼠的肺部纤维组织明显增生,纤维化评分显著升高($P<0.001$);与模型组比较,吸入雾化粉防己碱后纤维组织增生均有不同程度的改善,其中雾化30 min组的纤维化

评分显著降低($P<0.05$)。结果见图2。

3.5 雾化吸入粉防己碱对I型和III型大鼠胶原纤维的影响

天狼星红染色显示,I型胶原纤维紧密排列,纤维较粗,并呈现较强的双折光性,黄色,而III型胶原纤维较细,呈现弱的双折光性,绿色。造模后28 d,对照组与假手术组肺泡间隔偶见微量的I与III型胶原;而在模型组中,正常的肺泡结构被破坏,大量的I型和III型胶原纤维交织在一起,并可见部分I型胶原纤维伸入至肺实质部;而雾化30 min组,胶原纤维明显减少。结果见图3。

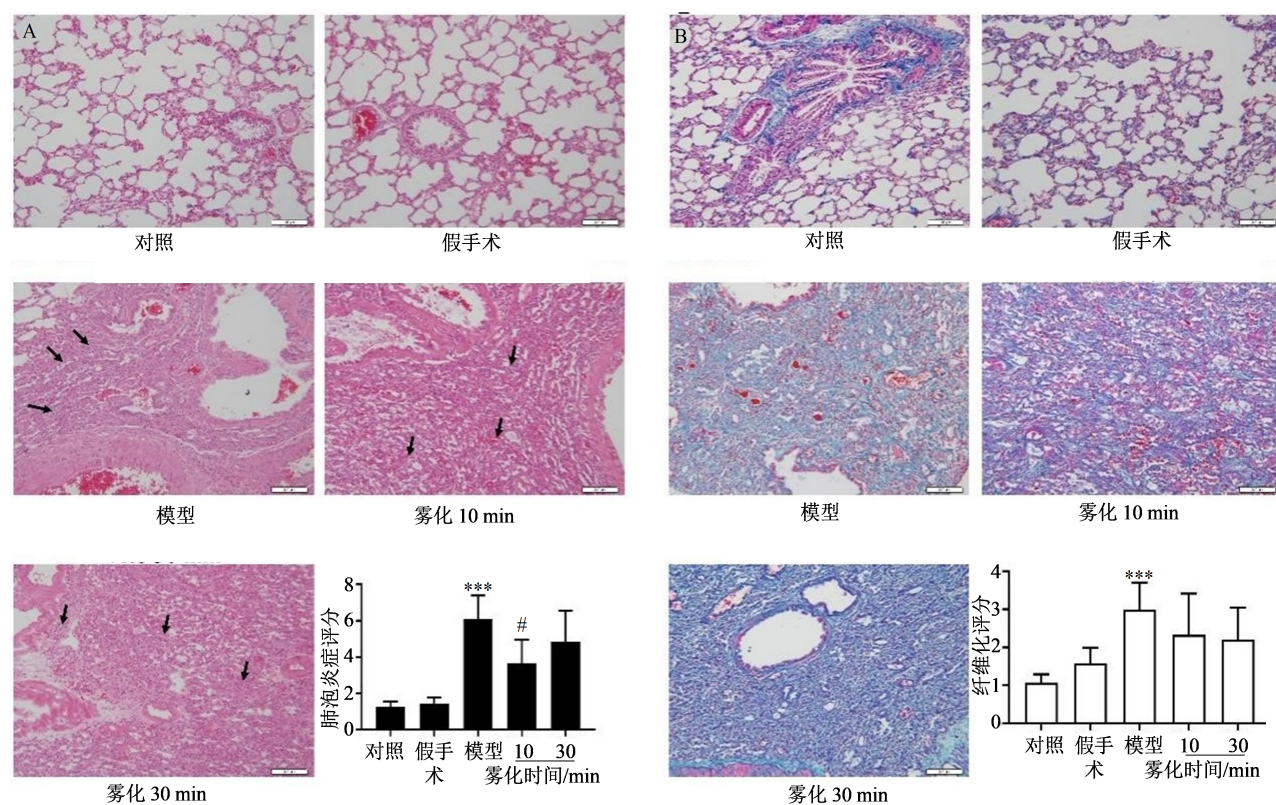
3.6 雾化吸入粉防己碱对大鼠肺组织 Vimentin、 α -SMA与TGF- β 1蛋白表达的影响

给药14 d时,与假手术组比较,博来霉素造模后能够上调大鼠肺组织中Vimentin、 α -SMA与TGF- β 1蛋白表达($P<0.05, 0.01$);与模型组比较,雾化吸入粉防己碱后,Vimentin、 α -SMA与TGF- β 1蛋白表达下降,其中雾化30 min组显著下调Vimentin和TGF- β 1的表达($P<0.05$)。结果见图4。

同时,给药28 d时,与假手术组比较,博来霉素造模后能够显著上调大鼠肺组织中Vimentin、 α -SMA与TGF- β 1蛋白表达($P<0.01, 0.001$);与模型组比较,雾化给粉防己碱后,Vimentin、 α -SMA与TGF- β 1蛋白表达下调,其中雾化30 min组显著下调Vimentin和TGF- β 1的表达($P<0.01$)。结果见图5。

3.7 雾化吸入粉防己碱对肺纤维化模型大鼠HYP和FN含量的影响

与假手术组比较,博来霉素造模28 d后可以显著提高肺组织中HYP和FN水平($P<0.01$);与模型组比较,雾化30 min组显著下调HYP和FN的水平($P<0.05$)。结果见表3。

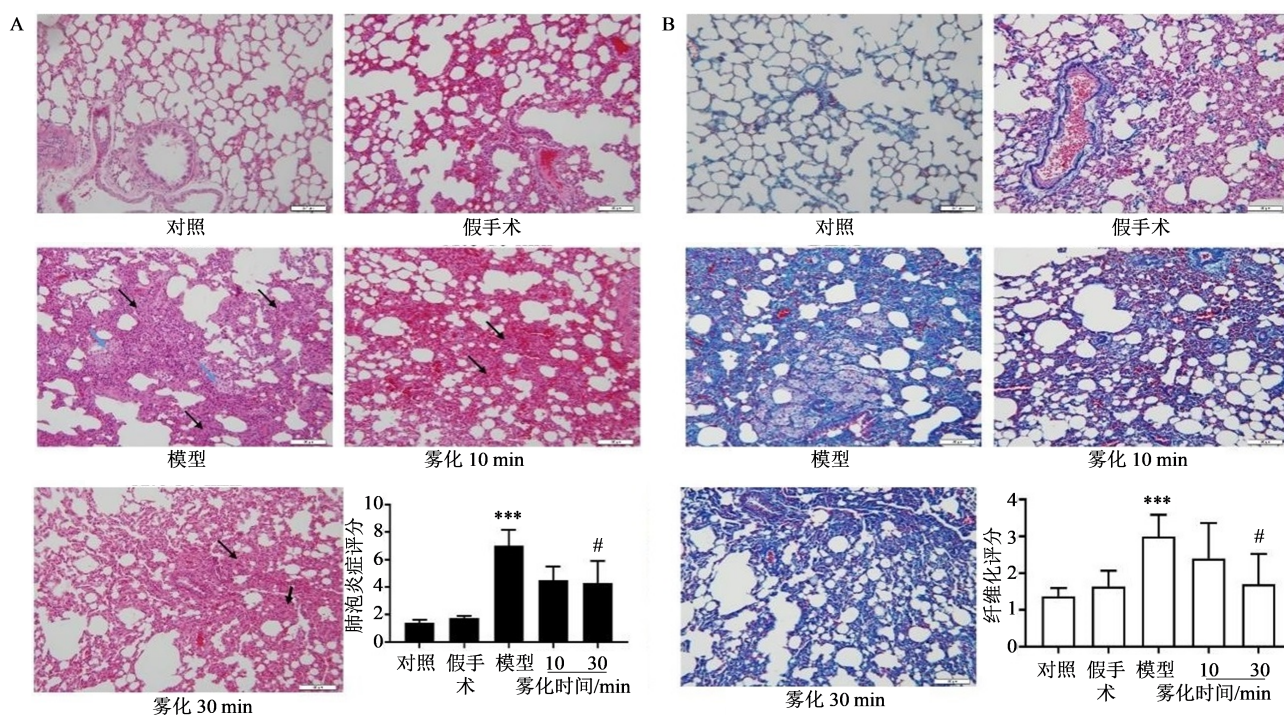


A-H-E 染色, $\times 200$; B-Masson 染色, $\times 200$; 与假手术组比较: *** $P < 0.001$; 与模型组比较: # $P < 0.05$

A-H-E stain, $\times 200$; B-Masson stain, $\times 200$; *** $P < 0.001$ vs sham surgery group; # $P < 0.05$ vs model group

图1 雾化吸入粉防己碱14 d对大鼠肺组织病理的影响

Fig. 1 Effect of inhalation of atomized tetrandrine for 14 d on lung tissue pathology in rats



A-H-E 染色, $\times 200$; B-Masson 染色, $\times 200$; 与假手术组比较: *** $P < 0.001$; 与模型组比较: # $P < 0.05$

A-H-E stain, $\times 200$; B-Masson stain, $\times 200$; *** $P < 0.001$ vs sham surgery group; # $P < 0.05$ vs model group

图2 雾化吸入粉防己碱28 d对大鼠肺组织病理的影响

Fig. 2 Effect of inhalation of atomized tetrandrine for 28 d on lung tissue pathology in rats

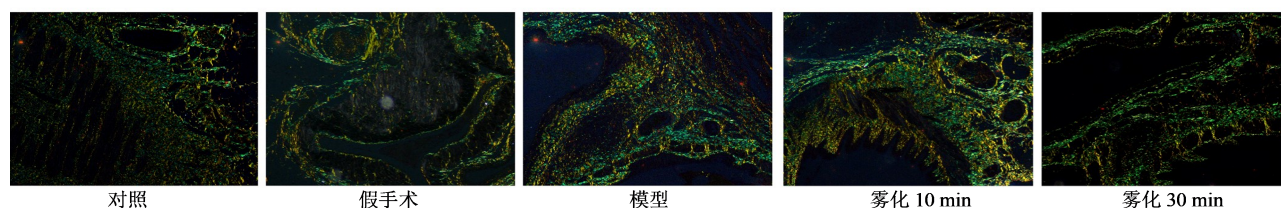
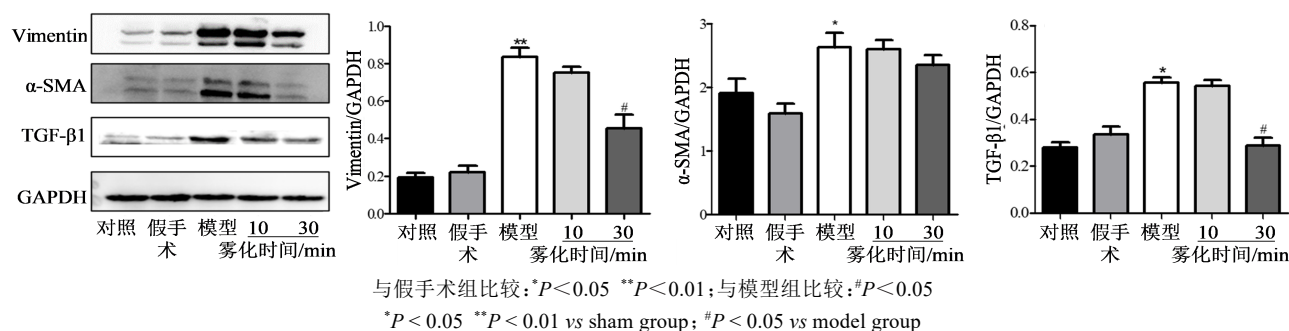
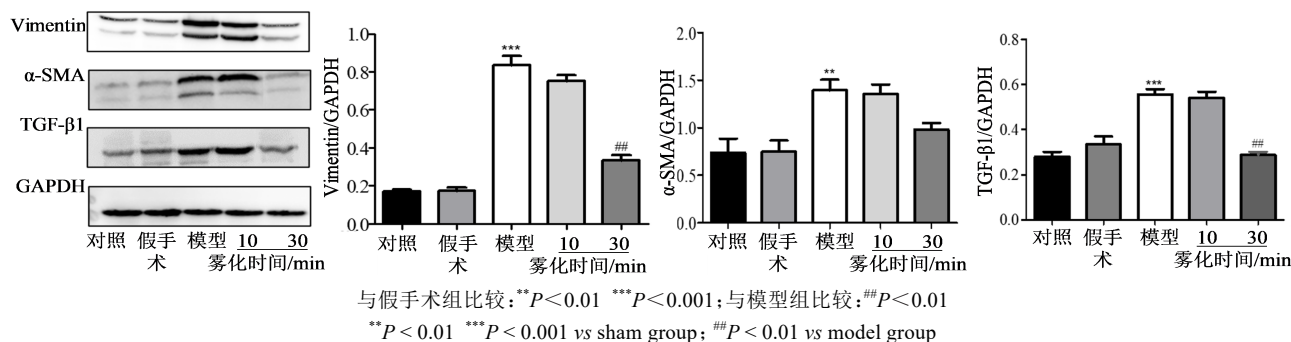


图3 雾化吸入粉防己碱对大鼠胶原纤维的影响(200×)

Fig. 3 Effect of atomized of tetrandrine on collagen fibers in rats (200×)

图4 雾化吸入粉防己碱14 d对大鼠肺组织 Vimentin、 α -SMA 与 TGF- β 1 蛋白表达的影响Fig. 4 Effect of atomized tetrandrine for 14 d on expression of Vimentin, α -SMA and TGF- β 1 protein in rat lung tissue图5 雾化吸入粉防己碱28 d对大鼠肺组织 Vimentin、 α -SMA 与 TGF- β 1 蛋白表达的影响Fig. 5 Impact of atomized inhalation of tetrandrine for 28 d on Vimentin, α -SMA and TGF- β 1 protein expression表3 雾化吸入粉防己碱对大鼠 HYP 和 FN 含量的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)Table 3 Effect of nebulized inhalation of tetrandrine on the content of HYP and FN in rats ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	HYP/(μ g·mg ⁻¹)		FN/(μ g·mg ⁻¹)	
		14 d	28 d	14 d	28 d
对照	—	0.61±0.01	0.57±0.02	7.02±0.61	6.59±0.96
假手术	—	0.51±0.02	0.62±0.01	6.81±0.72	6.68±0.87
模型	—	1.54±0.02**	1.83±0.07**	9.18±1.94*	12.52±2.84**
雾化 10 min	0.072	1.13±0.04	1.87±0.06	9.34±1.91	11.13±3.10
雾化 30 min	0.220	1.12±0.03	0.89±0.02#	9.40±0.90	8.31±1.46#

与假手术组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs sham group; # $P < 0.05$ vs model group

4 讨论

现代医学的概念中的肺纤维化是一种的慢性、进行性的肺部疾病。因为肺部气体交换依赖于上皮细胞 O₂ 和 CO₂ 有效转运,当交换功能受影响时,

患者出现低氧血症、呼吸困难、咳嗽等症状,严重时还可诱发呼吸衰竭^[15]。肺纤维化多发于老年人,目前随着老龄化程度的日益加重,近10年肺纤维化的发病率增长近1倍,约为每10万人中6.8~16.3人,确

诊后的中位存活期仅为3.8年,在我国肺纤维化患者5年病死率高达40%,死亡率高于大多数肿瘤,因此肺纤维化被称为不是癌症的癌症,严重威胁人类的健康。

中医古代文献中并无“肺纤维化”的等同描述,大多学者认为其属于“肺痹”“肺痿”等病证范畴。早在《本草品汇精要》中就记载“粉防己合葶苈子等分,为末,糯米饮调敷可治肺痿、咯血、多痰”^[16]。而粉防己碱作为其有效成分,在临床上应用于多种肺部疾病的治疗,相关文献报道显示粉防己碱具有抑制炎症反应,改善氧化应激,影响细胞凋亡,干预TGF- β 1的表达,阻止细胞外基质沉积等药理作用^[17-18]。而目前粉防己碱上市的剂型都有一定的治疗缺陷,如片剂首关效应明显,长期服用可能会引起肝脏的损伤,注射剂虽避免了胃肠循环,但对注射局部具有一定的刺激性,长期使用会造成注射部位皮肤溃烂以及轻度贫血等不适症状,患者的顺应性较差^[19-20]。

相较于口服、注射等传统给药方式,雾化吸入给药是利用仪器,如振动筛孔雾化器、超声雾化器和射流雾化器等,将药物分散在适当介质中,悬浮在气体中并递送至肺部。同时雾化吸入是以呼吸道和肺为靶器官的给药方式,药物用量少,并直达起效部位,并可避免发生肝脏首过效应,因而降低了药物的安全性风险,因此雾化吸入是治疗肺纤维化理想的给药途径^[21]。目前国内批准上市的雾化吸入制剂主要有布地奈德、沙丁胺醇、异丙托溴铵、乙酰半胱氨酸^[22]。其中布地奈德作为糖皮质激素类药物,主要针对炎症反应,可以一定程度阻碍肺纤维化进程。但其长期单独使用会产生高血压、骨质疏松以及进行呼吸功能恶化等多种不良反应^[23]。由于制备工艺以及药物安全性等原因针对性治疗肺纤维化的雾化制剂仍存在空缺。相较于布地奈德,粉防己碱作为中药粉防己的有效成分具有较长的肺部疾病治疗历史且具有多种药理作用。因此本实验通过雾化粉防己碱溶液探讨其对于抗肺纤维化的可行性。

博来霉素是一种氨基糖肽类抗生素,具有良好的抗肿瘤活性,其副作用可诱导肺泡发生炎症反应,引发肺毒性,是目前公认诱导大鼠肺纤维化模型的药物之一^[24]。大量动物实验已证明大鼠经气管内注射博来霉素后,肺部产生明显纤维化症状,与人类肺纤维化相似度极高,符合临床病理表现^[25]。本研究结果表明,气管灌注博来霉素后,大

鼠呼吸较弱,少动,精神差,毛色晦暗,爪甲及尾尖均呈现紫暗。雾化粉防己碱组大鼠的毛色有光泽,呼吸略显急促,口唇,爪甲及尾尖略紫暗,整体状态优于模型组。随着肺部纤维化的发展,大量组织液从肺毛细血管内外渗,积聚在肺泡、肺间质和细小支气管内,导致肺脏质量增加,肺系数同步上升。结果显示,模型组大鼠的肺系数显著增加,雾化30 min组的肺系数显著降低。在肺功能检测实验中,重点关注潮气量、气道阻力与动态肺顺应性等指标。其中,潮气量为大鼠平静呼吸状态下每次吸入或呼出的气量;气道阻力反映大鼠气道内单位流量所产生的压力差,此指标用于判断气道是否发生阻塞现象;肺顺应性为单位压力改变时所引起的肺容积的变化^[26-27]。本结果显示,给药14 d时,模型组大鼠的各项肺功能指标已经出现了较为明显的改变,其中潮气量及动态肺顺应性显著降低。结果显示,给药14 d时,与假手术组比较,模型组大鼠的各项肺功能指标出现较为明显的改变,主要表现为潮气量及动态肺顺应性显著升高;雾化30 min组大鼠的肺顺应性显著升高;在28 d时,模型组大鼠的潮气量、气道阻力和肺顺应性均出现明显改变,雾化30 min组气道阻力显著降低,同时肺顺应性显著升高。HE染色主要反映肺泡炎情况,Masson染色主要反映肺部纤维组织增生的程度^[28]。结果显示,造模后大鼠肺部炎细胞浸润,肺泡壁增厚,泡沫样细胞增生,肺脏基本结构全部破坏,同时肺部纤维组织明显增生,雾化30 min组肺泡炎与纤维化评分均显著降低。肺组织损伤修复过程中, α -SMA作为肌动蛋白微丝中最重要的蛋白,是(肌)成纤维细胞特异性的经典表型,该蛋白表达的多少可以反映(肌)成纤维细胞的增殖及收缩能力。Vimentin能够大量表达间质蛋白,促进细胞外基质的生成,并最终导致肺间质胶原沉积、肺泡结构破坏^[29-30]。同时,纤维化下游相关靶基因研究证实TGF- β 1是导致纤维化产生的重要因子之一^[31]。结果显示,博来霉素能够提高大鼠肺组织中Vimentin、 α -SMA与TGF- β 1蛋白含量,雾化30 min组显著性下调Vimentin和TGF- β 1含量。HYP是合成结缔组织中胶原蛋白的主要氨基酸,通过其在组织中的含量,即可直观反映出肺组织中胶原蛋白的数量^[32-33]。FN为一种二聚糖蛋白,其能够引发细胞骨架重组,进而使得趋化细胞发生迁移,导致纤维化细胞聚集^[34-36]。因此HYP与FN是判断肺纤维化程度的重要标志。实验结果显示,在28 d时,模型组可以提高肺组织中HYP与

FN 与的含量,雾化粉防己碱 30 min 组 HYP 和 FN 的含量显著下降。

肺纤维化的形成是一个复杂的过程,本研究初步探讨了雾化吸入粉防己碱抗博来霉素诱导大鼠肺纤维的可行性,该结果为指导临床用药提供了新的线索与可靠的药理学依据,但具体作用机制仍需进行进一步探讨。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Meyer K C. Pulmonary fibrosis, part I: Epidemiology, pathogenesis, and diagnosis [J]. *Expert Rev Respir Med*, 2017, 11(5): 343-359.
- [2] 林咏梅, 肖勇洪. 中医药治疗特发性肺纤维化研究进展 [J]. *世界中医药*, 2020, 15(21): 3348-3350.
Lin Y M, Xiao Y H. Advances in the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis with traditional Chinese medicine [J]. *World Chin Med*, 2020, 15(21): 3348-3350.
- [3] Thannickal V J, Zhou Y, Gaggar A, et al. Fibrosis: Ultimate and proximate causes [J]. *J Clin Invest*, 2014, 124(11): 4673-4677.
- [4] Cottin V, Crestani B, Valeyre D, et al. Diagnosis and management of idiopathic pulmonary fibrosis: French practical guidelines [J]. *Eur Respir Rev*, 2014, 23: 193-214.
- [5] 席苑, 张海静, 叶祖光, 等. 汉防己甲素现代药理作用研究进展 [J]. *中国中药杂志*, 2020, 45(1): 20-28.
Xi Y, Zhang H J, Ye Z G, et al. Research development on modern pharmacological effect of tetrandrine [J]. *China J Chin Mater Med*, 2020, 45(1): 20-28.
- [6] 曹金, 杨兆文, 李凤, 等. 汉防己甲素的临床应用进展 [J]. *世界临床药物*, 2013, 34(2): 75-79.
Cao J, Yang Z W, Li F, et al. Advances on the clinical application of tetrandrine [J]. *World Clin Drugs*, 2013, 34(2): 75-79.
- [7] 席苑, 张海静, 高云航, 等. 汉防己甲素对 TGF- β 1 诱导的 MRC-5 细胞中 Col-I 及 FN 表达的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020, 26(12): 94-99.
Xi Y, Zhang H J, Gao Y H, et al. Effect of tetrandrine on col-I and FN in TGF- β 1-induced MRC-5 cells [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*, 2020, 26(12): 94-99.
- [8] 王兆东, 邓家华, 周建平, 等. 呼吸道药物递送—雾化吸入剂的研究进展 [J]. *世界临床药物*, 2011, 32(5): 316-322.
Wang Z D, Deng J H, Zhou J P, et al. Pulmonary delivery drugs: Developments in nebulizers [J]. *World Clin Drugs*, 2011, 32(5): 316-322.
- [9] 万妮, 陈斌, 李合, 等. 肺部吸入给药系统的研究进展 [J]. *中国新药杂志*, 2021, 30(15): 1386-1395.
Wan N, Chen B, Li H, et al. Research progress in pulmonary inhalation drug delivery system [J]. *Chin J N Drugs*, 2021, 30(15): 1386-1395.
- [10] Szapiel S V, Elson N A, Fulmer J D, et al. Bleomycin-induced interstitial pulmonary disease in the nude, athymic mouse [J]. *Am Rev Respir Dis*, 1979, 120(4): 893-899.
- [11] 王鹤, 张广平, 侯红平, 等. 博来霉素不同给药方式致大鼠肺纤维化模型探讨 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2019, 25(11): 73-79.
Wang H, Zhang G P, Hou H P, et al. Effect of different administration methods with bleomycin on pulmonary fibrosis in rats [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*, 2019, 25(11): 73-79.
- [12] Mikawa K, Nishina K, Takao Y, et al. ONO-1714, a nitric oxide synthase inhibitor, attenuates endotoxin-induced acute lung injury in rabbits [J]. *Anesth Analg*, 2003, 97(6): 1751-1755.
- [13] 张艳, 陈银成. 苦味酸天狼星红对胶原纤维染色的方法 [J]. *医药论坛杂志*, 2003, 24(15): 61.
Zhang Y, Chen Y C. Method for dyeing collagen fiber with picric acid Sirius red [J]. *J Med Forum*, 2003, 24(15): 61.
- [14] 罗灿峤, 莫木琼, 钟觉民. 天狼星红苦味酸染色法和 MASSON 染色法在显示大鼠肾脏胶原纤维的比较应用 [J]. *临床医学工程*, 2009, 16(8): 15-16.
Luo C J, Mo M Q, Zhong J M. Comparative study on collagen fiber staining between Sirius red in saturated carbazotic acid staining and MASSON trichrome staining on rat kidney specimen [J]. *Clin Med Eng*, 2009, 16(8): 15-16.
- [15] Rockey D C, Bell P D, Hill J A. Fibrosis—a common pathway to organ injury and failure [J]. *N Engl J Med*, 2015, 372(12): 1138-1149.
- [16] (明)刘文泰. 本草品汇精要 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1982.
(Ming) Liu W T. *Essence of Materia Medica Collection* [M]. Beijing: People's Health Publishing House, 1982.
- [17] 梁晓飞, 王铭, 肖永红. 粉防己碱对小鼠肺成纤维细胞的凋亡及 Caspase-3 蛋白的影响 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2016, 32(6): 531-533.
Liang X F, Wang M, Xiao Y H. Effects of tetrandrine on apoptosis and Caspase-3 protein expression in mouse lung fibroblast [J]. *Chin J Clin Pharmacol*, 2016, 32(6): 531-533.
- [18] Teng G Q, Svystonyuk D, Mewhort H E, et al. Tetrandrine reverses human cardiac myofibroblast activation and myocardial fibrosis [J]. *Am J Physiol*

- Heart Circ Physiol, 2015, 308(12): H1564-H1574.
- [19] Rosenkranz H S, Klopman G. Novel structural concepts in elucidating the potential genotoxicity and carcinogenicity of tetrandrine, a traditional herbal drug [J]. *Mutat Res*, 1990, 244(4): 265-271.
- [20] 张元元, 白金, 徐明怡, 等. 汉防己甲素对矽肺大鼠治疗作用及肝肾毒性 [J]. *中国职业医学*, 2021, 48(1): 26-32. Zhang Y Y, Bai J, Xu M Y, et al. Therapeutic effect of tetrandrine on silicosis rats and its toxic effect on liver and kidney function [J]. *China Occup Med*, 2021, 48(1): 26-32.
- [21] 郑淇文, 陈桂良, 王健. 吸入制剂雾化技术概述 [J]. *中国医药工业杂志*, 2022, 53(4): 425-438. Zheng Q W, Chen G L, Wang J. An overview of nebulization techniques for inhalation preparations [J]. *Chin J Pharm*, 2022, 53(4): 425-438.
- [22] 杜光, 赵杰, 卜书红, 等. 雾化吸入疗法合理用药专家共识(2019年版) [J]. *医药导报*, 2019, 38(2): 135-146. Du G, Zhao J, Bu S H, et al. Expert consensus on rational drug use in aerosol inhalation therapy (2019 edition) [J]. *Her Med*, 2019, 38(2): 135-146.
- [23] 刘小寒. 雾化吸入布地奈德雾化混悬液治疗特发性肺间质纤维化的临床疗效分析 [J]. *中国医药指南*, 2019, 17(7): 66. Liu X H. Clinical efficacy analysis of budesonide aerosol suspension in the treatment of idiopathic pulmonary interstitial fibrosis [J]. *Guide China Med*, 2019, 17(7): 66.
- [24] 燕苗苗, 赵亚昆, 王搏, 等. 博来霉素诱导大鼠与小鼠肺纤维化模型的评价 [J]. *中国实验动物学报*, 2023, 31(2): 179-186. Yan M M, Zhao Y K, Wang B, et al. Comparison and evaluation of different doses of bleomycin-induced pulmonary fibrosis models in mice and rats [J]. *Acta Lab Animalis Sci Sin*, 2023, 31(2): 179-186.
- [25] 陈广瑞, 李俭, 梁笛, 等. 肺纤维化大鼠模型造模方法的优化 [J]. *中国实验动物学报*, 2023, 31(2): 201-207. Chen G R, Li J, Liang D, et al. Optimization of modeling method for pulmonary fibrosis rat model [J]. *Acta Lab Animalis Sci Sin*, 2023, 31(2): 201-207.
- [26] Chua F, Gaudie J, Laurent G J. Pulmonary fibrosis [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2005, 33(1): 9-13.
- [27] 袁菊萍. 宣肺活血汤对内毒素性肺损伤大鼠模型肺功能的保护作用 [J]. *四川中医*, 2019, 37(10): 37-40. Yuan J P. Protective effect of Xuanfei Huoxue Decoction on lung function for model rats with endotoxin-induced lung injury [J]. *J Sichuan Tradit Chin Med*, 2019, 37(10): 37-40.
- [28] 崔雪梅, 宋良文, 王德文. 天狼星红染色法结合图像分析在放射性肺纤维化研究中的应用 [J]. *中国体视学与图像分析*, 1997, 2(1): 49-52. Cui X M, Song L W, Wang D W. Application of Sirius red stain combined with image pattern analysis in radiation pulmonary fibrosis [J]. *Chin J Stereol Image Anal*, 1997, 2(1): 49-52.
- [29] Bartis D, Mise N, Mahida R Y, et al. Epithelial-mesenchymal transition in lung development and disease: Does it exist and is it important? [J]. *Thorax*, 2014, 69(8): 760-765.
- [30] Horowitz J C, Thannickal V J. Epithelial-mesenchymal interactions in pulmonary fibrosis [J]. *Semin Respir Crit Care Med*, 2006, 27(6): 600-612.
- [31] Wei Y, Kim T J, Peng D H, et al. Fibroblast-specific inhibition of TGF- β 1 signaling attenuates lung and tumor fibrosis [J]. *J Clin Invest*, 2017, 127(10): 3675-3688.
- [32] Karsdal M A, Genovese F, Madsen E A, et al. Collagen and tissue turnover as a function of age: Implications for fibrosis [J]. *J Hepatol*, 2016, 64(1): 103-109.
- [33] 苏凤哲, 刘晓, 于文涛. 补肾通络方对肺纤维化大鼠结缔组织生长因子表达的影响 [J]. *世界中医药*, 2019, 14(9): 2285-2289. Su F Z, Liu X, Yu W T. Effect of Bushen Tongluo prescription on the expression of connective tissue growth factor in pulmonary fibrosis rats [J]. *World Chin Med*, 2019, 14(9): 2285-2289.
- [34] Kim K K, Kugler M C, Wolters P J, et al. Alveolar epithelial cell mesenchymal transition develops *in vivo* during pulmonary fibrosis and is regulated by the extracellular matrix [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103(35): 13180-13185.
- [35] Kulkarni T, O'Reilly P, Antony V B, et al. Matrix remodeling in pulmonary fibrosis and emphysema [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2016, 54(6): 751-760.
- [36] Kalluri R, Neilson E G. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis [J]. *J Clin Invest*, 2003, 112(12): 1776-1784.

【责任编辑 兰新新】