

· 药理 ·

参莲方对颗粒物暴露致大鼠急性肺损伤的保护作用

杨源民¹, 瞿水清¹, 陈利娜^{1,3}, 邓硕秋¹, 张雨¹, 郑钟原^{1,3}, 朱晓新¹, 李宇翔^{2*}, 李玉洁^{1*}
(1. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700; 2. 中国中医科学院 望京医院, 北京 100102;
3. 中国中医科学院 青蒿素研究中心, 北京 100700)

[摘要] 目的: 观察参莲方对颗粒物(PM)暴露致大鼠急性肺损伤的保护作用并初步探究其保护机制。方法: 雄性SD大鼠50只, 随机分为正常组、模型组、参莲方低、高剂量组(4.32、8.64 g·kg⁻¹)、罗氟斯特组(3.46 mg·kg⁻¹), 每组10只。预给药灌胃1周后, 于第8天和第11天除正常组滴注生理盐水外, 其余组气管滴注PM混悬液建立PM暴露致大鼠急性肺损伤模型。造模后继续给药至实验结束。末次染毒48 h后检测大鼠肺功能。随后处死大鼠, 观察肺部形态学变化, 苏木素-伊红(HE)染色检测肺组织病理变化; 免疫组化观察肺部CD68表达; 酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测血清肺损伤标志物肺表面活性物质A(SP-A)、克拉氏细胞分泌蛋白16(CC16)水平; 实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测肺组织炎症因子白细胞介素-1α(IL-1α)、IL-6、IL-18和单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1) mRNA表达。结果: 与正常组比较, 模型组大鼠肺功能下降, 肺组织出现明显组织结构损伤, 并有明显的PM沉积和CD68阳性细胞浸润, 肺组织炎症因子IL-1α、IL-6、IL-18、MCP-1 mRNA表达显著升高(P<0.01); 与模型组比较, 参莲方各给药组大鼠肺功能指标改善(P<0.05, P<0.01), 肺组织形态学改善, PM沉积减少, 组织病理结构改善, CD68阳性细胞浸润未显著减少, 炎症因子IL-1α、IL-6、IL-18、MCP-1 mRNA水平显著降低(P<0.01)。结论: 参莲方可保护PM暴露造成的大鼠肺损伤, 改善组织形态, 减少肺部PM沉积, 减少炎症因子表达。

[关键词] 参莲方; 空气污染; 颗粒物; 肺损伤; 炎症反应

[中图分类号] R2-0; R22; R285.5; R289; R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)20-0037-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20221405

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220713.1341.001.html>

[网络出版日期] 2022-07-13 17:42

Protective Effect of Shenlian Prescription on Acute Lung Injury Induced by Particulate Matter Exposure in Rats

YANG Yuanmin¹, QU Shuiqing¹, CHEN Lina^{1,3}, DENG Shuoqi¹, ZHANG Yu¹, ZHENG Zhongyuan^{1,3},
ZHU Xiaoxin¹, LI Yuxiang^{2*}, LI Yujie^{1*}

(1. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China; 2. Wangjing Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100102, China; 3. Artemisinin Research Center, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the protective effect of Shenlian prescription on acute lung injury induced by particulate matter (PM) exposure in rats and explore the mechanism. **Method:** Fifty male SD rats were randomly divided into the control group, model group, Shenlian low-dose group (4.32 g·kg⁻¹), Shenlian high-dose group (8.64 g·kg⁻¹), and roflumilast group (3.46 mg·kg⁻¹), with 10 in each group. Pre-administration

[收稿日期] 2022-03-25

[基金项目] 中国中医科学院科技创新工程项目(CI2021B015); 中国中医科学院科技创新工程项目(CI2021A04611, CI2021A05106); 中央公益性科研院所基础研究基金项目(ZZ13-YQ-100)

[第一作者] 杨源民, 在读硕士, 从事心血管疾病药理研究, E-mail: lemone626@163.com

[通信作者] * 李宇翔, 硕士, 主治医师, 从事泌尿外科学研究, Tel: 010-84739091, E-mail: xxwz123@126.com;

* 李玉洁, 博士, 研究员, 从事心血管疾病药理研究, Tel: 010-64012656, E-mail: yjli@icmm.ac.cn

with drugs by gavage was performed for one week. On the 8th and 11th days, the control group was instilled with normal saline in the trachea and the other groups with PM suspension to establish a rat model of acute lung injury induced by PM exposure. After modeling, drugs were given continuously until the end of the experiment. Forty-eight hours after the last exposure, the lung function of rats was detected. Then the rats were sacrificed and the lung morphological changes and pathological changes by hematoxylin-eosin (HE) staining were observed. CD68 expression in lung was detected by immunohistochemistry, and the levels of lung injury markers surfactant protein A (SP-A) and Clara cell protein16 (CC16) in serum were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The mRNA expression of interleukin-1 α (IL-1 α), IL-6, IL-18, and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in lung tissue was measured by Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR). **Result:** Compared with those in the control group, the rats in the model group had decreased lung function and obvious structural damage of lung tissue, PM deposition, and infiltration of CD68 positive cells. The expressions of IL-1 α , IL-6, IL-18, and MCP-1 in lung tissue were increased ($P<0.01$). Compared with the model group, Shenlian prescription low and high doses restored the rats' lung function injury ($P<0.05$, $P<0.01$), improved lung morphological and pathological structure, and reduced PM deposition. Infiltration of CD68 positive cells in lung was not significantly decreased. The levels of inflammatory factors IL-1 α , IL-6, IL-18, and MCP-1 in lung were lowered ($P<0.01$). **Conclusion:** Shenlian prescription could protect the rats' lung injury caused by PM exposure, improve lung morphology, and reduce PM deposition and inflammatory factor expression.

[Keywords] Shenlian prescription; air pollution; particulate matter; lung injury; inflammation

随着工业化发展,空气污染对人类健康造成了越来越大的威胁。空气污染物是全世界死亡率的第四大主要危险因素^[1],世界卫生组织最新数据显示,全世界每年约有700万人死于空气污染^[2]。其中颗粒物(PM)是空气污染物的主要组成之一,是由悬浮在空气中有机、无机颗粒或液体组成的复杂混合物。PM进入人体首先直接接触呼吸系统。流行病学报告指出暴露于颗粒物会显著升高诸多呼吸系统疾病风险,如哮喘、支气管炎、肺气肿、慢性阻塞性肺病、肺癌等^[3]。但PM致病机制复杂,相关药物的研究尚处于起步阶段。

邓铁涛教授认为雾霾为邪毒,具有湿性、燥性、热性之特点,雾霾致肺损伤本质是毒、热、痰、瘀互结于肺部,故应清热解毒、化痰祛瘀^[4]。参莲方是根据中医临床经验并融合组分配伍的理念,以清热解毒、活血化瘀为法,用于防治动脉粥样硬化性疾病的复方制剂^[5]。研究表明,参莲方具有良好的抗炎作用,可降低血清和组织炎症因子水平,抑制肥大细胞脱颗粒,抑制巨噬细胞极化和炎症因子分泌^[5-7]。有趣的是,在前期研究中参莲方被观察到对PM刺激造成的RAW264.7细胞损伤具有显著的保护作用^[8],提示其可用于PM暴露促发的相关疾病的治疗。因此本研究在此基础上,利用大鼠PM肺部急性暴露模型,进一步验证参莲方对PM暴露致

大鼠肺损伤保护作用,从而为临床防治PM暴露促发的相关疾病提供参考。

1 材料

1.1 动物 SPF级雄性SD大鼠50只,体质量180~200 g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,实验动物合格证号SCXK(京)2016-0011。在SPF级条件下饲养管理,温度(22 \pm 1) °C,相对湿度40%~60%,12h明暗循环照明,自由饮水,适应性饲养1周。本研究所有动物实验相关操作均在中国中医科学院动物伦理委员会的批准下进行,动物实验伦理审查表编号2020B051。

1.2 药物 参莲方采用醇提取、大孔树脂富集纯化的方法制备提取物,由中国中医科学院中药研究所化学室刘淑芝研究员鉴定并提供(批号201609);其中含丹参酮II_A 2.04%、丹酚酸B 29.29%、穿心莲内酯12.61%^[9];罗氟斯特(Roflumilast,购自上海麦克林生化科技有限公司,货号R823023-500mg,批号C10287784)。

1.3 颗粒物 使用柴油机颗粒物标准品Disel Particulate Matter SRM1650b,直径<0.1 μ m,购自美国国家标准技术研究院(National Institute of Standards and Technology)。

1.4 仪器 气道阻力和肺顺应性有创检测系统、小动物无创式肺功能检测系统(法国Emka

Technologies公司),KQ-500DE型数控超声器(昆山市超声仪器有限公司),qTower-3G型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪(德国Analytikjena公司),RM2245型半自动石蜡切片机、AsP200S型全自动脱水机(德国Leica公司),DeNovix DS-11型超微量紫外-可见分光光度计(美国Nanodrop公司),Nikon Eclipse E100型正置光学显微镜、Nikon DS-U3型显微成像系统(日本尼康公司)。

1.5 试剂 苏木素-伊红(HE)染液套装(武汉Servicebio公司,批号G1003),肺表面活性物质A(SP-A)、克拉氏细胞分泌蛋白16(CC16)酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒(武汉华美生物工程有限公司,批号分别为W0732443、W0632440),CD68兔单克隆抗体(英国Abcam公司,批号ab213363),山羊抗兔免疫球蛋白Ig(G)二抗(美国Cell Signaling Technology公司,批号28),TRIzol(美国Ambion公司,批号343908),第一代逆转录预混液RT-Mix(北京金普来生物科技有限公司,批号GPL001N),SYBR Green Real-time PCR Mix(北京金普来生物科技有限公司,批号07001)。

2 方法

2.1 动物分组与模型建立 将大鼠随机分为正常组(Control组)、模型组(PM组)、参莲方低剂量组(SLL组)、参莲高剂量组(SLH组)、阳性药罗氟斯特组(Roflumilast组),每组10只。适应性喂养7 d后,Control组和PM组灌胃1%羧甲基纤维素钠(CMC-Na),SLL组灌胃低剂量参莲提取物($4.32 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$,临床等效剂量2倍),SLH组灌胃高剂量参莲提取物($8.64 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$,临床等效剂量4倍),Roflumilast组灌胃罗氟司特($3.46 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)^[10-11],预给药1周并持续给药至实验结束。在给药后第8天和第11天对PM组、SLL组、SLH组、Roflumilast组气管滴注PM混悬液染毒,Control组气管滴注生理盐水作为对照。

2.2 PM混悬液制备 称取颗粒物20 mg,加入生理盐水20 mL,配制终质量浓度 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ PM混悬液,经超声处理3~5 h后置于 $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 待用,用时涡旋震荡混匀。

2.3 大鼠PM急性肺部暴露模型建立 于第8天和第11天气管滴注PM混悬液进行肺部暴露PM,每只大鼠PM暴露量为 $200 \mu\text{g}$ ^[12]。将SD大鼠称体质量后腹腔注射3.5%水合氯醛($10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$)麻醉,使其仰卧于鼠板上,固定四肢及头部,使鼠板呈 45° ~

60° 。用透射光源直射大鼠气管部位。将大鼠舌头拉出,从口中可以看到一光源透射形成的红色亮点,即为气管口。眼睛平视该亮点,将套管伸入大鼠口腔,趁大鼠吸气会厌张开的时候,把套管针插进去,将针拔出,留套管。用小镊子夹取一丝棉花置于套管口,若棉花随大鼠呼吸吹动,则证明插管成功。验证插管成功后,用移液枪吸取PM混悬液0.2 mL,沿套管缓慢滴注,滴注完毕后用棉棒清理大鼠口腔,将鼠放回鼠笼,等待大鼠苏醒。

2.4 肺功能检测 末次染毒后次日,使用肺功能检测系统检测大鼠肺功能。用3.5%水合氯醛腹腔注射麻醉大鼠,切开颈部皮肤暴露气管并插管后,将大鼠置于肺功能仪内,连接导管,给予呼吸机通气,检测肺功能指标:潮气量(TV)、总气道阻力(RL)、肺动态顺应性(Cdyn)、肺最大通气量(MV)。

2.5 肺组织形态学观察 各组大鼠肺功能测定完毕后,固定大鼠,移除胸部皮肤及胸骨、部分肋骨,充分暴露肺脏。将大鼠肺部连同气道完整取出,用生理盐水轻柔冲洗残留瘀血,观察大鼠完整肺组织的外观及质地变化。

2.6 肺组织病理学观察 取左肺上叶,10%多聚甲醛固定。石蜡包埋后切片 $5 \mu\text{m}$,进行HE染色,光学显微镜下观察肺组织结构变化和炎症浸润。

2.7 血清肺损伤标志物检测 将大鼠麻醉后,腹主动脉取血。ELISA检测肺损伤标志物SP-A、CC16水平。

2.8 免疫组织化学检测肺CD68表达 将石蜡切片脱蜡复水,枸橼酸中加热修复抗原,3%过氧化氢阻断内源性过氧化物酶,3%山羊血清封闭;滴加1:200稀释的一抗 $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 湿盒孵育过夜,随后滴加1:200稀释的二抗孵育50 min,DAB显色后苏木素复染细胞核,梯度脱水后中性树脂封片。光学显微镜下采集图像分析。

2.9 Real-time PCR检测肺组织白细胞介素-1 α (IL-1 α)、IL-6、IL-18、单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)的表达水平 1%DEPC水清洗器具。取肺组织约100 mg,剪刀剪碎,使用研磨棒,滴加液氮低温研磨,用TRIzol提取总mRNA。微核酸分析仪测定提取总RNA的浓度和纯度。反转录为cDNA后,利用Real-time PCR仪对cDNA进行扩增和实时荧光强度检测($95 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性30 s,1循环;PCR反应 $95 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 、10 s, $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 、30 s,40循环;溶解曲线分析采用机器默认程序)。以 β -actin内参进行相对定量。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算大鼠心肌组织IL-1 α 、IL-6、IL-18、MCP-1

mRNA的相对表达量。大鼠引物序列由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。引物序列见表1。

表1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物	序列上游(5'-3')	序列下游(5'-3')	扩增长度/bp
IL-1 α	CCATCCAACCCAGATCAGCA	TCTCCTCCCGATGAGTAGGC	208
IL-6	TTGCCCTTCTGGGACTGATG	ACTGGTCTGTGTGGGTGGT	100
IL-18	GCCATGTCAGAAGAAGGCTCT	TGCTCCGTATTACTGCGGTT	145
MCP-1	GATCCCAATGAGTCGGCTGG	ACAGAAGTGCTTGAGGTGGTT	294
β -actin	CCGCGAGTACAACCTTCTTG	CAGTTGGTGACAATGCCGTG	297

2.10 统计学分析 使用GraphPad Prism 8软件,数据计算表示为 $\bar{x}\pm s$,对数据进行单因素方差分析(ANOVA), $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对细颗粒物引发的肺损伤大鼠的肺功能的影响 与Control组比较,PM组大鼠TV显著降低,RL

显著升高,Cdyn出现应激性显著升高,MV显著降低($P<0.01$)。与PM组比较,SLL组和SLH组大鼠TV明显升高($P<0.05$);RL和Cdyn显著降低($P<0.01$),MV明显升高($P<0.05$)。Roflumilast组Cdyn显著降低($P<0.01$),TV、RL和MV改善差异无统计学意义。见表2。

表2 参莲方对细颗粒物诱发肺损伤大鼠的肺功能的影响($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 2 Effect of Shenlian prescription on lung function in rats with lung injury caused by fine particulate matter ($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	TV/mL	RL/kPa·s·mL ⁻¹	Cdyn/mL·kPa ⁻¹	MV/mL·min ⁻¹
Control组		2.67±0.05	0.033±0.005	0.038±0.005	239.27±7.36
PM组		2.50±0.22 ¹⁾	0.048±0.007 ¹⁾	0.053±0.010 ¹⁾	215.15±37.15 ¹⁾
SLL组	4.32	2.61±0.02 ²⁾	0.038±0.006 ³⁾	0.037±0.006 ³⁾	235.33±4.10 ²⁾
SLH组	8.64	2.62±0.06 ²⁾	0.038±0.005 ³⁾	0.037±0.006 ³⁾	233.71±7.04 ²⁾
Roflumilast组	3.46×10 ⁻³	2.54±0.06	0.046±0.007	0.041±0.007 ³⁾	227.53±9.20

注:与Control组比较¹⁾ $P<0.01$;与PM组比较²⁾ $P<0.05$,³⁾ $P<0.01$

3.2 对细颗粒物引发的肺损伤大鼠肺组织形态学的影响 肺组织形态学观察发现,Control组肺大体无异常改变,颜色粉嫩,表面光滑,无皱缩或水肿现象;PM组大鼠肺则可见明显黑色颗粒物沉积,颜色苍白,表面有大小不等暗红色出血点,表面有皱缩塌陷,质地僵硬;SML和SMH组中大鼠肺组织黑色颗粒沉积的现象得到明显改善,出血和塌陷症状得到一定改善,质地较为柔软,两剂量组之间差别无统计学意义。Roflumilast组仍可见部分PM沉积,但相对PM组有明显改善,组织质地改善。结果表明参莲方能明显改善PM诱发的肺大体损伤。见图1。

3.3 对细颗粒物引发的肺损伤大鼠模型肺组织病理变化的影响 Control组肺泡结构正常,气道上皮结构完整,肺泡壁薄,无充血、水肿以及炎症浸润。PM组可见明显气道上皮增厚,肺泡壁增厚,并伴有大量中性粒细胞、淋巴细胞浸润;肺泡间隔中大量巨噬细胞浸润;较多支气管管腔内可见嗜酸性黏液分泌;此外可见出血位点。SLL组中,肺泡壁增厚、

巨噬细胞浸润、颗粒物沉积及出血等病理改变均有一定改善,但依然有轻微嗜酸性黏液分泌。SLH组和Roflumilast组大鼠肺气道上皮结构完整性、颗粒物沉积、肺泡结构及炎症细胞浸润情况均有明显改善,伴有轻微的出血。见图2。

3.4 对细颗粒物引发的肺损伤大鼠血清肺损伤标志物蛋白SP-A、CC16蛋白表达的影响 与Control组比较,PM组SP-A、CC16蛋白水平显著降低($P<0.01$)。与PM组比较,给药后SLL组SP-A水平明显降低($P<0.05$),CC16水平变化差异无统计学意义。此外未观察到Roflumilast组大鼠血清中SP-A和CC-16水平回调。见表3。

3.5 对细颗粒物引发的肺损伤大鼠肺组织CD68阳性细胞浸润的影响 免疫组织化学染色显示,PM组肺部组织CD68阳性细胞浸润数较Control组显著增加,并可见黑色颗粒物沉积,部分巨噬细胞内含黑色颗粒物质。SLL组和SLH组以及Roflumilast组CD68阳性细胞浸润无明显减少,但颗粒沉积现象有明显改善。见图3。



注：A. Control组；B. PM组；C. SLL组；D. SLH组；E. Roflumilast组(图2和图3同)

图1 参莲方对各组肺组织形态学的影响

Fig. 1 Comparison of histomorphology of lung in various groups

3.6 对细颗粒物引发的肺损伤大鼠肺组织炎症因子IL-1 α 、IL-6、IL-18、MCP-1 mRNA表达的影响

与Control组比较,PM组IL-1 α 、IL-6、IL-18和MCP-1 mRNA表达量均显著升高($P<0.01$);与PM组比较,SLL组、SLH组和Roflumilast组IL-1 α 、

表4 参莲方对肺组织炎症因子IL-6、MCP-1、IL-1 α 、IL-18 mRNA表达的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	IL-6	MCP-1	IL-1 α	IL-18
Control组		0.90±0.13	1.00±0.10	1.01±0.17	1.00±0.12
PM组		1.98±0.16 ¹⁾	2.74±0.24 ¹⁾	1.51±0.28 ¹⁾	1.32±0.02 ¹⁾
SLL组	4.32	1.24±0.00 ²⁾	1.31±0.07 ²⁾	0.10±0.02 ²⁾	0.72±0.06 ²⁾
SLH组	8.64	0.69±0.14 ²⁾	0.31±0.00 ²⁾	0.12±0.02 ²⁾	0.12±0.00 ²⁾
Roflumilast组	3.46×10 ⁻³	0.67±0.04 ²⁾	1.20±0.03 ²⁾	0.28±0.12 ²⁾	0.52±0.02 ²⁾

注:与Control组比较¹⁾ $P<0.01$;与PM组比较²⁾ $P<0.01$

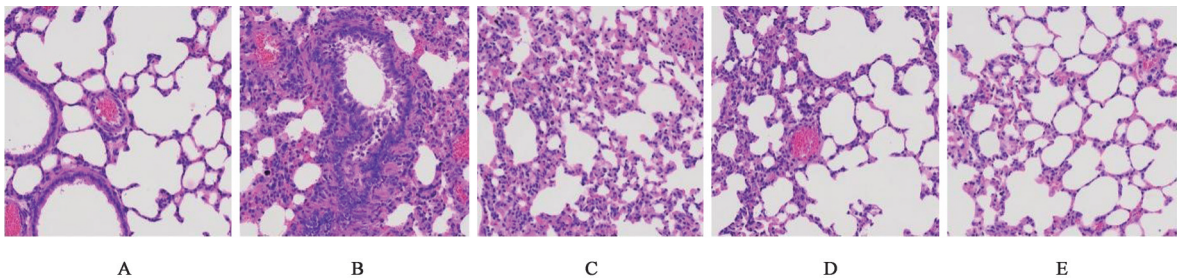


图2 参莲方对肺组织病理变化的影响(HE,×200)

Fig. 2 Effect of Shenlian prescription on pathological changes in lung tissue (HE, ×200)

表3 参莲方对血清中肺损伤标志物SP-A、CC16水平的影响($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 3 Effects of Shenlian prescription on levels of SP-A and CC16 in serum ($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	SP-A	CC16
Control组		123.52±6.13	122.50±7.42
PM组		112.07±5.81 ¹⁾	108.26±8.82 ¹⁾
SLL组	4.32	119.30±6.17 ²⁾	105.19±10.06
SLH组	8.64	118.82±5.42	101.28±7.86
Roflumilast组	3.46×10 ⁻³	117.55±5.17	110.58±7.74

注:与Control组比较¹⁾ $P<0.01$;与PM组比较²⁾ $P<0.05$

IL-6、IL-18和MCP-1 mRNA水平均显著降低($P<0.01$)。见表4。

4 讨论

随着工业化发展,化石燃料使用、汽车尾气排放等产生大量PM。空气中PM成分主要有硝酸盐、硫酸盐、碳颗粒、有机化合物(如多环芳烃)、生物化合物(如内毒素、细胞碎片)、金属(如铁、铜、镍、锌和钒)等,但其组成并不固定,会受地域以及季节影响;此外PM大小也不固定,从几纳米到几十微米不等,较大的颗粒如PM₁₀会优先沉积到上部和较大的气道中,更小的颗粒如PM_{2.5}则可以穿过肺泡-毛细血管扩散至体循环^[13]。本实验在权衡后采用柴油机颗粒物标准品,避免了空气中收集PM组成不固定,实验重复性差的问题。此外,此种PM成分主要是多环芳烃和硝基多环芳烃,对汽车尾气、有机物

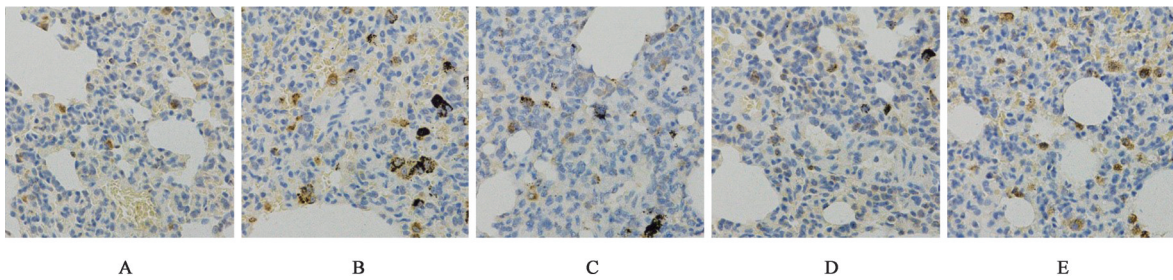


图3 参莲方对肺组织CD68阳性细胞浸润的影响(免疫组化,×200)

Fig. 3 Effect of Shenlian prescription on CD68 positive cell infiltration in lung tissue (IHC, ×200)

焚烧等PM产生场景模拟较好;标准品的平均粒径比自然状态的更小,更容易进入到循环中,有利于后续跟进对PM暴露相关并发症的研究。肺是直接接触PM的器官,流行病学研究显示PM暴露会引起肺功能下降^[14-15],这一点在本次实验中得以复现,具体表现为大鼠TV、MV显著降低,RL明显增大。TV、MV降低以及RL增大可能为PM沉积在支气管和肺泡中影响肺部气体交换;此外炎症反应引起的组织增生、分泌物滞留使气管狭窄、堵塞,导致气道阻力增加。Cdyn反应肺在受外力作用下的改变难易程度,受肺组织弹性和气道阻力等多种因素影响,在本实验中出现应激性增强。参莲方干预后上述肺功能指标均得到改善,表明参莲方对颗粒物暴露导致的肺损伤中对肺功能具有较好的保护作用。

为进一步验证PM暴露造成的肺损伤及参莲方的干预作用,检测了血清中肺损伤标志物SP-A和CC16。SP-A是肺表面活性蛋白,由肺泡上皮细胞合成,其参与炎症调节和先天免疫反应^[16];但疾病中肺泡毛细血管通透性增加可使其在血清中水平升高,因此可作为肺部疾病或损伤的生物标志物。CC16主要表达于气道中,在其他器官中的表达非常有限,在肺部疾病中从循环中肺上皮屏障渗漏到外周,因此也被作为肺损伤的生物标志物^[17-18]。但在此实验中没有观察到PM短期暴露导致大鼠血清中SP-A和CC16上调,相反检测发现大鼠血清SP-A和CC16水平降低。此结果与一项对PM暴露的研究吻合:PM暴露会升高肺泡中SP-A表达,但高浓度的PM暴露会干扰肺泡中SP-A的储存和运输,最终导致释放到肺部的SP-A量减少^[19];另一项对关于长期PM肺部暴露的研究也发现PM导致血清CC-16水平下降,进而推测PM中的多环芳烃会损伤气道中的克拉氏细胞,导致CC16分泌减少^[20]。这些研究一定程度上解释了PM暴露导致血清SP-A和CC16降低,此外本实验采用的颗粒物标准品的主要成分为多环芳烃,相较于空气中收集的

PM,可能使SP-A和CC16降低更明显。然而实验中没有观察到两种抗炎药物(参莲方和罗氟斯特)对SP-A、CC16水平的显著回调作用。这在某种程度上反映了PM暴露与其他导致肺损伤的因素的不同之处,PM暴露虽然造成炎症,然而没有明显损伤肺部屏障的完整性,而是干扰肺部稳态,抑制正常分泌蛋白产生,使肺部免疫力下降。

为进一步研究参莲方对肺部炎症细胞浸润的作用,本研究检测了肺部CD68阳性表达。CD68是巨噬细胞膜表面标志物,通过标记CD68可定位巨噬细胞^[21]。巨噬细胞是肺部主要的免疫细胞群之一,作为先天免疫的一部分,巨噬细胞吞噬肺部的颗粒物,发挥对侵入颗粒的清除作用^[22]。但同时巨噬细胞会在PM的刺激下释放炎症细胞因子,加重肺部炎症反应^[22]。但有研究表明,沉积在肺泡中的PM会暴露会损伤巨噬细胞的吞噬功能^[23]。在实验中,笔者观察到PM暴露加重了肺部巨噬细胞浸润;此外观察到部分CD68阳性与褐色斑点状的黑色颗粒团块重合,显示了巨噬细胞对颗粒物的吞噬作用。参莲方给药后肺组织中浸润的巨噬细胞数没有明显变化;但颗粒物沉积显著改善。据此推断参莲方给药没有直接减轻巨噬细胞浸润,但促进巨噬细胞的吞噬作用,加速肺部沉积颗粒的清除,从而发挥对肺部的保护作用。

PM暴露造成机体损伤的研究中,过度炎症被认为是导致呼吸系统疾病发生或加重的主要原因^[24-25]。PM可刺激Ⅱ型肺泡细胞产生活性氧,激活核转录因子- κ B(NF- κ B)、丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路^[26]。在小鼠肺组织中PM暴露可激活NLRP3炎症体^[27],导致炎症因子释放。此外PM暴露会刺激肺泡巨噬细胞释放炎症因子和趋化因子,引起肺部组织炎症细胞浸润^[28]。本研究中,肺组织HE染色显示PM暴露引起肺部炎症反应,包括肺泡壁增厚、出血和水肿,大量淋巴细胞、中性粒细胞、巨噬细胞浸润等,Real-time PCR检测炎症因

子发现大鼠肺部的IL-1 α 、IL-6、IL-18、MCP-1表达均升高。参莲方是根据中医临床经验用于心血管疾病的组方^[29],在前期研究中被证明可调节NF- κ B/NF- κ B抑制蛋白(I κ B)信号通路^[30],抑制NLRP₃炎症小体^[31],保护缺血心肌。在本研究中,参莲方显示其可减轻PM暴露引起的肺部炎症;在参莲方给药后组织结构改善,炎症细胞浸润减少,炎症因子表达水平降低。本实验中的阳性药选用罗氟斯特。罗氟斯特是一种磷酸二酯酶-4(PDE-4)抑制剂,可增加环磷酸腺苷(cAMP)浓度,提高原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH)氧化酶活性,抑制细胞因子生成和炎症介质释放,发挥抗炎作用,通常用于哮喘和慢性阻塞性肺病的治疗^[32]。在本实验中可观察到罗氟斯特给药可明显降低炎症因子表达水平。但在肺功能检测和肺部组织形态学观察以及肺损伤标志物检测中,其相较于参莲方并没有表现出更显著的药效。此结果预示PM暴露对肺功能的损伤并可能不是单纯的炎症机制;参莲方在干预PM暴露致大鼠肺损伤中具有区别于单纯抗炎药物的优势。

综上所述,参莲方可保护PM暴露造成的大鼠肺损伤,恢复肺功能,抑制肺部炎症反应。未来本课题组将对参莲方的作用机制和特点做更深入的研究探讨。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

[1] GBD2019 DEMOGRAPHICS COLLABORATORS. Global age-sex-specific fertility, mortality, healthy life expectancy (HALE), and population estimates in 204 countries and territories, 1950-2019: A comprehensive demographic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019 [J]. *Lancet*, 2020, 396 (10258): 1160-1203.

[2] Geneva: World Health Organization. WHO global air quality guidelines: Particulate matter (PM_{2.5} and PM₁₀), ozone, nitrogen dioxide, sulfur dioxide and carbon monoxide [EB/OL]. (2021-09-22) [2021-09-25]. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/345329>.

[3] KIM K H, KABIR E, KABIR S. A review on the human health impact of airborne particulate matter[J]. *Environ Int*, 2015, 74: 136-143.

[4] 周游,张伟. 国医大师邓铁涛治疗雾霾性肺损伤经验总结[J]. *中华中医药杂志*, 2019, 34(2): 609-612.

[5] 李玉洁,杨庆,翁小刚,等. 参莲提取物抗炎药理活性评价[J]. *中药新药与临床药理*, 2011, 22(1): 65-69.

[6] 阮从潇,李玉洁,杨庆,等. 参莲提取物对大鼠腹腔肥大细胞释放活性物质的干预作用[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2013, 19(6): 196-199.

[7] 刘思思,李琦,孙立东,等. 参莲提取物对LPS诱导的巨噬细胞炎症反应的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23(10): 85-91.

[8] 刘栩岑,李玉洁,王娅杰,等. 参莲提取物对PM_{2.5}染毒RAW264.7细胞损伤的保护作用[J]. *中国中药杂志*, 2015, 40(10): 1977-1983.

[9] 尹婕,李琦,赵正,等. 脂质过氧化炎症损伤模型中参莲提取物对巨噬细胞功能的药效与机制探讨[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2019, 25(10): 26-32.

[10] SHI R, SU W W, ZHU Z T, et al. Regulation effects of naringin on diesel particulate matter-induced abnormal airway surface liquid secretion [J]. *Phytomedicine*, 2019, 63: 153004.

[11] ZHU Z, WU H, SU W, et al. Effects of total flavonoids from *Exocarpium Citri Grandis* on air pollution particle-induced pulmonary inflammation and oxidative stress in mice [J]. *J Food Sci*, 2019, 84(12): 3843-3849.

[12] HADEI M, NADDAFI K. Cardiovascular effects of airborne particulate matter: A review of rodent model studies [J]. *Chemosphere*, 2020, 242: 125204.

[13] MARTINELLI N, OLIVIERI O, GIRELLI D. Air particulate matter and cardiovascular disease: A narrative review [J]. *Eur J Intern Med*, 2013, 24(4): 295-302.

[14] GUO C, BO Y, CHAN T C, et al. Does fine particulate matter (PM_{2.5}) affect the benefits of habitual physical activity on lung function in adults: A longitudinal cohort study [J]. *BMC Med*, 2020, 18(1): 134.

[15] GUO C, HOEK G, CHANG L Y, et al. Long-term exposure to ambient fine particulate matter (PM_{2.5}) and lung function in children, adolescents, and young adults: A longitudinal cohort study [J]. *Environ Health Perspect*, 2019, 127(12): 127008.

[16] GIBBS J L, DALLON B W, LEWIS J B, et al. Diesel exhaust particle exposure compromises alveolar macrophage mitochondrial bioenergetics [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(22): 5598.

[17] ALMUNTASHIRI S, ZHU Y, HAN Y, et al. Club cell secreted protein CC16: Potential applications in prognosis and therapy for pulmonary diseases [J]. *J Clin Med*, 2020, 9(12): 4039.

[18] LAING I A. CC16: A biomarker of pollutant exposure and future lung disease? [J]. *Am J Respir Crit Care*

- Med, 2019, 200(5):529-530.
- [19] PENG J, ZHANG L, MENG Q, et al. Adverse impact of ambient PM_{2.5} on expression and trafficking of surfactant protein A through reactive oxygen species damage to lamellar bodies[J]. *Toxicol Lett*, 2019, 315: 47-54.
- [20] WANG Y, DUAN H, MENG T, et al. Reduced serum club cell protein as a pulmonary damage marker for chronic fine particulate matter exposure in Chinese population[J]. *Environ Int*, 2018, 112:207-217.
- [21] CHISTIakov D A, KILLINGSWORTH M C, MYASOEDOVA V A, et al. CD68/macrosialin: Not just a histochemical marker[J]. *Lab Invest*, 2017, 97(1):4-13.
- [22] GLENCROSS D A, HO T R, CAMIÑA N, et al. Air pollution and its effects on the immune system[J]. *Free Radic Biol Med*, 2020, 151:56-68.
- [23] LAWAL A O. Diesel exhaust particles and the induction of macrophage activation and dysfunction[J]. *Inflammation*, 2018, 41(1):356-363.
- [24] LOSACCO C, PERILLO A. Particulate matter air pollution and respiratory impact on humans and animals[J]. *Environ Sci Pollut Res Int*, 2018, 25(34): 33901-33910.
- [25] GUO C, LV S, LIU Y, et al. Biomarkers for the adverse effects on respiratory system health associated with atmospheric particulate matter exposure[J]. *J Hazard Mater*, 2022, 421:126760.
- [26] HE M, ICHINOSE T, YOSHIDA S, et al. PM_{2.5}-induced lung inflammation in mice: Differences of inflammatory response in macrophages and type II alveolar cells[J]. *J Appl Toxicol*, 2017, 37(10): 1203-1218.
- [27] LI J, AN Z, SONG J, et al. Fine particulate matter-induced lung inflammation is mediated by pyroptosis in mice[J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2021, 219: 112351.
- [28] MARTIN P J, HÉLIOT A, TRÉMOLET G, et al. Cellular response and extracellular vesicles characterization of human macrophages exposed to fine atmospheric particulate matter[J]. *Environ Pollut*, 2019, 254(Pt A):112933.
- [29] 王春淼, 李玉洁, 李晶晶, 等. 参莲提取物通过调控 Nrf2/Keap1 信号通路减轻 TNF- α 诱导的 ECV304 损伤[J]. *中国中药杂志*, 2021, 46(13):3402-3409.
- [30] GUO Y, YANG Q, WENG X G, et al. Shenlian Extract against myocardial injury induced by ischemia through the regulation of NF- κ B/I κ B signaling axis[J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11:134.
- [31] QU S, LI K, YANG T, et al. Shenlian extract protects against ultrafine particulate matter-aggravated myocardial ischemic injury by inhibiting inflammation response via the activation of NLRP3 inflammasomes[J]. *Environ Toxicol*, 2021, 36(7):1349-1361.
- [32] ZHANG X, CHEN Y, FAN L, et al. Pharmacological mechanism of roflumilast in the treatment of asthma-COPD overlap. [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2018, 12: 2371-2379.

[责任编辑 周冰冰]