

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.25.008

吸入乙酰半胱氨酸对博莱霉素导致的大鼠肺纤维化的影响*

赵 帅¹ 李家宁^{1△} 丛莹莹² 陈国萍³ 张艳玉⁴

(1 哈尔滨医科大学附属第二医院呼吸科二病房 黑龙江 哈尔滨 150086; 2 哈尔滨医科大学附属第三医院肿瘤内科 黑龙江 哈尔滨 150036; 3 天津市人民医院 天津 300000; 4 哈尔滨医科大学附属第二医院 黑龙江 哈尔滨 150086)

摘要 目的:研究 N-乙酰半胱氨酸(NAC)雾化吸入对于博莱霉素(BLM)导致的大鼠肺纤维化的影响作用。方法:取清洁 SD 大鼠 100 只,平均分为 10 小组,1 小组为对照组,其余每 3 小组为一组,分别为模型组,防治组,治疗组,通过在大鼠气管中注入 BLM 的方法来制造大鼠肺纤维化模型,防治组在造模前的 7 天以及造模后的 7 天内,治疗组在造模后的 7 天内,分别给予 NAC 雾化吸入治疗。在成功造模后的第 7 天、14 天、28 天,每组处死 1 小组大鼠,取出病理组织,通过免疫组化方法来观察肺组织纤维化的程度。研究 NAC 对大鼠肺纤维化的影响。结果:与模型组对比,防治组和治疗组在纤维化程度上明显较轻($P<0.05$)。结论:吸入 NAC 对于博莱霉素导致的大鼠肺纤维化有明显的抑制作用,而且防治组疗效明显好于治疗组。既提前 7 天用药,效果更明显,大鼠获益更多。

关键词: N-乙酰半胱氨酸;大鼠肺纤维化;博莱霉素

中图分类号: Q95-3; R563 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2014)25-4832-05

The Effect of N-acetylcysteine in Mucolytic Treatment on the Bleomycin Induced Pulmonary Fibrosis in Rats*

ZHAO Shuai¹, LI Jia-ning^{1△}, CONG Ying-ying², CHEN Guo-ping³, ZHANG Yan-yu⁴

(1 Respiratory Department II in the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang, 150006, China;

2 Department of Comprehensive Medical Oncology in Affiliate Tumor Hospital of Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang, 150036, China; 3 the People's Hospital of Tianjin, Tianjin, 300000, China;

4 Second Hospital affiliated to Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang, 150086, China)

ABSTRACT Objective: To study the projective effect of N-acetylcysteine in mucolytic treatment on the bleomycin induced pulmonary fibrosis in rats. **Methods:** The pulmonary fibrosis was induced by intratracheal instillation of bleomycin in rats. 100 rats were involved and divided into 10 groups. One of the 10 groups was the normal control group, the other 9 groups were divided into the BLM group, the preventing group and the treatment group with 3 branches in each group. The rats in the preventing group were treated by the N-acetylcysteine for 7 days before molding. The rats in the treatment group were treated by the N-acetylcysteine for 7 days after molding. 10 rats of each group were sacrificed after using of bleomycin on days 7, 14, 28. The lungs were taken for histological study. The immunity histochemical method was taken to observe the fibrosis degree. **Results:** The degrees of pulmonary fibrosis in the preventing group and treating group were obviously reduced than the BLM group ($P<0.05$). **Conclusion:** The effect of N-acetylcysteine in mucolytic treatment on the bleomycin induced pulmonary fibrosis in rats was obviously, the curative effect in preventing group was better than treating group. Using N-acetylcysteine 7 days before molding, rats benefit more.

Key words: N-acetylcysteine; Pulmonary fibrosis in rats; BLM

Chinese Library Classification: Q95-3; R563 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)25-4832-05

前言

肺纤维化是一种间质性肺疾病,它的特征主要是弥漫性的肺泡炎^[1]和肺泡结构紊乱^[2]。该疾病发病机制复杂,不容易进行早期诊断,抗炎药物效果欠佳^[3],治疗上缺乏有效的药物,病情往往呈现为不可逆性的改变,患者往往预后很差。近年来,从国外的研究来看,肺纤维化呈现发病率逐渐上升的趋势^[4]。有报道称,英国发病率每年以 11% 的速度增长^[5]。有研究表明^[6],肺纤维化的病理主要特征为弥漫性肺泡炎、II 型肺泡上皮和血管内

皮增生以及肺间质纤维化。该疾病的研究目前是国内外的研究热点及难点。

目前,针对肺纤维的治疗药物主要包括糖皮质激素、细胞毒性药物、白三烯类药物和抗纤维化药物等。但是还没有能够逆转纤维化病理过程的药物问世。糖皮质激素对于急性进展的纤维化往往能够有一定效果,但是对弥漫性肺纤维化疗效欠佳^[7]。2011 年的指南^[8]中,弱不推荐中提示,可以单独应用乙酰半胱氨酸来治疗肺纤维化。

在本实验中,给大鼠吸入 N-乙酰半胱氨酸来对博莱霉素

* 基金项目:黑龙江省教育厅一般项目(11521096)

作者简介:赵帅(1986-),男,硕士研究生,助教,主要研究方向:间质性肺疾病, E-mail: zhaoshuaihrb@foxmail.com

△ 通讯作者:李家宁,电话:13796627257, E-mail: zhaoshuaihrb@foxmail.com

(收稿日期:2014-02-13 接受日期:2014-03-12)

所导致的大鼠肺纤维化进行干预,观察病理半定量分析,探讨吸入型的 N-乙酰半胱氨酸在大鼠肺纤维化形成中的保护作用。

1 材料及方法

1.1 动物模型的建立和分组

清洁级 SD 雄性大鼠 100 只,平均体重为 (210 ± 50) g,由动物实验中心进行喂养,在白炽灯下,每 12 小时进行昼夜的循环。然后利用随机数字表对大鼠进行随机的分组,共分成 10 个小组,每个小组 10 只大鼠。每个小组再进行随机的分配,其中 1 小组设定为对照组,其余的每 3 小组大鼠分别设定为模型组,防治组以及治疗组。A 组:对照组采用的为生理盐水 + 生理盐水。B 组:模型组采用博来霉素 + 生理盐水。E 组:防治组采用博来霉素 + 造模 7 天前吸入乙酰半胱氨酸。D 组:治疗组采用博来霉素 + 造模 7 天后给予吸入乙酰半胱氨酸。B、E、D 三组大鼠以 10% 水合氯醛腹腔注射,麻醉后颈部常规消毒后暴露气管,经过颈部的正中做切口,然后分离气管,向气管中一次性的注射博来霉素[®]试剂(0.5 ml/kg),立刻将大鼠旋转过来,可以令药液在肺组织内进行均匀的分布,立即缝合皮肤,局部进行酒精消毒,利用该方法来复制实验性肺纤维化动物的模型。等大鼠清醒后,将它们放于笼内进行常规方法饲养。A 组利用一样方式注入等量生理盐水。E 组大鼠在造模 7 天前雾化吸入乙酰半胱氨酸,直至取材结束。D 组大鼠在造模的 7 天后乙酰半胱氨酸雾化吸入,直到取材结束。吸入乙酰半胱氨酸的剂量是 3 mmol/kg/day(490 mg/kg)。A、B 组于造模后开始以同等剂量的生理盐水雾化吸入。每天 9:00 AM 雾化吸入。

1.2 标本处理

在实验大鼠的腹腔内注射致死量戊巴比妥钠,采用腹主动脉放血法来处死实验大鼠,然后分离肺组织,并迅速取右肺中叶置于 10% 中性醛固酮固定液中 24-30 h。取出肺组织后放入不同浓度的乙醇溶液中脱水,紧接着埋入石蜡块中,进行 4 微米的连续切片,制作石蜡切片,组织学检查。分别利用 HE 染色和 Masson 染色方法来检测肺肺炎和纤维化程度。

1.3 检测指标及方法

病理组织学方法检测肺组织的肺炎以及肺纤维化:将中叶的肺组织常规进行包埋固定、HE 染色、Masson 染色、HE 染色根据 Szapiel 等人的方法确定肺炎程度。(-)代表无肺炎;(+)代表轻度的肺炎,主要的表现为肺泡间隔增宽以及单核细胞浸润,只限于局部或者靠近胸膜的部分,总面积小于全部肺组织的 20%,肺泡结构正常;((+))代表中度肺炎,受累面积占全部肺组织的 20%-50%,靠近胸膜的部分较严重;(((+)))代表重度肺炎,病变面积大于 50%,偶尔肺组织内可见肺泡腔内有少量的炎性细胞和出血造成的实变。Masson 染色法来评估肺组织纤维化。(-):代表无纤维化;(+)代表轻度的纤维化,肺组织受累及的面积小于全肺组织的 20%;((+))代表中度的纤维化,其中受累及的面积占全部肺组织 20%-50%;(((+)))代表重度纤维化,受累及面积大于 50%,肺泡的结构紊乱。

1.4 统计学处理

等级资料的表示方法:-0 分;+1 分;+2 分;+3 分。采用的统计学方法为非参数秩和检验, $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 病理组织形态学

HE 染色,在显微镜下观察:第 7 天处死的对照组大鼠肺组织结构基本正常;模型组的大鼠肺组织主要表现为小灶或大片状的炎性细胞浸润,肺泡腔和肺间质内可以见大量的红细胞渗出,成纤维细胞毛细血管增生,肺泡间隔增厚(图 1)。防治组大鼠肺组织内可见肺肺炎的表现,程度同模型组比较明显减轻(图 2)。治疗组和模型组的病变程度相似。14 天处死的对照组肺组织结构正常。模型组可见多量的炎性细胞浸润并且肺泡的间隔增厚,Masson 染色后可以见到小灶胶原组织生成(图 3)。防治组大鼠肺组织肺泡腔内出血十分明显,炎性细胞的浸润程度同模型组比较明显减轻,Masson 染色中,肺组织内没有胶原组织生成(图 4)。治疗组病变的程度介于模型组和防治组之间(图 5)。第 28 天处死的对照组组织正常。模型组主要表现为肺泡萎陷被大量成纤维细胞占据而且肺泡间隔增厚,Masson 染色中可见间质中有大量胶原纤维生成。防治组大鼠肺纤维化程度同模型组比较明显为轻。治疗组介于模型组和防治组之间。

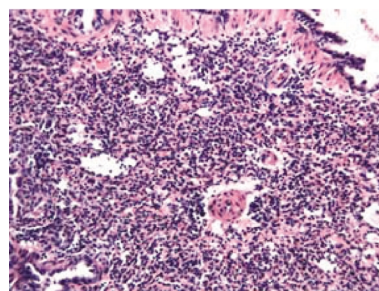


图 1 模型组 7 天($\times 100$)

Fig.1 BLM group 7 d($\times 100$)

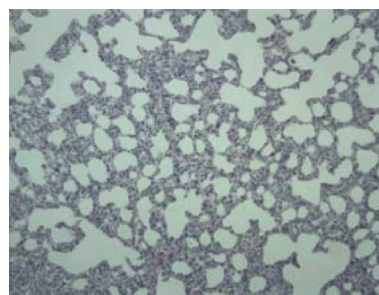


图 2 防治组 7 天($\times 100$)

Fig.2 Preventing group 7 d($\times 100$)

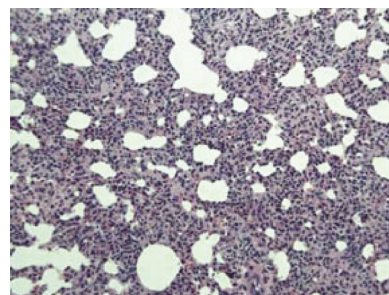
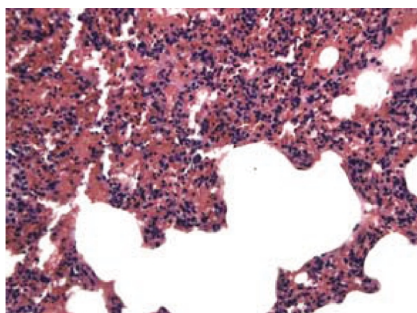
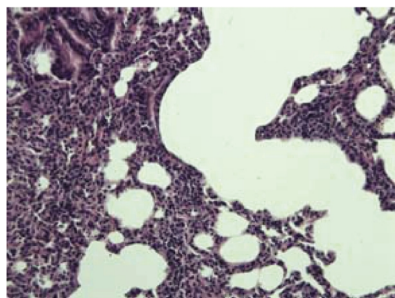


图 3 模型组 14 天($\times 100$)

Fig.3 BLM group 14 d($\times 100$)

图4 防治组 14 天($\times 100$)Fig.4 Preventing group 14 d($\times 100$)图5 治疗组 14 天($\times 100$)Fig.5 Treating group 14 d($\times 100$)

2.2 免疫组化结果

HE 染色:经博莱霉素干预,模型组大鼠的肺泡炎在第 7 天时达到最严重,之后便随着时间逐渐减轻。同对照组相比,防治组在第 7 天和第 14 天,治疗组在第 7、14 和 28 天都出现明显肺泡炎($P < 0.05$)。经过乙酰半胱氨酸吸入后,防治组和治疗组肺组织内肺泡炎都有减轻,大鼠在第 28 天时,防治组与模型组和治疗组相比,结果显示了统计学差异($P < 0.05$),见表 1。

Masson 染色:在博莱霉素干预后,模型组的肺纤维化逐渐加重,在第 28 天时最严重。在乙酰半胱氨酸介入后,防治组和治疗组肺纤维化程度均减轻。第 28 天时,治疗组同模型组、对照组相比有统计学差异($P < 0.05$);防治组同模型组在第 14 天、28 天相比均有显著差异($P < 0.05$),防治组与治疗组在第 28 天相比有显著差异($P < 0.05$),与对照组在第 28 天先比无显著差异,见表 2。

3 讨论

特发性肺间质纤维化属于是一种目前病因不明确间质性疾病,由于很多实验尚不能在人体进行,所以制作出肺纤维化的模型变得很有意义。近年的研究均采用博莱霉素复制动物肺纤维化模型,并进行研究。文献表明,大鼠气管内一次性给博莱

表 1 各组肺组织切片中的肺泡炎表现

Table 1 Alveolitis degrees of lung tissue in each group

组别 Group	n	肺泡炎分级 Alveolitis degrees			
		0 级	1 级	2 级	3 级
		0 degree	1 degree	2 degree	3 degree
对照组 Normal group	10	10	0	0	0
模型组 7 天 BLM group 7 d	10	0	0	2	8*
模型组 14 天 BLM group 14 d	10	0	0	4	6*
模型组 28 天 BLM group 28 d	10	0	0	6	4*
治疗组 7 天 Treating group 7 d	10	0	0	2	8*
治疗组 14 天 Treating group 14 d	10	0	4	4	2*
治疗组 28 天 Treating group 28 d	10	0	4	6	0*
防治组 7 天 Preventing group 7 d	10	0	2	6	2*
防治组 14 天 Preventing group 14 d	10	0	4	4	2*
防治组 28 天 Preventing group 28 d	10	4	6	0	0●▲

* 注:★与对照组相比, $P < 0.05$;●与模型组相比, $P < 0.05$;▲与治疗组相比, $P < 0.05$ 。

*Note: ★ compared with the normal group, $P < 0.05$; ● compare with the BLM group, $P < 0.05$; ▲ compared with treating group, $P < 0.05$.

表 2 各组肺组织切片中的纤维化表现
Table 2 Fibrosis degrees of lung tissue in each group

组别 Group	n	纤维化分级 Fibrosis degrees			
		0 级	1 级	2 级	3 级
		0 degree	1 degree	2 degree	3 degree
对照组	10	10	0	0	0
Normal group					
模型组 7 天	10	4	6	0	0
BLM group 7 d					
模型组 14 天*	10	0	2	4	4
BLM group 14 d					
模型组 28 天*	10	0	0	2	8
BLM group 28 d					
治疗组 7 天	10	4	6	0	0
Treating group 7 d					
治疗组 14 天*	10	2	4	4	0
Treating group 14 d					
治疗组 28 天**	10	0	4	6	0
Treating group 28 d					
防治组 7 天	10	8	2	0	0
Preventing group 7 d					
防治组 14 天*	10	6	4	0	0
Preventing group 14 d					
防治组 28 天*▲	10	4	6	0	0
Preventing group 28 d					

* 注:★与对照组相比, $P<0.05$;●与模型组相比, $P<0.05$;▲与治疗组相比, $P<0.05$ 。*Note: ★ compared with the normal group, $P<0.05$; ● compared with the BLM group, $P<0.05$; ▲ compared with treating group, $P<0.05$.

霉素,早期肺炎明显,后期动物组织标本表面暗红,病理组织镜下有明显的纤维增生,肺泡结构被破坏,证明肺纤维化动物模型建立成功,在本研究中复制了大鼠的纤维化模型,其病变同文献报道一致。近年来,对于治疗该疾病的临床研究也在逐渐的受到重视,注册的临床试验数量逐年增多,但是最终的指标结果差异往往无统计学意义^[10,11]。

目前针对肺间质纤维化的治疗,糖皮质激素和细胞毒类药物疗效均不理想^[12]。确诊以后患者的中位生存时间为 2-3 年,目前还没有能够逆转纤维化的药物^[13]。有研究显示,大剂量应用乙酰半胱氨酸可以延缓肺纤维化^[14]。Demedts 等人的研究显示,肺纤维化动物模型的肺泡上皮衬液和炎性细胞氧化负荷增加,谷胱甘肽水平下降^[15]。在 2006 年颁发的中华医学会特发性肺间质纤维化诊断和治疗指南(草案)^[16]里,认为乙酰半胱氨酸是一种抗氧化剂,可以治疗肺纤维化。有研究表明,特发性肺间质纤维化与氧自由基所导致的损伤有关^[17]。N-乙酰半胱氨酸是一种经典的化痰药物,近些年来,随着临床研究和临床使用的不断深入,发现乙酰半胱氨酸有很强的抗氧化促进肺表面活性物质生成的作用^[18]。它是一种重要的抗氧化剂,可以消除活性氧基团,并且具有稳定大分子的作用^[19]。它对多种呼吸系统疾病包括慢性阻塞性肺疾病、支气管扩张、支气管哮喘、急性呼吸窘迫综合征等都有着肯定的疗效^[20]。然而也有一部分研究认为乙

酰半胱氨酸对于肺纤维化的治疗作用并不明显^[21]。本实验研究目的是通过雾化吸入乙酰半胱氨酸对于博来霉素导致的大鼠肺纤维化的治疗作用。

本实验的 HE 染色病理结果,我们可以看出,大鼠在注入博来霉素后,早期表现以肺炎为主,在第 7 天时达到高峰。随着时间的推移,而逐渐减轻。而肺纤维化则在早期表现不明显,随着时间延长,逐渐加重,到第 28 天为最严重。通过模型组与对照组的对比我们可以看到明显的统计学意义,说明本实验的模型制作是符合标准,且反映了肺炎发展的趋势是随着时间延长逐渐减轻。防治组在第 28 天时与模型组对比,具有显著的统计学差异,虽然肺炎在第 28 天逐渐减轻,但是我们可以看到,防治组的好转程度明显好于模型组,说明乙酰半胱氨酸的应用是有效的,可能会改善大鼠的预后。防治组与治疗组进行对比,发现在 7、14 天时,无明显差异,仅在第 28 天时有显著差异。可能说明预防应用乙酰半胱氨酸并不能早期体现出获益,仅在晚期才能看到明显的效果。

通过 Masso 染色结果来看,模型组大鼠在气管内注入博来霉素后,肺内纤维化的程度早期较轻,随着时间的推移逐渐加重,高峰出现在第 28 天,反映了肺纤维化的发展规律。模型组与对照组对比,有统计学意义,说明造模是成功的。治疗组与对照组也有统计学差异,说明虽然应用了乙酰半胱氨酸进行治

疗,但是大鼠肺组织仍然较正常肺组织有病理学的损害。防治组则与对照组差异不明显,可见防治组的疗效是值得肯定的。在肺纤维化高峰的第28天进行比较,治疗组和防治组对比模型组均有统计学差异,可见大鼠经过乙酰半胱氨酸治疗,肺纤维化得到了减轻。在第28天时,防治组较治疗组体现出了统计学上的差异,说明从长期的效果来看,预防性应用乙酰半胱氨酸可能获益。

参考文献(References)

- [1] Ley B, Collard HR. Risk prediction in idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Am J Respir Crit Med*, 2012, 185(1): 6
- [2] Meltzer EB, Noble PW. Idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Orphanet J Rare Dis*, 2008, (3): 8
- [3] King TE, Pardo A, Selman M. Idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Lancet*, 2011, 378(9807): 1949
- [4] Nalysnyk L, Cid-Ruzafa J, Rotella P, et al. Incidence and prevalence of idiopathic pulmonary fibrosis :review of the literature [J]. *Eur Respir Rev*, 2012, 21(126): 355-361
- [5] Gribbin J, Hubbard RB, Le Jeune, et al. Incidence and mortality of idiopathic pulmonary fibrosis and sarcoidosis in the UK [J]. *Thorax*, 2006, 61(11): 980-985
- [6] Chen Li, CAI Min. A review of development in idiopathic pulmonary fibrosis with lung cancer[J]. *Journal of Clinical Pulmonary Medicine*, 2012, 17(1): 128-129
- [7] Chen Yu-long, Zhang Jian. Clinical analyses of 76 idiopathic pulmonary fibrosis patients [J]. *ournal of Clinical Pulmonary Medicine*, 2009, 14(10): 1370-1371
- [8] Raghu G, Collard HR, Egan JJ, et al. An official ATS/ERS/JRS/ATLT statement:idiopathic pulmonary fibrosis:evidence based guidelines for diagnosis and management [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2011, 183(6): 788-824
- [9] Li Wei-feng, Hu Yu-jie, Yuan Wei-feng, et al. Comparison of two mouse models of lung fibrosis induced by intratracheal instillation and intratracheal aerosol administration of bleomycin [J]. *Journal of Southern Medical University*, 2012, 32: 221-225
- [10] Ryu JH, Daniels CE. Advances in the management of idiopathic pulmonary fibrosis[J]. *F1000 Medicine Reprots*, 2010, 2(28): 1-4
- [11] Costabel U. Emerging potential treatments: new hope for idiopathic pulmonary fibrosis patients?[J]. *Eur Respir Rev*, 2011, 20(121): 201-207
- [12] Raghu G, Brown KK, Bradford WZ, et al. Idiopathic Pulmonary Fibrosis Study Group. A placebo-controlled trial of interferon gamma-1b in patients with idiopathic pulmonary fibrosis[J]. *N Engl J Med*, 2004, 350(2): 125-133
- [13] Antoniou KM, Alexandrakis MG, Siafakas NM, et al. Cytokine network in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis*, 2005, 22(2): 91-104
- [14] Behr J. Idiopathic pulmonary fibrosis: modern guideline-concordant diagnostics and innovative treatment [J]. *Dtsch Med Wochenschr*, 2012, 137(12): 601-604
- [15] Demedts M, Behr J, et al. High dosed acetylcysteine in idiopathic pulmonary fibrosis[J]. *N Engl J Med*, 2005, 353(21): 2229-2242
- [16] Wang Xi-yong, Wang Xi-hua, Wu Guo-qiu. The advancement of pharmacotherapy of idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Journal of Southeast University(Medical Science Edition)*, 2010, 29(6): 695-698
- [17] Kliment CR, Oury TD. Oxidative stress,extracellular matrix targets, and idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Free Radic Biol Med*, 2010, 49(5): 707-717
- [18] Dekhuljzen PN. Antioxidant properties of N-acetylsteine:their relevance in relation to chronic obstructive pulmonary disease[J]. *Eur Respir J*, 2004, 23(4): 629-636
- [19] Huang Zhen-jie, Tang Yan, Zheng Jin-xu. To treat the patients with idiopathic pulmonary fibrosis by using inhaled budesonide combined with oral N-acetylsteine[J]. *Journal of Clinical Pulmonary Medicine*, 2010, 15(12): 1755-1757
- [20] Millea PJ. N-acetylsteine: mutiple clinical applications [J]. *Am Fam Physician*, 2009, 80(3): 265-269
- [21] Bando M, Honsono T, Mato N, et al. Long-term efficacy of inhaled N-acetylcysteine in patients with idopathic pulmonary fibrosis [J]. *Intern Med*, 2010, 49: 2289-2296