

尼达尼布脂质体治疗肺纤维化大鼠效果及其机制

史玲玲,白芳

(西安交通大学第一附属医院消毒供应科,陕西 西安 710061)

摘要: 为了观察尼达尼布脂质体治疗肺纤维化大鼠效果及其对血清羟脯氨酸、前列腺素 E2 水平及自主活动次数的影响。肺纤维化大鼠予以不同浓度尼达尼布脂质体灌胃治疗。用 HE 染色、Masson 染色观察肺组织形态变化,用 Ascroft 评分评估肺纤维化程度,并测量血清羟脯氨酸(Hyp)、前列腺素 E2(PGE2)水平,观察大鼠自主活动次数。发现尼达尼布脂质体(高剂量组效果更佳)可改善肺纤维化程度,降低血清 Hyp、PGE2 水平,并不会引起大鼠自主活动次数增加。说明高剂量尼达尼布脂质体能显著改善肺纤维化大鼠的肺纤维化,降低血清羟脯氨酸、前列腺素 E2 水平且不会增加自主活动次数。

关键词: 尼达尼布脂质体; 大鼠; 肺纤维化; 羟脯氨酸; 前列腺素 E2; 自主活动次数

中图分类号:R563

文献标识码:A

Mechanism of Nintedanib liposome in the treatment of pulmonary fibrosis rats

SHI Lingling, BAI Fang

(Department of Disinfection Supply, the First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, Shannxi, China)

Abstract: In order to investigate the effect of Nintedanib liposome in the treatment of pulmonary fibrosis rats and its effect on serum level of hydroxyproline, prostaglandin E2 and the number of autonomic activities. The pulmonary fibrosis rats were treated with different concentrations of nintedanib liposomes gavage. The morphological changes of lung tissue were observed by HE staining and Masson staining. The degree of pulmonary fibrosis was assessed by Ascroft score. The changes of serum Hyp and PGE2 levels were measured. The number of autonomic activity was recorded. Results indicated that nintedanib liposomes (high-dose group better) can improve the degree of pulmonary fibrosis, reduce serum Hyp, PGE2 levels, and does not cause increased frequency of spontaneous activity in rats. The results showed that high-dose nintedanib liposome treatment of pulmonary fibrosis in rats can significantly reduce the level of pulmonary fibrosis, lower serum hydroxyproline, prostaglandin E2 levels and will not increase the number of spontaneous activity.

Key words: Nintedanib liposomes; rat; pulmonary fibrosis; hydroxyproline; prostaglandin E2; number of autonomic activities

肺纤维化是由于感染特殊病毒、长期暴露于放射环境或长期接触微溶毒素等多种原因导致的肺间质疾病晚期的共同结果^[1]。研究表明肺纤维化也是类风湿性关节炎和系统性硬化症患者的常见并发症^[2]。肺纤维化以肺泡损伤、肺间质增厚及肺泡细胞外基质持续损伤、重建和弹性纤维过度沉积,肺泡壁破损和肺泡微血管功能缺失为主要病理特点^[3]。目前临床上主要应用皮质类固醇、细胞毒药物、免疫抑制剂等药物进行治疗,这些药物治疗

不但会引起骨髓抑制、弥漫性肺泡出血等一系列副作用,而且抗纤维化作用往往不显著^[4],因此目前急需寻找有效防治药物。研究表明尼达尼布作为一种多重酪氨酸激酶抑制剂,在治疗特发性肺纤维化的临床应用中取得了显著效果^[5]。脂质体属于一种特殊药物载体,与药物结合后可提高其生物利用率并增加其稳定性,目前对于尼达尼布脂质体治疗肺纤维化的研究较少,本文旨在探究尼达尼布脂质体对大鼠肺纤维化治疗效果及其对血清羟脯氨酸、前列腺素 E2 水平和自主活动次数的影响。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 实验动物 120 只 SD 雄性大鼠由四川达硕实验动物有限公司提供, 周龄 6~8 周, 体重 180~220g。将大鼠饲养在温度 21~25℃, 湿度 45~55% 的空调房内, 保持 12 小时昼夜节律, 并保持提供充足的水和食物。

1.1.2 主要试剂 尼达尼布脂质体(南方医科大学药剂实验室制备); 羟脯氨酸含量测定试剂盒(上海建成康美工程有限公司); Masson 染色试剂盒(北京达美吉基生物公司); PGE2 试剂盒(南京舒丽雅生物科技有限公司); YLBCR 多功能大鼠自主活动记录仪(安徽丰川正华生物仪器设备有限公司)。

1.1.3 主要仪器 紫外分光光度计(Perkin Elmer), 低温高速离心机(Hermel), 显微镜(蔡司), YLBCR 多功能大鼠自主活动记录仪(安徽丰川正华生物仪器设备有限公司), 全自动轮转式病理组织切片机(Leica RM2265)。

1.2 方 法

1.2.1 实验动物及分组 120 只 SD 大鼠随机分为以下 4 组(每组 30 只大鼠): A 组: 正常对照组, B 组: 肺纤维化模型组, C 组: 尼达尼布脂质体高剂量组, D 组: 尼达尼布脂质体低剂量组。饲养 1 周适应环境后, 用 30 mg/kg 戊巴比妥钠麻醉大鼠后, 消毒需切开部位, 行气管正中切口, 暴露气管后, A 组大鼠气管内滴注 0.2~0.3mL 生理盐水, B、C、D 三组大鼠气管内滴注同体积博来霉素(5 mg/kg), 滴注完毕后, 为使滴注药物在肺内分布均匀, 将大鼠保持直立并不断旋转 5min, 随后逐层缝合, 手术后注意伤口隔天换药预防感染。4 周后 C 组、D 组分别予以尼达尼布脂质体灌胃(40mg/kg.d, 80mg/kg.d), B 组予以 0.9%0.2mL 生理盐水灌胃。连续灌胃 4 周后处死 4 组大鼠, 注意每周重新称量老鼠体重, 调整药物灌胃剂量。

1.2.2 组织学观察 取大鼠右肺组织, 用 10% 甲醛固定, 石蜡包埋后病理组织切片机切片, 分别进行 HE 染色和 Masson 染色, 并由两位病理科医生用双人盲法采用倒置显微镜、病理图像分析仪阅片, 参照 Ashcroft 评分方法^[6], 对组织切片纤维化程度进行评分。评分细则如下: 肺组织正常, 0 分; 肺泡壁及细支气管壁轻微纤维化增厚, 1~2 分; 肺泡壁及细支气管壁中度纤维化增厚, 但不伴明显的肺结构损伤, 3~4 分; 肺泡壁及细支气管壁重度纤维化增

厚, 并伴明确的肺结构损伤, 5~6 分; 有大范围纤维化及肺结构广泛破坏, 7~8 分。

1.2.3 各组血清羟脯氨酸、前列腺素 E2 含量测定

抽取已处死大鼠右心室血液 2~5ml, 将血液样本标记后静置 2 h, 2000r/min 离心 10 分钟后, 取上清液, 置于 -20℃ 待用。血清 Hyp、PGE2 含量采用 ELISA 法测定, 操作步骤严格遵循试剂盒说明书。

1.2.4 各组自主活动次数测定 用实验功能大鼠自主活动记录仪记录测定最后一次给药 10min 后各组大鼠 5 min 内活动次数, 再用同样方法记录最后一次给药 20min、30min、40min、50min、60min 后大鼠 5min 内自主活动次数。

1.2.5 统计学分析 采用 SPSS17.0 统计软件进行统计处理, 实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间差异的显著性分析采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 有统计学意义。

2 结 果

2.1 镜下观察不同浓度尼达尼布脂质体对肺纤维化形态的影响

2.1.1 HE 染色结果 对照组大鼠肺组织结构清晰, 结构未见明显异常, 肺泡壁表面光滑, 形态清晰, 肺泡腔清晰且无渗出分泌物, 肺泡间隔未见增厚(图 1A)。与生理盐水处理对照组大鼠的正常肺泡形态相比, 气管内滴注博来霉素刺激 4 周后肺泡结构紊乱, 肺泡壁明显增厚, 白细胞大量浸润, 肺泡间隔大量胶原纤维沉积(图 1B)。尼达尼布脂质体高剂量处理的大鼠肺内可见: 与气管内滴注博来霉素 B 组大鼠相比, 肺泡、肺泡间隔仅有少量炎性细胞, 肺泡间增宽有所缓解, 肺泡间隔沉积的胶原纤维明显减少, 肺部纤维化程度显著缓解(图 1C)。尼达尼布脂质体低剂量处理的大鼠肺内可见: 与气管内滴注博来霉素 B 组大鼠相比, 肺泡、肺泡间隔有少量炎性细胞浸润, 肺泡间增宽稍有缓解, 肺泡间隔沉积的胶原纤维减少, 肺部纤维化程度有所缓解, 但未达到尼达尼布脂质体高剂量处理水平(图 1D)。

2.1.2 Masson 染色结果 正常对照组大鼠肺组织血管壁及肺泡壁可见有少量胶原纤维组织, 肺泡及肺间质则未见胶原纤维组织沉积(图 2A)。与生理盐水处理对照组大鼠的正常肺泡形态相比, 气管内滴注博来霉素刺激 4 周后, 支气管壁及肺间质可见大量胶原纤维显著增生(图 2B)。尼达尼布脂质体高剂量处理的大鼠肺内可见: 肺内血管壁及肺泡壁仅有少量的胶原纤维, 纤维化程度较正常组明显缓

解,提示高剂量尼达尼布脂质体治疗有效(图 2C)。尼达尼布脂质体低剂量处理的大鼠肺内可见:肺内血管壁少量胶原纤维增生,纤维化程度较正常组稍有缓解,但未达到尼达尼布脂质体高剂量处理水平(图 2D)。

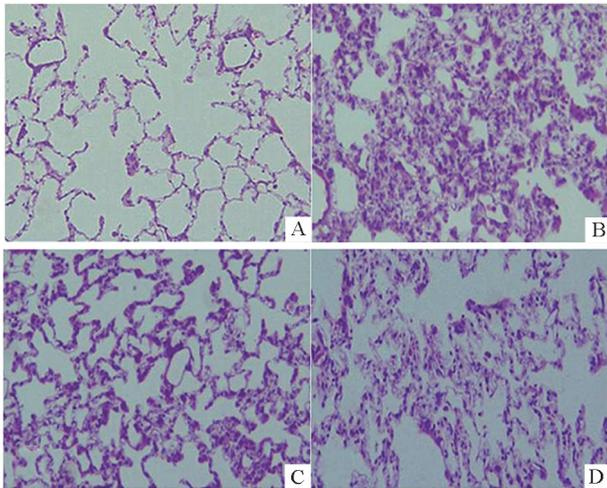


图 1 4 周后肺组织切片 HE 染色结果(100×)

A: 正常对照大鼠;B: 肺纤维化大鼠;C: 高剂量尼达尼布脂质体治疗组;D: 低剂量尼达尼布脂质体治疗组。

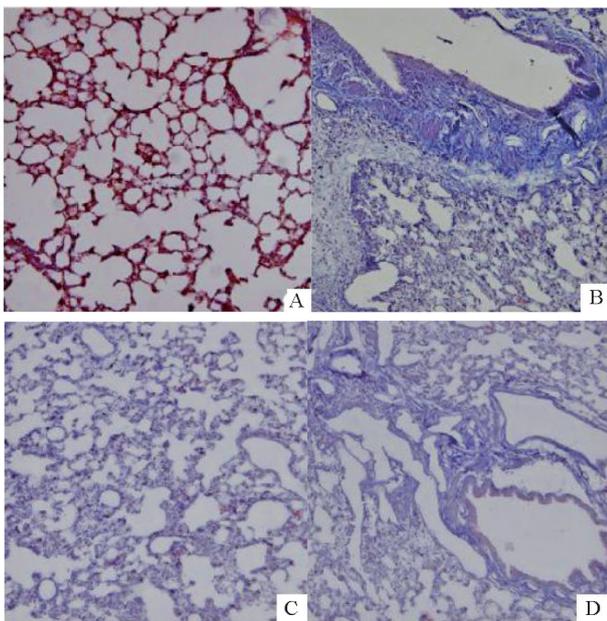


图 2 4 周后肺组织切片 Masson 染色结果(100×)

A: 正常对照大鼠;B: 肺纤维化大鼠;C: 高剂量尼达尼布脂质体治疗组;D: 低剂量尼达尼布脂质体治疗组。

2.2 各组大鼠 Aschroft 评分比较 Aschroft 评分是通过肺组织结构破坏程度及肺纤维组织增生情况

衡量评价肺组织纤维化程度评分方法。如图 3 所示,研究结果显示:B 组大鼠肺纤维评分显著高于 A 组($P<0.05$),提示 B 组大鼠肺部纤维化病变明显,且与 B 组相比,C 组和 D 组的大鼠肺纤维评分均有所降低($P<0.05$),提示用尼达尼布脂质体治疗后,C 组和 D 组大鼠肺纤维化水平有所缓解,但是高剂量尼达尼布脂质体治疗大鼠肺纤维化缓解水平优于低剂量尼达尼布脂质体治疗大鼠肺纤维化缓解水平($P<0.05$)。详见图 3。

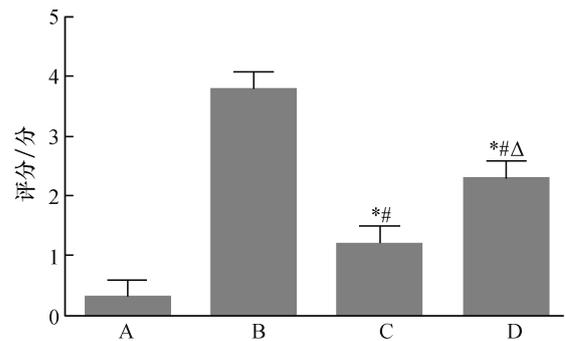


图 3 各组大鼠 Aschroft 评分比较结果

A: 正常对照大鼠;B: 肺纤维化大鼠;C: 高剂量尼达尼布脂质体治疗组;D: 低剂量尼达尼布脂质体治疗组。

与 A 组比较, * $P<0.05$;与 B 组比较, # $P<0.05$;与 C 组比较, $\Delta P<0.05$

2.3 各组血清羟脯氨酸、前列腺素 E2 水平比较

研究结果显示:B 组大鼠血清羟脯氨酸、前列腺素 E2 水平显著高于 A 组($P<0.05$),且与 B 组相比,C 组和 D 组的血清羟脯氨酸、前列腺素 E2 水平均有所降低($P<0.05$),提示用尼达尼布脂质体治疗后,C 组和 D 组大鼠肺纤维化水平有所缓解,但是高剂量尼达尼布脂质体治疗大鼠血清羟脯氨酸、前列腺素 E2 下降水平较高剂量尼达尼布脂质体下降水平大($P<0.05$)。详见图 4。

2.4 各组大鼠自主活动次数比较

研究结果显示: B 组大鼠 20min、30min、50min、后大鼠 5min 内自主活动次数均较 A 组显著增加($P<0.05$),且与 B 组相比,C 组和 D 组的大鼠 20min、30min、50min、后大鼠 5min 内自主活动次数均有所减少($P<0.05$),但是高剂量尼达尼布脂质体治疗后大鼠大鼠 20min、30min、50min、后大鼠 5min 内自主活动减少次数较低剂量尼达尼布脂质体下降水平小($P<0.05$)。提示用尼达尼布脂质体治疗肺纤维化不会影响大鼠自主活动次数,详见图 5。

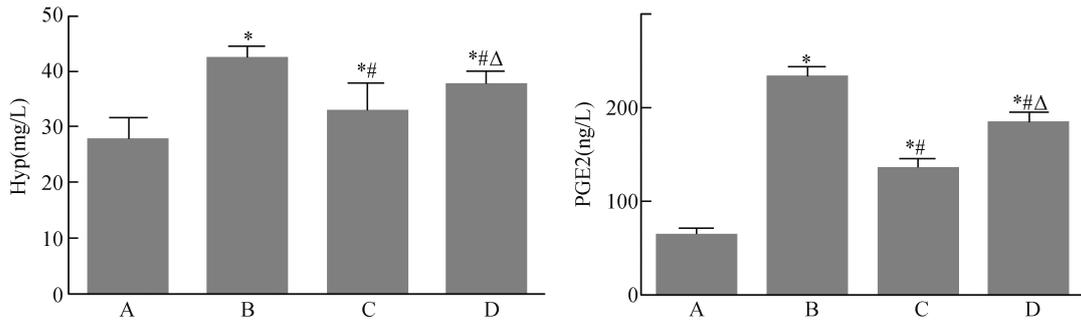


图 4 各组血清羟脯氨酸、前列腺素 E2 水平比较结果

A: 正常对照大鼠; B: 肺纤维化大鼠; C: 高剂量尼达尼布脂质体治疗组; D: 低剂量尼达尼布脂质体治疗组。

与 A 组比较, * $P < 0.05$; 与 B 组比较, # $P < 0.05$; 与 C 组比较, Δ $P < 0.05$

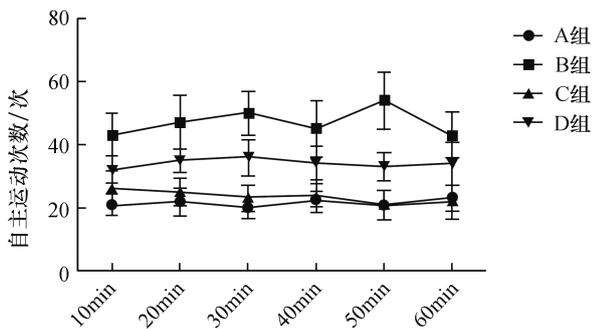


图 5 各组大鼠自主活动次数比较

A: 生理盐水治疗对照大鼠; B: 博来霉素处理的大鼠; C: 高剂量尼达尼布脂质体治疗博来霉素处理的大鼠; D: 低剂量尼达尼布脂质体治疗博来霉素处理的大鼠。

3 讨 论

肺纤维化是感染特殊病毒、长期暴露于放射环境或长期接触微溶毒素等多种原因导致的肺间质疾病晚期的共同结果。研究表明肺纤维化也是类风湿性关节炎和系统性硬化症患者的常见并发症^[7]。肺纤维化以肺泡损伤、肺间质增厚及肺泡细胞外基质持续损伤、重建和弹性纤维过度沉积,肺泡壁破损和肺泡微血管功能缺失为主要病理特点。目前临床上主要应用皮质类固醇、细胞毒药物、免疫抑制剂等进行治疗,这些药物治疗不但会引起骨髓抑制、弥漫性肺泡出血等一系列副作用,而且抗纤维化作用往往不显著,因此目前急需寻找有效防治手段。在动物实验中,可通过放射线或闭塞细支气管诱发实验性动物肺纤维化模型,但是尚不清楚上述疾病模型是否能完全模拟人类肺纤维化疾病模型^[8]。近年来,因博来霉素诱导的肺纤维化动物模型的特点与人肺纤维化临床特点高度相近,受到了研究者的广泛关注。人肺纤维化的主要病理特

征为肺泡上皮细胞损伤,成纤维细胞及细胞外基质蛋白的沉积,引起正常肺结构破坏和气体交换进行性减少^[9]。研究表明气管内滴注博来霉素会引起炎症细胞浸润导致急性肺部炎症,活化的炎症细胞和成纤维细胞可以合成并释放大量的活性氧、趋化因子、细胞因子和蛋白酶,从而导致大鼠肺部产生大量胶原蛋白进而形成纤维增生^[10]。本研究也发现,大鼠气管内滴注博来霉素 4 周后导致弥漫性肺泡间隔增厚,肺泡内可见大量渗出液,肺组织间隙大量淋巴细胞和巨噬细胞浸润,这与临床上人肺纤维化病理特征一致。

尼达尼布作为一种特殊的多重酪氨酸激酶抑制剂,可有效抑制 VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, PDGFR α , PDGFR β 及 FGFR1, FGFR2, FGFR3。VEGF 是一种同源二聚体糖蛋白,可促进血管内皮细胞增生、促进新生血管形成、增加血管通透性,研究表明 VEGF 增加可促进肺纤维化形成^[11]。PDGF 是一种可调节细胞外基质的生长因子,其可刺激肌成纤维细胞及成纤维细胞等多种细胞,合成分泌大量胶原酶,从而破坏正常肺组织内胶原纤维^[12]。研究发现 PDGF 可通过 MAPK 通路增加 I 型胶原合成,说明 PDGF 在肺纤维化发生发展中发挥重要作用^[13]。FGF 可刺激内皮细胞及成纤维细胞增殖,Englinger B 等^[14]研究发现 TGF- β 1 可介导 FGF2/ERK 信号通路促进成纤维细胞聚集,促进肺纤维化的发生。这说明在肺纤维化的发生发展过程中,FGF、VEGF、PDGF 起到了重要的促进作用,而尼达尼布可通过抑制 FGF、VEGF、PDGF 进而抑制肺纤维化的发生。脂质体是一种磷脂在水溶液中形成的微小囊泡,其结构类似于生物膜结构,其与药物结合后可作为药物载体,提高治疗药物的靶向性、稳定性,并在药物代谢吸收后可自行降解,且无毒性及免疫原性^[15]。本文发现将脂质体与尼达尼

布有效结合,可有效降低大鼠肺纤维化。

羟脯氨酸不同于普通氨基酸,是在胶原蛋白中的一种特殊氨基酸,也是胶原蛋白特有的,其含量同时也可以代表特定部位胶原的含量,故检测血清羟脯氨酸可反映大鼠肺纤维化严重程度并判断药物治疗效果。前列腺素 E2 是一种不饱和脂肪酸,是鼠和人肺泡上皮细胞内花生四烯酸代谢主要产物,其通过调节腺苷酸环化酶信号有效抑制成纤维细胞增殖,同时抑制胶原基因转录。因此检测血清前列腺素 E2 可有效判断肺部纤维化水平,评估药物治疗预后水平。与肺纤维化组大鼠相比,药物治疗组的血清羟脯氨酸、前列腺素 E2 水平均有所降低,且高剂量尼达尼布脂质体治疗大鼠血清羟脯氨酸、前列腺素 E2 下降水平较低剂量尼达尼布脂质体下降水平大。用药后的大鼠 20min、30min、50min、后大鼠 5min 内自主活动次数均有所减少,且高剂量尼达尼布脂质体治疗后大鼠 20min、30min、50min、后大鼠 5min 内自主活动减少次数较低剂量尼达尼布脂质体下降水平小。综上所述,尼达尼布脂质体能治疗肺纤维化机制可能与降低血清羟脯氨酸、前列腺素 E2 水平且自主活动次数与其剂量无关。

参考文献:

- [1] XIONG Y, ZHANG J, SHI L, et al. NOGO-B promotes EMT in lung fibrosis via MMP14 mediates free TGF-beta1 formation [J]. *Oncotarget*, 2017, 8 (41):71024-37.
- [2] SAITO S, ZHUANG Y, SHAN B, et al. Tubastatin ameliorates pulmonary fibrosis by targeting the TGFβ-PI3K-Akt pathway [J]. *PLoS One*, 2017, 12(10):0186615.
- [3] ARANGO JC, PUERTA-ARIAS JD, PINO-TAMAYO PA, et al. Impaired anti-fibrotic effect of bone marrow-derived mesenchymal stem cell in a mouse model of pulmonary paracoccidioidomycosis [J]. *PLoS Negl Trop Dis*, 2017, 11(10):0006006
- [4] SUZUKI T, TADA Y, GLADSON S, et al. Vildagliptin ameliorates pulmonary fibrosis in lipopolysaccharide-induced lung injury by inhibiting endothelial-to-mesenchymal transition [J]. *Respir Res*, 2017, 18(1):177.
- [5] FLAHERTY KR, BROWN KK, WELLS AU, et al. Design of the PF-ILD trial: a double-blind, randomised, placebo-controlled phase III trial of nintedanib in patients with progressive fibrosing interstitial lung disease [J]. *BMJ Open Respir Res*, 2017, 4 (1): 212.
- [6] 刘理静,钱红.大黄素对肺纤维化大鼠的保护作用及部分机制研究[J].*中国药理学通报*, 2015, 31(2):266-72.
- [7] 秦静,赵铭山.丹参素干预对肺纤维化大鼠 TGF-β1/Smads 信号通路的影响[J].*中国病理生理杂志*, 2013, 29(5):937-40.
- [8] OTSUKA M, SHIRATORI M, CHIBA H, et al. Treatment of pulmonary fibrosis with siRNA against a collagen-specific chaperone HSP47 in vitamin A-coupled liposomes [J]. *Exp Lung Res*, 2017, 10(16):1-12.
- [9] 刘理静,于小华.白藜芦醇通过 TGF-β1/ADAMTS-1 信号通路抑制肺纤维化[J].*中国药理学通报*, 2013, 29(3):425-31.
- [10] 潘有禄.肺纤维化发生机制及治疗研究进展[J].*中国药理学杂志*, 2012, 47(23):1873-6.
- [11] KOYAMA K, NISHIMURA H, HAYASHI S, et al. Anti-fibrotic efficacy of nintedanib in pulmonary fibrosis via the inhibition of fibrocyte activity [J]. *Respir Res*, 2017, 18(1):172.
- [12] GABASA M, IKEMORI R, HAYASHI S, et al. Nintedanib selectively inhibits the activation and tumour-promoting effects of fibroblasts from lung adenocarcinoma patients [J]. *Br J Cancer*, 2017, 117(8):1128-38.
- [13] IKEDA S, SEKINE A, BABA T, et al. Low body surface area predicts hepatotoxicity of nintedanib in patients with idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1):10811
- [14] ENGLINGER B, KALLUS S, SENKIV J, et al. Intrinsic fluorescence of the clinically approved multikinase inhibitor nintedanib reveals lysosomal sequestration as resistance mechanism in FGFR-driven lung cancer [J]. *Exp Clin Cancer Res*, 2017, 36(1):122.
- [15] 李秀英,曾凡,赵曜,等.脂质体药物递送系统的研究进展[J].*中国新药杂志*, 2014, 23(16):1904-11.

(本文编辑:秦旭平)