

• 实验研究 •

辛伐他汀联合环孢素 A 抑制小鼠异位气管移植模型闭塞性细支气管炎发生

奚吉成 张智彪 王崇军 闫正 宋颀

山西省心血管病医院心外科, 太原 030024

通信作者: 奚吉成, Email: xjch2000@163.com

【摘要】 目的 应用小鼠异位气管移植的动物模型, 在体验证辛伐他汀联合环孢素 A 对干预闭塞性细支气管炎的效果。方法 建立同种异基因小鼠异位气管移植的动物模型, 分别在术后 14、42 d 两个时间点分批取出移植气管。实验分为四组: 对照组、辛伐他汀 (SIM) 组、环孢素 A (CsA) 组、SIM + CsA 组。HE 染色观察气管上皮丢失和管腔闭塞程度, 免疫组化法观察移植气管中 CD4⁺、CD8⁺、巨噬细胞、肌成纤维细胞 (MFs) 等细胞浸润, 测定移植气管中调节激活正常 T 细胞表达和分泌细胞因子 (RANTES)、单核细胞趋化蛋白-1 (MCP-1)、基质金属蛋白酶-2 (MMP-2) 的表达, 苦味酸天狼星红染色观察气管腔中 I、III 型胶原蛋白的沉积。采用成组 *t* 检验计算组间差异。结果 辛伐他汀联合环孢素 A 能够明显抑制移植气管趋化因子 RANTES 和 MCP-1 的表达, 减少 CD4⁺、CD8⁺、Mac 等细胞浸润的数目, 减轻小鼠异位气管移植的慢性气道炎症反应, 保护气道上皮的完整性。还可以抑制 MFs 的增生, 减少 MMP-2 的合成分泌, 减少气管腔中 I、III 型胶原蛋白的沉积, 减轻气道的狭窄程度, 两者合用可以抑制闭塞性细支气管炎的发生。结论 降脂药物辛伐他汀与免疫抑制剂 CsA 合用有协同作用, 可以弥补单纯应用免疫抑制剂治疗肺移植术后闭塞性细支气管炎的不足。

【关键词】 肺移植; 胆固醇合成酶抑制剂; 环孢素 A; 闭塞性细支气管炎

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-1785.2019.09.011

Simvastatin plus cyclosporin A inhibits obliterative bronchiolitis in a murine heterotopic tracheal transplant model

Xi Jicheng, Zhang Zhibiao, Wang Chongjun, Yan Zheng, Song Di

Department of Cardiac Surgery, Shanxi Cardiovascular Hospital, Taiyuan 030024, China

Corresponding author: Xi Jicheng, Email: xjch2000@163.com

【Abstract】 **Objective** To explore the effect of simvastatin combined with cyclosporin A treatment on the development of obliterative bronchiolitis in a murine heterotopic tracheal transplantation model. **Methods** Murine tracheae were heterotopically transplanted from BALB/c donors into C57BL/6 recipients. Transplanted animals received either control chow, chow containing simvastatin, chow containing cyclosporine A, or chow containing simvastatin and cyclosporine A, beginning immediately after transplantation. Epithelial loss and luminal obstruction were analyzed by morphometry. Immunohistochemistry assay was used for quantifying inflammatory cell infiltration and expression of chemokine in tracheal allografts. collagen deposition was studied by picro sirius red staining. Group *t* test was used to calculate the difference between groups. **Results** simvastatin combined with cyclosporin A treatment reduced chemokine (MCP-1, RANTES) release, inhibited CD4⁺ and CD8⁺ T cells and macrophages accumulation in tracheal allografts, resulting in limited bronchial inflammation and diminished epithelial loss. simvastatin plus cyclosporin A treatment also inhibited proliferation of myofibroblast cells, reduced MMP-2 release and decreased the amounts of type I and III collagen deposition, resulting in preserved luminal patency and inhibited development of OB compared with those of controls. **Conclusions** When simvastatin was used in combination with CsA, the development of OB was significantly inhibited.

【Key words】 Lung transplantation; Statin; Cyclosporin A; Bronchiolitis obliterans

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-1785.2019.09.011

闭塞性细支气管炎 (OB) 严重影响肺移植受术后的存活率和生活质量, 目前临床治疗效果不佳。近年来研究表明, 他汀类药物可以通过阻断甲羟戊

酸的合成, 抑制某些膜联结蛋白的翻译后修饰, 从而阻断某些细胞内信号传导通路, 有强大的抗炎作用并能抑制多种细胞的增殖^[1-2]。我们之前的体外实

验已经证实辛伐他汀的这些功能,有可能用于干预 OB 病理过程中的多个环节。本实验旨在应用小鼠异位气管移植的动物模型,在体验证辛伐他汀对 OB 干预的效果。并将其与环孢素 A 联合应用,检验其是否可以弥补单纯应用免疫抑制剂治疗 OB 的不足。以此来探讨肺移植受者术后闭塞性细支气管炎的临床治疗新方法。

材料与方法

一、实验动物与试剂

1. 动物:纯系 BALB/c 和 C57BL/6 小鼠,雄性,5~7 周龄,体重 18~20 克,北京维通利华实验动物技术有限公司提供。所有动物实验操作均遵循实验动物伦理条例。

2. 药品和试剂:辛伐他汀为浙江京新药业股份有限公司产品,环孢素 A 胶囊为杭州中美华东制药有限公司产品, α -actin、CD4、CD8、CD68 多克隆抗体为武汉博士德公司产品;SP 试剂盒为福州迈新公司产品。

二、方法

1. 动物模型的建立: BALB/c 小鼠以 1% (质量分数) 的戊巴比妥钠 (100 mg/kg) 腹腔注射麻醉,皮肤碘伏消毒,前正中切口,切下甲状软骨下缘至肺门水平的支气管,生理盐水冲洗后备用。C57BL/6 小鼠以 1% 的戊巴比妥钠 (50 mg/kg) 腹腔注射麻醉,在头下背部备皮 1.0 cm × 1.0 cm。皮肤碘伏消毒,切一长约 3 mm 的横切口,向下用血管钳分离一约 1.5 cm × 1.5 cm 的皮下隧道,放入供体支气管,缝合皮肤切口。注意保温,麻醉清醒后隔笼放置。

2. 实验分组:

对照组 ($n = 10$): 口服相同体积的生理盐水

SIM 组 ($n = 10$): 口服 SIM (25 mg · kg⁻¹ · d⁻¹)

CsA 组 ($n = 10$): 口服 CsA (50 mg · kg⁻¹ · d⁻¹)

SIM + CsA 组 ($n = 10$): 口服 SIM (25 mg · kg⁻¹ · d⁻¹) + CsA (50 mg · kg⁻¹ · d⁻¹)

3. 移植气管取材及固定: 在术后 14、42 d 分两批处死动物, 每组每批 5 只, 迅速取出移植于背部皮下的支气管。留取 5 mm 段支气管予 10% (体积分数) 磷酸缓冲液 (PBS) 缓冲甲醛固定, 10~24 h 后常规脱水、浸蜡、包埋, 制成腊块后室温保存。余段分置 Ependroff 管后液氮罐内储存。

4. 气管标本的病理组织学染色: (1) 苏木素-伊红 (HE) 染色按常规操作, BH2 光学显微镜观察形态学变化并照像。利用 Image Pro Plus 4.0 多功能真彩色

病理图像分析系统测定上皮丢失程度 (气管腔内环状面无上皮区长度占气管腔内环状面周径长度的百分比) 及管腔闭塞程度 (气管内部的组织所占的面积占气管内部总面积的百分比)。(2) 用 0.1% (质量分数) 苦味酸天狼星红染色 1 h, Harris 苏木素复染。天狼星红切片在偏振光学显微镜观察和照像, 并用病理图像分析系统进行定量分析, 测定二维图像中胶原蛋白成份的积分光密度。

5. 气管标本的免疫组化检测: 石蜡切片常规脱蜡至水, 然后按 SP 试剂盒说明书进行操作。一抗的工作浓度为 1:50, 二抗的工作浓度为 1:100, AEC 显色, 苏木素轻度复染, 专用封片剂封片。每张切片于阳性表达区选取 10 个视野, 由 IPP 真彩色图像分析系统进行定量分析。对于 CD4⁺、CD8⁺、Mac、MFs 等细胞, 分别测定并计算其阳性细胞数目总和。对于 RANTES、MCP-1、MMP-2 等指标, 测定积分光密度和平均光密度值。

三、统计学处理

数据用 SPSS 13.0 软件处理。各数据以 Mean ± SD 表示; 组间差异比较采用成组 *t* 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

结 果

一、组织学形态学分析结果

经显微镜行病理组织形态学观察, 对照组在术后 14 d 取出的移植气管, 有大量炎性细胞浸润引起黏膜下层肿胀。其上皮层的有坏死、破裂、剥脱, 伴有残存的上皮细胞出现纤毛消失、变得扁平及鳞状上皮化生等异常。在术后 42 d 取出的移植气管, 浸润的炎性细胞有所减少。但有大量的肉芽组织向管腔内增生, 气管腔几乎完全闭塞, 部分地方开始形成致密的纤维瘢痕组织。在使用 CsA、SIM 等药物干预后, 上述情况得到改善, 气管管腔闭塞有不同程度的减轻。以 CsA + SIM 组的管腔闭塞最轻 (表 1, 图 1)。

二、药物干预对趋化因子及炎性细胞浸润的影响结果

对照组在术后 14 d 取出的移植气管, 免疫组化染色显示有大量 CD4⁺、CD8⁺、Mac 炎性细胞浸润, 趋化因子 RANTES、MCP-1 表达量增多, 其阳性部位主要在上皮细胞及浸润的 Mac 细胞处。在术后 42 d 时浸润的 CD4⁺、CD8⁺ 细胞有所减少, 而 Mac 细胞仍然维持在较高的水平。在使用 CsA、SIM 等药物干预后, 趋化因子 RANTES、MCP-1 表达量减

表 1 各组植入后 14、42 d 上皮细胞脱落和管腔闭塞程度的比较(%, Mean ± SD)

分组	例数	植入后 14 d		植入后 42 d	
		上皮脱落程度	管腔闭塞程度	上皮脱落程度	管腔闭塞程度
对照组	10	45.3 ± 5.1	13.4 ± 3.3	98.2 ± 1.8	96.4 ± 4.3
CsA 组	10	27.2 ± 4.3 ^a	8.5 ± 2.2	97.2 ± 3.3	72.7 ± 7.2 ^a
SIM 组	10	33.7 ± 6.4 ^a	10.8 ± 3.5	97.7 ± 2.4	85.5 ± 6.5 ^a
CsA + SIM 组	10	11.3 ± 3.1 ^{abc}	8.8 ± 4.4	97.6 ± 2.1	55.7 ± 8.4 ^{abc}

注:^a与对照组相比 $P < 0.05$; ^b与 CsA 组相比 $P < 0.05$; ^c与 SIM 组相比 $P < 0.05$; CsA 为环孢素 A; SIM 为辛伐他汀

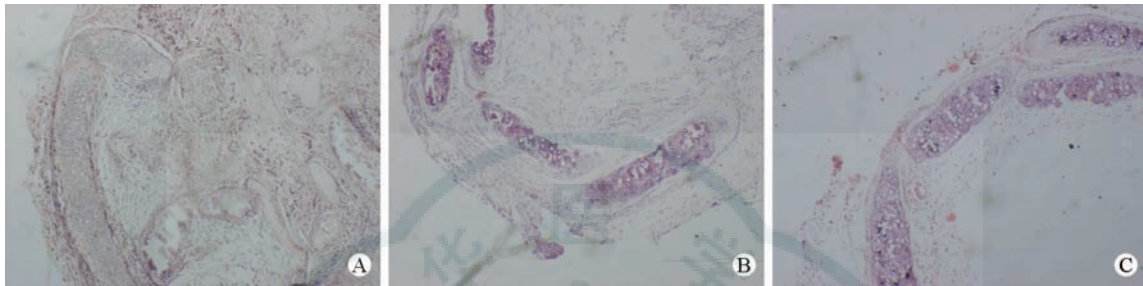


图 1 各组移植 42 天后气管 HE 染色(200×) A 为对照组; B 为 CsA 组; C 为 CsA + SIM 组
注: CsA 为环孢素 A; SIM 为辛伐他汀

少,浸润植入气管的炎性细胞有不同程度的减少,特别是在炎症反应的高峰期术后 14 d 时,可以明显减轻移植气管的炎症反应。以 CsA + SIM 联合应用的效果最好(表 2、3)。

表 2 术后 14 d 各组组趋化因子 RANTES、MCP-1 平均光密度值(Mean ± SD)

分组	例数	RANTES	MCP-1
对照组	10	0.412 ± 0.041	0.387 ± 0.033
CsA 组	10	0.304 ± 0.037 ^a	0.283 ± 0.038 ^a
SIM 组	10	0.336 ± 0.038 ^a	0.323 ± 0.025 ^a
CsA + SIM 组	10	0.218 ± 0.026 ^{abc}	0.206 ± 0.031 ^{abc}

注:^a与对照组相比 $P < 0.05$; ^b与 CsA 组相比 $P < 0.05$; ^c与 SIM 组相比 $P < 0.05$; RANTES 为分泌细胞因子; MCP-1 为单核细胞趋化蛋白-1

表 3 各组植入后 14、42 d 炎性细胞浸润情况比较(Mean ± SD)

分组	例数	植入后 14 d				植入后 42 d			
		CD4 ⁺	CD8 ⁺	巨噬细胞	MFs	CD4 ⁺	CD8 ⁺	巨噬细胞	MFs
对照组	10	311.8 ± 24.1	384.5 ± 21.8	128.3 ± 14.4	38.5 ± 4.4	128.1 ± 14.1	107.5 ± 11.7	138.4 ± 14.6	178.7 ± 21.2
CsA 组	10	231.8 ± 16.8 ^a	314.5 ± 22.3 ^a	89.4 ± 9.6 ^a	27.2 ± 3.8 ^a	85.1 ± 9.3 ^a	74.8 ± 9.1 ^a	97.6 ± 11.2 ^a	124.2 ± 16.5 ^a
SIM 组	10	267.2 ± 12.4 ^a	350.8 ± 15.9 ^a	101.5 ± 13.5 ^a	30.2 ± 4.8 ^a	102.7 ± 11.3 ^a	86.7 ± 7.5 ^a	113.7 ± 11.9 ^a	145.4 ± 13.6 ^a
CsA + SIM 组	10	191.8 ± 14.1 ^{abc}	256.5 ± 16.4 ^{abc}	71.2 ± 8.5 ^{abc}	20.1 ± 4.1 ^{abc}	66.4 ± 7.1 ^{abc}	55.6 ± 6.4 ^{abc}	73.8 ± 7.7 ^{abc}	97.8 ± 10.2 ^{abc}

注: MFs 为肌成纤维细胞, ^a与对照组相比 $P < 0.05$; ^b与 CsA 组相比 $P < 0.05$; ^c与 SIM 组相比 $P < 0.05$

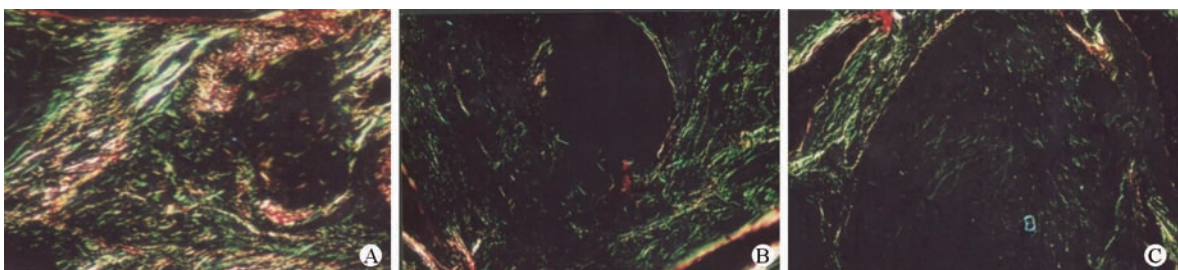


图 2 各组移植 42 天后气管天狼星红胶原蛋白染色(200×) A 为对照组; B 为 CsA 组; C 为 CsA + SIM 组

三、药物干预对细胞增生及胶原蛋白沉积的影响

对照组在术后 42 d 取出的移植气管,免疫组化染色显示 MMP-2 表达量增多,其阳性部位主要在管腔肌成纤维细胞增生处。天狼星红染色显示在管腔中有大量的 I、III 型胶原蛋白沉积,导致气管管腔闭塞。在使用 CsA、SIM 等药物干预后, MMP-2 表达量减少,气管管腔闭塞有不同程度的减轻,气管腔中的 I、III 型胶原蛋白沉积也明显减少。以 CsA + SIM 组的管腔闭塞最轻。(表 4,图 2)。

四、各组 MMP-2 免疫组化染色

对照组、CsA 组和 CsA + SIM 组 MMP-2 免疫组化染色结果见表 4。

表 4 各组植入后 42 d 时苦味酸天狼星红胶原蛋白染色 MMP-2 表达情况比较 (Mean ± SD)

分组	例数	植入 42 d 狼星红染色 (IOD)	植入 42 d MMP-2 (MOD)
对照组	10	54 753 ± 4 257	0.328 ± 0.032
CsA 组	10	40 201 ± 5 105 ^a	0.231 ± 0.033 ^a
SIM 组	10	47 503 ± 2 891 ^a	0.261 ± 0.028 ^a
CsA + SIM 组	10	28 837 ± 3 485 ^{abc}	0.168 ± 0.029 ^{abc}

注: MMP-2 为基质金属蛋白酶-2; ^a与对照组相比 $P < 0.05$; ^b与 CsA 组相比 $P < 0.05$; ^c与 SIM 组相比 $P < 0.05$; IOD 为积分光密度; MOD 为平均光密度; MMP-2 为基质金属蛋白酶-2

讨 论

肺移植术后闭塞性细支气管炎 (OB) 是移植肺慢性功能丧失的主要原因^[3]。加大免疫抑制的强度有可能使病情暂时稳定, 在一段时间内减慢第一秒用力呼气容积 (FEV₁) 降低的速度, 但最终不能避免病情的不断恶化。其原因有如下几点: (1) 为避免长期大剂量免疫抑制剂治疗的副作用, 治疗方案大多是冲击疗法, 一旦停药, 容易病情复发; (2) 加大免疫抑制强度对气道纤维化增生病变没有作用。辛伐他汀是临床治疗高脂血症常用药, 安全性高。近年来研究表明, 他汀类药物有强大的抗炎作用并能抑制多种细胞的增殖。其作用机理与免疫抑制剂不同, 不会增加免疫抑制后的副作用。在本实验中我们应用小鼠异位气管移植的动物模型, 在体验证辛伐他汀对 OB 的干预效果, 并将其与 CsA 联合应用, 检验其是否可以弥补单纯应用免疫抑制剂治疗 OB 的不足。

慢性免疫炎性损伤是 OB 发病的启动环节, 气道上皮细胞在移植肺的慢性免疫排斥反应中是重要的靶细胞^[4], 气道上皮细胞的损伤脱落在 OB 的病理过程中起着关键的作用^[5]。在 OB 的慢性气道炎症反应过程中, 有大量炎性细胞浸润至移植气管, 包括 CD4⁺、CD8⁺、NK、Mac 等细胞^[6]。我们在体实验使用 CsA、SIM 等药物干预后, 可以保护气道上皮, 避免其坏死脱落, 并减轻炎性细胞在移植气管中的浸润聚集。免疫组化结果也显示干预组移植气管中浸润的 CD4⁺、CD8⁺、Mac 等细胞的数目减少。尤以 CsA + SIM 组的结果最好。辛伐他汀能减轻炎性细胞的浸润, 可以保护上皮细胞的完整性和减轻气道闭塞性改变。

炎性细胞募集和滞留在气道炎症反应的调控中起着关键的作用, 该过程中趋化因子的作用不可忽视^[7]。无论是在动物模型还是在临床肺移植 OB 受者的支气管肺泡灌洗液中, 均已发现多种趋化因子

的增高^[8-9]。Naidu 等^[10]应用具有广谱的作用的趋化因子阻断剂达到了保护气道上皮、减轻炎症反应及气道闭塞程度的效果。本实验发现辛伐他汀可以抑制移植气管的 RANTES 和 MCP-1 蛋白的表达。而且在体外细胞实验中已经证实辛伐他汀可以减少 IL- β 、TNF- α 和 INF- γ 诱导上皮细胞和平滑肌细胞的 RANTES 和 MCP-1 蛋白的表达, 这可能是其抑制炎性细胞浸润, 发挥抗炎作用、减轻气道上皮细胞损伤脱落的机理。

OB 的纤维化增生期主要的病理表现为间质细胞增生和其结缔组织产物在支气管腔中积累, 最终导致细小支气管部分或完全闭塞^[3]。在该过程中参与的介质包括许多致纤维化细胞因子, 可以促进平滑肌细胞和成纤维细胞增生、细胞外基质沉积和过度的纤维化^[11]。吡非尼酮是一种广谱抗纤维化的药物, 可以下调 TGF- β 的表达, 减少细胞外胶原蛋白的沉积。McKane 等^[12]发现吡非尼酮能抑制小鼠异位气管移植模型闭塞性细支气管炎的发生。我们的实验结果显示辛伐他汀具有抗成纤维细胞增殖及合成细胞外基质的作用。在体外实验我们已经证明了辛伐他汀可以明显抑制碱性纤维细胞生长因子 (bFGF) 诱导气道平滑肌细胞 (ASMC) 和肺成纤维细胞 (LFs) 细胞的生长和增殖, 同时减少其胶原蛋白的合成。所以辛伐他汀的抗增殖作用也可以减轻 OB 在纤维化增生期的气道闭塞程度。

本实验还发现对照组在术后 42 d 取出的移植气管, 免疫组化染色显示 MMP-2 表达量增多, 其阳性部位主要在管腔中增生的纤维结缔组织, 该部位正是肌成纤维细胞大量迁移增生处。通常认为 MMP-2 参与 IV 型胶原蛋白的降解及细胞的迁移。这反应了炎性因子刺激导致 MFs、ASMC 等细胞浸润迁移能力增强^[13]。应用辛伐他汀干预可以减少 MMP-2 的合成分泌, 会抑制 BSMC 和 LFs 粘附、迁移生长, 降低其对细胞外基质重建的能力, 减轻气道的狭窄。

我们在体药物干预实验说明, 辛伐他汀具有抗炎抗增殖的作用。能够减轻小鼠异位气管移植的慢性气道炎症反应及气道纤维化增生, 与免疫抑制剂 CsA 合用有协同作用, 可以抑制 OB 的发生, 可以弥补单纯应用免疫抑制剂治疗 OB 的不足。对于辛伐他汀联合 CsA 能否对 OB 有满意的疗效还有待于进一步的临床验证。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参 考 文 献

- [1] Weitz-Schmidt G. Statins as anti-inflammatory agents [J]. Trends Pharmacol Sci, 2002, 23(10): 482-486. DOI: 10.1016/S0165-6147(02)02077-1.
- [2] Johnson MD, Woodard A, Okediji EJ, et al. Lovastatin is a potent inhibitor of meningioma cell proliferation; evidence for inhibition of a mitogen associated protein kinase [J]. J Neurooncol, 2002, 56 (2): 133-142. DOI: 10.1023/a:1014588214966.
- [3] Martinu T, Howell DN, Davis RD, et al. Pathologic correlates of bronchiolitis obliterans syndrome in pulmonary retransplant recipients[J]. Chest, 2006, 129(4): 1016-1023. DOI: 10.1378/chest.129.4.1016.
- [4] Fernández FG, Jaramillo A, Chen C, et al. Airway epithelium is the primary target of allograft rejection in murine obliterative airway disease [J]. Am J Transplant, 2004, 4 (3): 319-325. DOI: 10.1111/j.1600-6143.2004.00333.x.
- [5] Okazaki M, Gelman AE, Tietjens JR, et al. Maintenance of airway epithelium in acutely rejected orthotopic vascularized mouse lung transplants[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2007, 37(6): 625-630. DOI: 10.1165/rcmb.2007-0257RC.
- [6] Kuo E, Bharat A, Dharmarajan S, et al. Animal models for bronchiolitis obliterans syndrome following human lung transplantation[J]. Immunol Res, 2005, 33(1): 69-81. DOI: 10.1385/IR.33.1:069.
- [7] Fan L, Benson HL, Vittal R, et al. Neutralizing IL-17 prevents obliterative bronchiolitis in murine orthotopic lung transplantation[J]. Am J Transplant, 2011, 11 (5): 911-922. DOI: 10.1111/j.1600-6143.2011.03482.x.
- [8] Bharat A, Kuo E, Steward N, et al. Immunological link between primary graft dysfunction and chronic lung allograft rejection [J]. Ann Thorac Surg, 2008, 86(1): 189-195. DOI: 10.1016/j.athoracsur.2008.03.073.
- [9] Belperio JA, Keane MP, Burdick MD, et al. Critical role for CXCR3 chemokine biology in the pathogenesis of bronchiolitis obliterans syndrome[J]. J Immunol, 2002, 169(2): 1037-1049. DOI: 10.4049/jimmunol.169.2.1037.
- [10] Naidu BV, Farivar AS, Krishnadasan B, et al. Broad-spectrum chemokine inhibition ameliorates experimental obliterative bronchiolitis[J]. Ann Thorac Surg, 2003, 75 (4): 1118-1122. DOI: 10.1016/S0003-4975(02)04758-6.
- [11] Ramirez AM, Shen Z, Ritzenthaler JD, et al. Myofibroblast transdifferentiation in obliterative bronchiolitis: TGF-beta signaling through Smad3-dependent and -independent pathways [J]. Am J Transplant, 2006, 6(9): 2080-2088. DOI: 10.1111/j.1600-6143.2006.01430.x.
- [12] McKane BW, Fernandez F, Narayanan K, et al. Pirfenidone inhibits obliterative airway disease in a murine heterotopic tracheal transplant model[J]. Transplantation, 2004, 77 (5): 664-669. DOI: 10.1097/01.TP.0000113162.48048.AA.
- [13] Banerjee B, Ling KM, Sutanto EN, et al. The airway epithelium is a direct source of matrix degrading enzymes in bronchiolitis obliterans syndrome [J]. J Heart Lung Transplant, 2011, 30 (10): 1175-1185. DOI: 10.1016/j.healun.2011.06.007.

(收稿日期: 2019-03-13)

中华医学学会