

基础研究

DOI:10.13406/j.cnki.cyx.003152

右美托咪定对博莱霉素诱导的肺纤维化小鼠 TLR4/MyD88 信号通路的影响

余 丹, 陈彰强, 彭晓红

(武汉市第四医院麻醉科, 武汉 430033)

【摘要】目的:探究右美托咪定(dexmedetomidine, DEX)对博莱霉素(bleomycin, BLM)诱导的肺纤维化小鼠的保护作用以及对 Toll 样受体 4/髓样分化因子 88(toll-like receptor 4/myeloid differentiation factor 88, TLR4/MyD88)信号通路的影响。**方法:**通过注射 BLM 诱导实验性小鼠肺纤维化。将小鼠分为生理盐水(Sham)组、BLM 组、BLM+DEX 组、BLM+PFD 组和 BLM+DEX+LPS 组。苏木素-伊红(hematoxylin and eosin, HE)染色和 Masson 染色分析肺组织病理学变化;免疫组织化学检测纤连蛋白(fibronectin, Fn)、 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)和 I 型胶原蛋白(collagen I)表达情况;原位缺口末端标记法(TdT mediated dUTP nick end labeling, TUNEL)检测肺组织中细胞凋亡;检测支气管肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)中总细胞数量及蛋白质含量;Western blot 检测肺组织中 TLR4/MyD88 信号通路和细胞凋亡相关蛋白水平。**结果:**与 Sham 组相比, BLM 刺激后肺组织中肺泡炎评分[(2.56 ± 0.24)分 vs. (0.15 ± 0.02)分]和 Ashcroft 评分[(5.68 ± 0.52)分 vs. (0.09 ± 0.01)分]明显增高, Fn[(63.63 ± 5.48)% vs. (25.12 ± 2.16)%], α -SMA[(58.63 ± 5.03)% vs. (17.56 ± 1.25)%]和 collagen I [(55.32 ± 5.16)% vs. (12.03 ± 1.20)%]表达升高($P < 0.05$), 肺部炎症程度和纤维化程度增加;同时 TUNEL 阳性细胞率增高, 细胞中 bcl-2 相关 X 蛋白(bcl-2 associated X protein, Bax)水平增高, B 淋巴细胞瘤-2 蛋白(B-cell lymphoma-2 protein, Bcl-2)水平降低($P < 0.05$);BALF 中总细胞数量[(3.54 ± 0.06) × 10⁵ 个/mL vs. (0.98 ± 0.07) × 10⁵ 个/mL]和蛋白质含量[(2.85 ± 0.20) mg/mL vs. (0.29 ± 0.03) mg/mL]升高($P < 0.05$);肺组织中 TLR4 和 MyD88 蛋白水平升高($P < 0.05$)。DEX 治疗可减轻 BLM 诱导的小鼠肺纤维化和炎症, 降低 TUNEL 阳性细胞率, 并逆转 Fn、 α -SMA、collagen I、Bax 和 Bcl-2 表达($P < 0.05$);同时 DEX 也降低 BLM 诱导的小鼠 BALF 中总细胞数量和蛋白质含量($P < 0.05$)。此外, DEX 降低 BLM 诱导的小鼠肺组织中 TLR4 和 MyD88 蛋白水平($P < 0.05$)。吡非尼酮(pirfenidone, PFD)与 DEX 具有相似的作用效果。脂肪酶(lipase, LPS)可以部分逆转 DEX 对 BLM 诱导的肺纤维化小鼠保护作用($P < 0.05$)。**结论:**DEX 可能通过抑制 TLR4/MyD88 信号通路改善 BLM 诱导的小鼠肺纤维化。

【关键词】右美托咪定;博莱霉素;肺纤维化;TLR4/MyD88 信号通路**【中图分类号】**R614.1;R969.4**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2022-04-18

Impacts of dexmedetomidine on TLR4/MyD88 signaling pathway in bleomycin-induced pulmonary fibrosis mice

Yu Dan, Chen Zhangqiang, Peng Xiaohong

(Department of Anesthesiology, Wuhan Fourth Hospital)

【Abstract】Objective: To investigate the protective effect of dexmedetomidine (DEX) on bleomycin (BLM)-induced pulmonary fibrosis in mice and its effect on toll-like receptor 4/myeloid differentiation factor 88 (TLR4/MyD88) signaling pathway. **Methods:** Experimental mouse pulmonary fibrosis was induced by injection of BLM. The mice were grouped into: saline (Sham) group, BLM group, BLM+DEX group, BLM+PFD group, and BLM+DEX+LPS group. The pathological changes of lung tissue were analyzed by hematoxylin and eosin (HE) and Masson staining; the expression of fibronectin (Fn), α -smooth muscle actin (α -SMA) and type I collagen (collagen I) was measured by immunohistochemistry; the apoptosis in lung tissue was measured by TdT mediated dUTP nick end labeling (TUNEL); the total cell number and protein content in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) were measured; and the TLR4/MyD88

作者介绍: 余 丹, Email: danyu1029@163.com,

研究方向: 麻醉药物相关作用机制研究。

通信作者: 彭晓红, Email: pxhong01@hotmail.com。

基金项目: 武汉市卫生计生委科研计划资助项目(编号: WX21B10)。

优先出版: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20230109.0957.005.html>

(2023-01-10)

signaling pathway and apoptosis-related protein levels in lung tissue were detected by Western blot. **Results:** Compared with the Sham group, the alveolitis score[(2.56 ± 0.24) points vs. (0.15 ± 0.02) points] and Ashcroft score[(5.68 ± 0.52) points vs. (0.09 ± 0.01) points] in lung tissue after BLM stimulation increased

significantly, the expression of Fn[(63.63 ± 5.48)% vs.(25.12 ± 2.16)%], α -SMA[(58.63 ± 5.03)% vs.(17.56 ± 1.25)%] and collagen I [(55.32 ± 5.16)% vs.(12.03 ± 1.20)%] increased ($P < 0.05$), and the degrees of lung inflammation and fibrosis increased. Meantime, the rate of TUNEL positive cells increased, the level of bcl-2 associated X protein (Bax) protein in the cells increased, and the level of B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) protein decreased ($P < 0.05$); the total cell number [(3.54 ± 0.06) × 10⁵/mL vs.(0.98 ± 0.07) × 10⁵/mL] and protein content [(2.85 ± 0.20) mg/mL vs.(0.29 ± 0.03) mg/mL] increased in BALF ($P < 0.05$); the protein levels of TLR4 and MyD88 in lung tissue were increased ($P < 0.05$). DEX treatment attenuated BLM-induced pulmonary fibrosis and inflammation in mice, decreased the rate of TUNEL-positive cells, and reversed the expression of Fn, α -SMA, collagen I, Bax and Bcl-2 ($P < 0.05$); meanwhile, DEX also decreased the total cell number and protein content in BLM-induced mouse BALF ($P < 0.05$); in addition, DEX reduced TLR4 and MyD88 protein levels in BLM-induced mouse lung tissue ($P < 0.05$). Pirfenidone (PFD) and DEX had similar effects; lipase (LPS) was able to partially reverse the protective effect of DEX on BLM-induced pulmonary fibrosis in mice ($P < 0.05$). **Conclusion:** DEX may improve BLM-induced pulmonary fibrosis in mice by inhibiting TLR4/MyD88 signaling pathway.

[Key words] dexmedetomidine; bleomycin; pulmonary fibrosis; TLR4/MyD88 signaling pathway

特发性肺纤维化 (idiopathic pulmonary fibrosis, IPF) 是一种慢性进行性纤维化间质性肺炎, 其特征是呼吸困难和肺功能不可逆丧失。IPF 是 150 多种公认类型中最常见和最危及生命的间质性肺病之一。IPF 的中位生存期仅 3~5 年, 其发病率在全球范围内逐渐增加^[1-2]。目前, IPF 的病因和发病机制尚未确定。因此, 可用的治疗方法和选择非常有限。目前, 已知治疗 IPF 的有效药物是吡非尼酮 (pirfenidone, PFD) 和尼达尼布^[3]。然而, 这些药物只能延缓患者肺功能恶化, 迫切需要针对这种致命疾病的创新治疗策略。已经证明, 缺乏 Toll 样受体 4 (Toll like receptor 4, TLR4) 的小鼠会表现更严重的纤维化表型和细胞表面透明质酸下调, 且在 IPF 患者中得到证实^[4]。当 TLR4 被激活时, 可以募集髓样分化因子 (myeloid differentiation factor 88, MyD88) 以介导促炎因子释放^[5]。据报道, 在纤维化过程早期, 通过 TLR4/MyD88 信号通路抑制炎症可以有效改善肺纤维化^[6]。因此, TLR4/MyD88 通路可能在 IPF 治疗中表现出至关重要的潜力。右美托咪定 (dexmedetomidine, DEX) 是一种 α 2A-肾上腺素能受体激动剂, 因其独特的镇静能力而广泛用于临床^[7]。据报道, DEX 对肺损伤具有保护作用^[8]; 且已有研究证实, DEX 可通过上调连接蛋白 43 抑制炎症和心肌纤维化, 表明 DEX 具有抗炎特性和抗纤维化作用^[9]。然而, DEX 对肺纤维化的潜在影响尚未得到很好的研究。

综上所述, DEX 可以通过调控 TLR4/MyD88 通路来治疗肺纤维化。本研究将观察 DEX 的抗肺纤维化作用, 并对其潜在机制进行探究。

1 材料与方法

1.1 实验材料

博来霉素 (bleomycin, BLM; HY-17565A, 纯度 98.81%)、DEX (HY-12719, 纯度 99.0%)、PFD (HY-B0673, 纯度 99.95%) 获自美国 MedChemExpress; TLR4 激动剂 LPS (L6529, 来源于 O55:B5) 获自美国 Sigma-Aldrich; 苏木素-伊红 (hematoxylin and eosin, HE) 染色试剂盒 (SOS-319)、Masson 三色染色试剂盒 (SOS-376)、原位缺口末端标记法 (TdT mediated dUTP nick end labeling, TUNEL) 细胞凋亡检测试剂盒 (T07-2194) 获自北京凯诗源; 0.4% 台盼蓝染液 (C0040)、二喹啉甲酸 (bicinchoninic acid, BCA) 蛋白质浓度测定试剂盒 (PC0020) 获自北京 Solarbio; 一抗: 纤连蛋白 (fibronectin, Fn; ab2413)、 α -平滑肌肌动蛋白 (α -smooth muscle actin, α -SMA; ab124964) 和 I 型胶原蛋白 (collagen I; ab21286)、B 淋巴细胞瘤-2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2; ab32124)、bcl-2 相关 X 蛋白 (bcl-2 associated X protein, Bax; ab182733)、TLR4 (ab218987)、MyD88 (ab219413) 和 α -Tubulin (ab7291) 均获自英国 Abcam。

1.2 实验方法

1.2.1 实验分组与处理 所有动物实验均经本医院动物伦理委员会批准, 伦审字 KY2021-054-02 号。8 周大的 ICR 小鼠购自武汉大学动物实验中心, 实验动物生产许可证号: SCXK (鄂) 2019-0004, 饲养在本院无特定病原体 (specific pathogen free, SPF) 级动物房, 随意进食和饮水。

将 40 只小鼠随机分为以下 5 组, 每组 8 只: 生理盐水 (Sham) 组、BLM 组、BLM+DEX 组 [80 μ g/(kg·d) DEX]^[10]、BLM+PFD 组 [300 mg/(kg·d) PFD]^[11] 和 BLM+DEX+LPS 组 [80 μ g/(kg·d) DEX+200 μ g/(kg·d) LPS]^[12]。第 1 天通过尾静脉单次注射 10 mg/kg BLM^[13], 构建肺部纤维化模型。灌胃给药 28 d。第 28 天处理所有小鼠。收集肺组织、支气管肺泡灌

洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF),并储存备用。

1.2.2 组织病理学 收集肺组织,部分组织在液氮中快速冷冻,部分组织固定在 10%福尔马林缓冲液中,包埋在石蜡中,并切成 4 μm 切片。切片完全脱蜡和再水化。按照制造商的方案进行 HE 染色和 Masson 染色。分别使用肺泡炎评分和 Ashcroft 评分^[14]评估肺部炎症和纤维化。

1.2.3 免疫组织化学 对于免疫组织化学染色,肺组织切片脱蜡后通过梯度乙醇再水化,使用乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA)溶液在微波炉中加热 20 min 进行抗原修复,内源性过氧化物酶活性的抑制使用 0.3%过氧化氢黑暗封闭 15 min。5%山羊血清封闭 20 min。将切片在 4℃下与一级抗体(Fn、 α -SMA 和 collagen I)孵育过夜。第 2 天,载玻片进一步用二抗和二氨基联苯胺(diaminobenzidine, DAB)染色。显微镜下捕捉图像并使用 Image-Pro Plus 进行量化。

1.2.4 TUNEL 测定 肺组织切片脱蜡、水化后,用蛋白酶 K 渗透,用 TUNEL 反应液处理,然后用二脒基苯基吲哚(di-amidino phenyl indole, DAPI)染色细胞核,在荧光显微镜上获得图像。

1.2.5 BALF 中细胞计数、蛋白质 BALF 通过气管内滴注 3 mL 无菌盐水溶液并轻轻抽吸收集。灌洗液的回收范围为 2~2.6 mL。使用具有 0.4%台盼蓝的血细胞计数器对 BALF 中总细胞进行计数。使用 BCA 蛋白质测定试剂盒测量 BALF 中蛋白质。

1.2.6 Western blot 使用含有蛋白酶抑制剂的 RIPA 缓冲液从肺组织中提取全蛋白。收集的裂解物在 95℃下煮沸 5 min。在 8%~12%的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)凝胶上分离,然后转移到聚偏(二)氟乙烯(polyvinylidene difluoride, PVDF)膜上。将膜封闭后与以下一抗(Bcl-2、Bax、TLR4、MyD88 和 α -Tubulin)在 4℃下孵育过夜。用增强化学发光剂(enhanced chemiluminescence, ECL)检测试剂对条带进行可视化,并使用 Image J 软件进行量化。

1.3 统计学处理

所有数据统计分析均使用 SPSS 22.0 进行。计量资料采用 Kolmogorov-Smirnov 检验进行验证,均符合正态分布,用

均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。多组间比较用单因素方差分析,进一步两两比较用 SNK- q 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 DEX 可改善 BLM 诱导的小鼠炎症性损伤和肺纤维化

Sham 组小鼠肺泡正常,肺组织结构完整。与 Sham 组小鼠相比,BLM 刺激的小鼠肺组织广泛变性,肺泡间隔增厚,出现大量白细胞浸润,且胶原蛋白沉积过多;肺泡炎评分和 Ashcroft 评分明显增高($P<0.05$)。与 BLM 组小鼠相比,BLM+DEX 和 BLM+PFD 均可明显缓解这些病理变化,并减少胶原蛋白的产生;肺泡炎评分和 Ashcroft 评分明显降低($P<0.05$)。与 BLM+DEX 组比较,BLM+DEX+LPS 组小鼠的病理损伤加重;肺泡炎评分和 Ashcroft 评分明显增高($P<0.05$)。见图 1、表 1。

表 1 各组小鼠肺组织中肺泡炎评分和 Ashcroft 评分($\bar{x} \pm s$, 分)

组别 ($n=8$)	肺泡炎评分	Ashcroft 评分
Sham 组	0.15 $\pm$ 0.02	0.09 $\pm$ 0.01
BLM 组	2.56 $\pm$ 0.24 ^a	5.68 $\pm$ 0.52 ^a
BLM+DEX 组	0.98 $\pm$ 0.08 ^b	2.54 $\pm$ 0.24 ^b
BLM+PFD 组	0.65 $\pm$ 0.06 ^b	2.02 $\pm$ 0.20 ^b
BLM+DEX+LPS 组	1.42 $\pm$ 0.10 ^c	3.63 $\pm$ 0.39 ^c
F 值	428.190	326.857
P 值	0.000	0.000

注:a,与 Sham 组比较,肺泡炎评分: $q=54.576$, $P=0.000$;Ashcroft 评分: $q=49.018$, $P=0.000$;b,与 BLM 组比较,肺泡炎评分: $q=35.780$, 43.253 ,均 $P=0.000$;Ashcroft 评分: $q=27.534$, 32.094 ,均 $P=0.000$;c,与 BLM+DEX 组比较,肺泡炎评分: $q=9.964$, $P=0.000$;Ashcroft 评分: $q=9.558$, $P=0.000$

2.2 DEX 抑制 BLM 诱导的小鼠细胞外基质沉积

与 Sham 组比较,BLM 组小鼠肺组织中 Fn、 α -SMA 和 collagen I 的阳性细胞率明显增高($P<0.05$);与 BLM 组比较,BLM+DEX 组和 BLM+PFD 组小鼠肺组织中 Fn、 α -SMA 和 collagen I 的阳性细胞率明显降低($P<0.05$);与 BLM+DEX 组比较,BLM+DEX+LPS 组小鼠肺组织中 Fn、 α -SMA 和 collagen I 的阳性细胞率明显增高($P<0.05$)。见图 2、表 2。

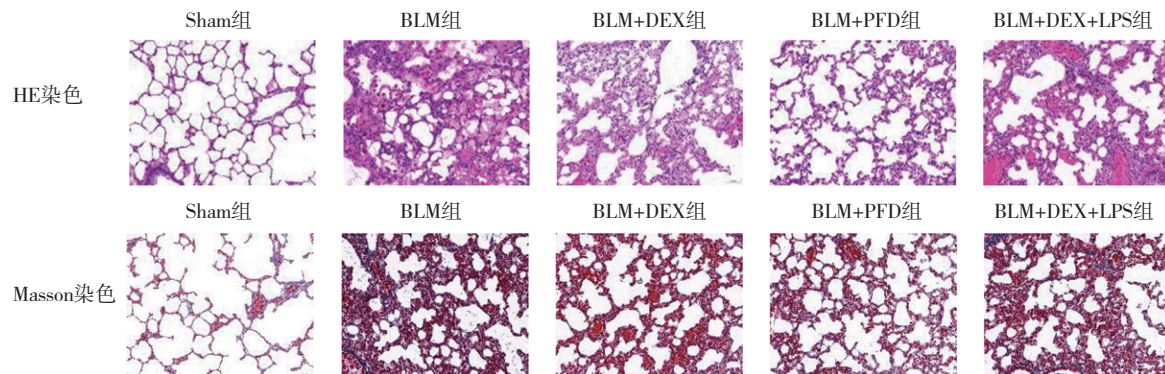


图 1 不同小鼠肺组织染色的代表性图片 (200 $\times$)

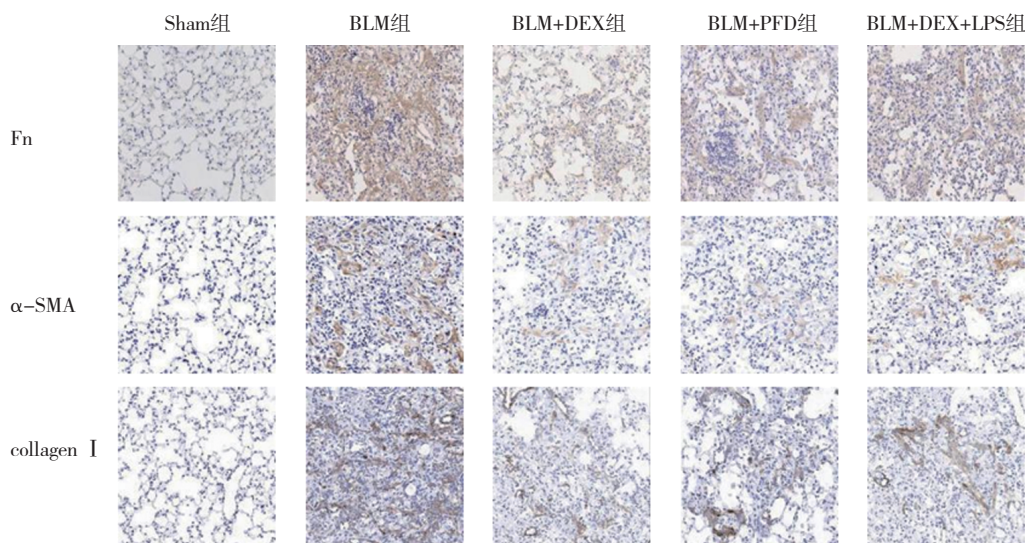


图2 免疫组织化学检测各组小鼠肺组织中 Fn、α-SMA 和 collagen I 表达情况 (200 ×)

表2 各组小鼠肺组织中 Fn、α-SMA 和 collagen I 的阳性细胞率比较 ($\bar{x} \pm s, \%$)

组别(n=8)	Fn	α-SMA	collagen I
Sham组	25.12 ± 2.16	17.56 ± 1.25	12.03 ± 1.20
BLM组	63.63 ± 5.48 ^a	58.63 ± 5.03 ^a	55.32 ± 5.16 ^a
BLM+DEX组	38.12 ± 3.01 ^b	26.36 ± 2.13 ^b	20.12 ± 1.87 ^b
BLM+PFD组	35.26 ± 2.87 ^b	24.13 ± 2.05 ^b	18.23 ± 1.45 ^b
BLM+DEX+LPS组	47.12 ± 4.52 ^c	37.49 ± 3.65 ^c	35.62 ± 3.12 ^c
F 值	115.898	212.176	280.346
P 值	0.000	0.000	0.000

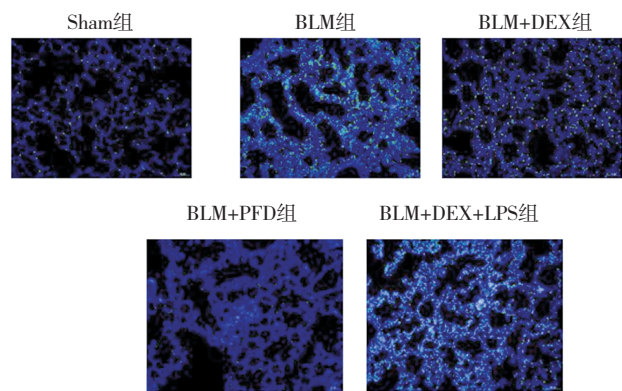
注:a, 与 Sham 组比较, Fn: $q=28.620, P=0.000$; α-SMA: $q=37.135, P=0.000$; collagen I: $q=41.560, P=0.000$; b: 与 BLM 组比较, Fn: $q=18.958, 21.084$, 均 $P=0.000$; α-SMA: $q=29.178, 31.195$, 均 $P=0.000$; collagen I: $q=33.793, 35.608$, 均 $P=0.000$; c: 与 BLM+DEX 组比较, Fn: $q=6.689, P=0.000$; α-SMA: $q=10.064, P=0.000$; collagen I: $q=14.881, P=0.000$

2.3 DEX 减弱 BLM 诱导的小鼠细胞凋亡

与 Sham 组比较, BLM 组小鼠肺组织中 TUNEL 阳性细胞率和 Bax 水平均明显增高, Bcl-2 水平降低 ($P<0.05$); 与 BLM 组比较, BLM+DEX 组和 BLM+PFD 组小鼠肺组织中 TUNEL 阳性细胞率和 Bax 水平均明显降低, Bcl-2 水平增高 ($P<0.05$); 与 BLM+DEX 组比较, BLM+DEX+LPS 组小鼠肺组织中 TUNEL 阳性细胞率和 Bax 水平均明显增高, Bcl-2 水平降低 ($P<0.05$)。见图 3、表 3。

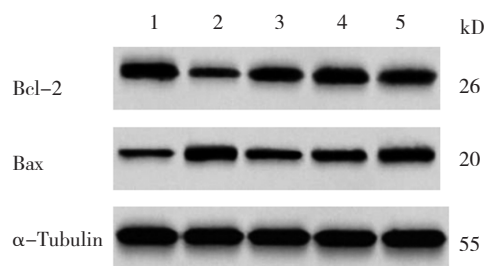
2.4 DEX 降低 BALF 中细胞数量和蛋白质含量

与 Sham 组比较, BLM 组小鼠 BALF 中总细胞数量和蛋白质含量增高 ($P<0.05$); 与 BLM 组比较, BLM+DEX 组和 BLM+PFD 组小鼠 BALF 中总细胞数量和蛋白质含量降低 ($P<0.05$); 与 BLM+DEX 组比较, BLM+DEX+LPS 组小鼠 BALF 中总细胞数量和蛋白质含量增高 ($P<0.05$)。见表 4。



注: DAPI 染色细胞核, TUNEL 染色凋亡细胞

A. TUNEL 测定细胞凋亡的代表性图片 (200×)



注: 1~5 依次表示为 Sham 组、BLM 组、BLM+DEX 组、BLM+PFD 组和 BLM+DEX+LPS 组

B. Western blot 检测肺组织中 Bcl-2 和 Bax 水平

图3 各组小鼠肺组织中细胞凋亡检测

2.5 DEX 抑制 TLR4/MyD88 信号通路

与 Sham 组比较, BLM 组小鼠肺组织中 TLR4、MyD88 蛋白水平增高 ($P<0.05$); 与 BLM 组比较, BLM+DEX 组和 BLM+PFD 组小鼠肺组织中 TLR4、MyD88 蛋白水平降低 ($P<0.05$); 与 BLM+DEX 组比较, BLM+DEX+LPS 组小鼠肺组织中 TLR4、MyD88 蛋白水平增高 ($P<0.05$)。见图 4、表 5。

表 3 各组小鼠肺组织中 TUNEL 阳性细胞率及 Bcl-2、Bax 水平检测 ($\bar{x} \pm s$)

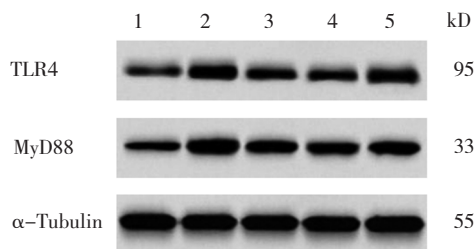
组别(n=8)	TUNEL阳性细胞率/%	Bcl-2	Bax
Sham组	14.10 ± 1.28	0.86 ± 0.07	0.19 ± 0.02
BLM组	57.36 ± 4.65 ^a	0.20 ± 0.02 ^a	0.78 ± 0.06 ^a
BLM+DEX组	25.10 ± 2.15 ^b	0.58 ± 0.05 ^b	0.28 ± 0.03 ^b
BLM+PFD组	22.18 ± 2.24 ^b	0.63 ± 0.06 ^b	0.35 ± 0.04 ^b
BLM+DEX+LPS组	36.25 ± 3.19 ^c	0.40 ± 0.05 ^c	0.52 ± 0.05 ^c
F 值	260.144	177.784	241.022
P 值	0.000	0.000	0.000

注:a,与 Sham 组比较,TUNEL 阳性细胞率: $q=41.686, P=0.000$;Bcl-2: $q=35.405, P=0.000$;Bax: $q=39.333, P=0.000$;b:与 BLM 组比较,TUNEL 阳性细胞率: $q=31.086, 33.900$,均 $P=0.000$;Bcl-2: $q=20.385, 23.067$,均 $P=0.000$;Bax: $q=33.333, 28.667$,均 $P=0.000$;c:与 BLM+DEX 组比较,TUNEL 阳性细胞率: $q=10.744, P=0.000$;Bcl-2: $q=9.656, P=0.000$;Bax: $q=16.000, P=0.000$

表 4 各组小鼠 BALF 中细胞数量和蛋白质含量统计 ($\bar{x} \pm s$)

组别(n=8)	总细胞数/ (10^5 个·mL ⁻¹)	蛋白质/ (mg·mL ⁻¹)
Sham组	0.98 ± 0.07	0.29 ± 0.03
BLM组	3.54 ± 0.06 ^a	2.85 ± 0.20 ^a
BLM+DEX 组	1.69 ± 0.15 ^b	1.52 ± 0.14 ^b
BLM+PFD 组	1.52 ± 0.12 ^b	1.36 ± 0.12 ^b
BLM+DEX+LPS 组	2.46 ± 0.18 ^c	2.10 ± 0.18 ^c
F 值	506.797	334.550
P 值	0.000	0.000

注:a,与 Sham 组比较,总细胞数: $q=58.3047, P=0.000$;蛋白质: $q=49.428, P=0.000$;b:与 BLM 组比较,总细胞数: $q=41.948, 45.803$,均 $P=0.000$;蛋白质: $q=25.679, 28.768$,均 $P=0.000$;c:与 BLM+DEX 组比较,总细胞数: $q=17.459, P=0.000$;蛋白质: $q=11.198, P=0.000$



注:1~5 依次表示为 Sham 组、BLM 组、BLM+DEX 组、BLM+PFD 组和 BLM+DEX+LPS 组

图 4 Western blot 检测各组小鼠肺组织中 TLR4、MyD88 蛋白水平

表 5 各组小鼠肺组织中 TLR4、MyD88 蛋白水平统计 ($\bar{x} \pm s$)

组别(n=8)	TLR4	MyD88
Sham组	0.12 ± 0.02	0.25 ± 0.02
BLM组	0.67 ± 0.05 ^a	0.79 ± 0.07 ^a
BLM+DEX 组	0.25 ± 0.03 ^b	0.39 ± 0.04 ^b
BLM+PFD 组	0.22 ± 0.01 ^b	0.43 ± 0.05 ^b
BLM+DEX+LPS 组	0.42 ± 0.05 ^c	0.56 ± 0.06 ^c
F 值	290.813	127.631
P 值	0.000	0.000

注:a,与 Sham 组比较,TLR4: $q=43.481, P=0.000$;MyD88: $q=29.954, P=0.000$;b:与 BLM 组比较,TLR4: $q=33.204, 35.576$,均 $P=0.000$;MyD88: $q=22.188, 19.969$,均 $P=0.000$;c:与 BLM+DEX 组比较,TLR4: $q=13.440, P=0.000$;MyD88: $q=9.430, P=0.000$

3 讨论

BLM已被广泛用作小鼠肺纤维化模型的诱导剂。实验表明,BLM可损伤小鼠肺组织,使肺泡间隔变宽,引起大量炎症细胞浸润,成纤维细胞增殖,Fn、 α -SMA和collagen I的表达明显增加^[15]。本研究通过尾静脉单次注射BLM,并在第28天发现肺部大量肺纤维化和炎症,这与以往研究相同,表明成功构建肺纤维化模型。

既往研究显示,DEX对肺损伤具有很好的保护作用。Li J等^[16]研究表明,DEX通过激活PI3K/Akt通路改善大鼠体外循环后肺损伤;Sun HQ等^[17]研究发现,DEX是一种有效的急性肺损伤治疗方法,对小鼠的保护作用可能是通过抑制HMGB1/RAGE/NF- κ B通路和细胞焦亡实现的;Xie Y等^[18]研究证实,DEX能降低老年肺癌根治术患者的炎症反应和氧化应激反应,减少术后肺部并发症的发生,从而起到肺保护作用。然而,关于Dex在肺纤维化中的作用机制尚未见报道。本研究组织病理学评分和免疫组织化学染色显示,DEX治疗可明显抑制肺纤维化和胶原蛋白积累;同时DEX抑制气道炎症细胞浸润,降低BALF中蛋白质含量。因此,这些证据支持DEX可以发挥抗纤维化作用并改善BLM诱导的炎症,且与现有IPF治疗药物PFD的功能相似。正如之前报道的那样,细胞凋亡是肺纤维化中存在的衰老表型之一,线粒体参与细胞凋亡过程,被认为是细胞凋亡的中心协调者^[19]。线粒体功能障碍可改变线粒体外膜的通透性,释放凋亡蛋白,如Bax。然而,Bcl-2也可以通过抑制Bax激活来发挥凋亡抑制作用^[20]。本研究提供了几条证据表明DEX在细胞凋亡中的作用,首先通过TUNEL检测得出DEX对细胞凋亡的抑制作用,同时通过Bax、Bcl-2水平的检测证明DEX可能通过线粒体依赖性方式抑制细胞凋亡。

尽管尚未全面确定DEX抗肺纤维化的作用机制,但确定了一种可能性。已知TLR在宿主防御系统中充当重要的模式识别受体,TLR4通过MyD88依赖性途径激活下游级联炎症信号(如NF- κ B p65、TNF- α 和IL-1 β)^[21]。既往研究显示,抑制TLR4/MyD88信号通路可通过减少氧化应激、细胞凋亡,并重新平衡Th1/Th2免疫来避免BLM诱导的肺纤维化大鼠的病理损伤^[22]。在对百草枯引起的急性肺损伤中发现,脂氧素A4通过抑制TLR4/MyD88介导的NF- κ B和PI3K/AKT通路发挥保护作用^[23]。此

外,已有研究表明温肺补气通络方通过抑制 TLR4/MyD88/NF- κ B 通路对 BLM 诱导的 IPF 模型具有保护作用^[6]。因此,预测 DEX 可通过抑制 TLR4/MyD88 通路对肺纤维化发挥保护作用。本研究中,DEX 治疗抑制了 TLR4、MyD88 蛋白表达,且在 DEX 治疗基础上使用 TLR4 激活剂 LPS 处理后,可明显逆转 DEX 对肺纤维化的保护作用。总之,这些数据表明 DEX 的抗肺纤维化作用可能部分取决于对 TLR4/MyD88 通路的抑制。

本研究是 1 项调查 DEX 在抗肺纤维化中作用的研究,证明了 DEX 可以减轻 BLM 诱导的肺纤维化,减少细胞凋亡并抑制 TLR4/MyD88 通路。鉴于 PFD 常见的副作用包括恶心、肠胃不适等,在一定程度上影响了患者的用药依从性。而 DEX 作为临床上的常用药物,不良反应较少,可作为一种潜在的抗肺纤维化药物在未来的应用中具有重要意义。

参 考 文 献

- [1] Phan THG, Paliogiannis P, Nasrallah GK, et al. Emerging cellular and molecular determinants of idiopathic pulmonary fibrosis[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2021, 78(5): 2031–2057.
- [2] Luppi F, Kalluri M, Faverio P, et al. Idiopathic pulmonary fibrosis beyond the lung: understanding disease mechanisms to improve diagnosis and management[J]. *Respir Res*, 2021, 22(1): 109.
- [3] Sgalla G, Franciosa C, Simonetti J, et al. Pamrevlumab for the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis[J]. *Expert Opin Investig Drugs*, 2020, 29(8): 771–777.
- [4] Liang JR, Zhang YL, Xie T, et al. Hyaluronan and TLR4 promote surfactant-protein-C-positive alveolar progenitor cell renewal and prevent severe pulmonary fibrosis in mice[J]. *Nat Med*, 2016, 22(11): 1285–1293.
- [5] Hu JJ, Wang HW, Li XT, et al. Fibrinogen-like protein 2 aggravates nonalcoholic steatohepatitis via interaction with TLR4, eliciting inflammation in macrophages and inducing hepatic lipid metabolism disorder[J]. *Theranostics*, 2020, 10(21): 9702–9720.
- [6] Song SY, Wang J, Liu GW, et al. Protective effects of the Wenfei buqi Tongluo formula on the inflammation in idiopathic pulmonary fibrosis through inhibiting the TLR4/MyD88/NF- κ B pathway[J]. *Biomed Res Int*, 2022, 2022: 8752325.
- [7] Hughes CG, Mailloux PT, Devlin JW, et al. Dexmedetomidine or propofol for sedation in mechanically ventilated adults with sepsis[J]. *N Engl J Med*, 2021, 384(15): 1424–1436.
- [8] Xue H, Li MX. Protective effect of pterostilbene on sepsis-induced acute lung injury in a rat model via the JAK2/STAT3 pathway[J]. *Ann Transl Med*, 2020, 8(21): 1452.
- [9] Wu SJ, Lin ZH, Lin YZ, et al. Dexmedetomidine exerted anti-arrhythmic effects in rat with ischemic cardiomyopathy via upregulation of connexin 43 and reduction of fibrosis and inflammation[J]. *Front Physiol*, 2020, 11: 33.
- [10] Liao J, Li KY, Su XY, et al. Dexmedetomidine promotes lipopolysaccharide-induced differentiation of cardiac fibroblasts and collagen I/III synthesis through α 2A adrenoreceptor-mediated activation of the PKC-p38-Smad2/3 signaling pathway in mice[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(23): 12749.
- [11] Xiao HJ, Huang XX, Wang SY, et al. Metformin ameliorates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice by suppressing IGF-1[J]. *Am J Transl Res*, 2020, 12(3): 940–949.
- [12] Murakami K, Kamimura D, Hasebe R, et al. Rhodobacter azotiformans LPS(RAP99-LPS) is a TLR4 agonist that inhibits lung metastasis and enhances TLR3-mediated chemokine expression[J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 675909.
- [13] Huai B, Ding JY. Atractylenolide III attenuates bleomycin-induced experimental pulmonary fibrosis and oxidative stress in rat model via Nrf2/NQO1/HO-1 pathway activation[J]. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 2020, 42(5): 436–444.
- [14] Han YY, Jiang M, He RL, et al. Mefunidone ameliorates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice[J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 713572.
- [15] Mou FH, Mou CL. Necrostatin-1 alleviates bleomycin-induced pulmonary fibrosis and extracellular matrix expression in interstitial pulmonary fibrosis[J]. *Med Sci Monit*, 2020, 26: e919739.
- [16] Li J, Dou XJ, Li DD, et al. Dexmedetomidine ameliorates post-CPB lung injury in rats by activating the PI3K/Akt pathway[J]. *J Invest Surg*, 2020, 33(6): 576–583.
- [17] Sun HQ, Hu HY, Xu XP, et al. Protective effect of dexmedetomidine in cecal ligation perforation-induced acute lung injury through HMGB1/RAGE pathway regulation and pyroptosis activation[J]. *Bioengineered*, 2021, 12(2): 10608–10623.
- [18] Xie Y, Jiang WQ, Zhao LH, et al. Effect of dexmedetomidine on perioperative inflammation and lung protection in elderly patients undergoing radical resection of lung cancer[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2020, 13(10): 2544–2553.
- [19] Luis-García ER, Becerril C, Salgado-Aguayo A, et al. Mitochondrial dysfunction and alterations in mitochondrial permeability transition pore (mPTP) contribute to apoptosis resistance in idiopathic pulmonary fibrosis fibroblasts[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(15): 7870.
- [20] Choi YH. Trans-cinnamaldehyde prevents oxidative stress-induced apoptosis in V79-4 Chinese hamster lung fibroblasts through the Nrf2-mediated HO-1 activation[J]. *Biol Pharm Bull*, 2020, 43(11): 1707–1714.
- [21] Shi H, Zhou P, Ni YQ, et al. *In vivo* and *in vitro* studies of Danzhi Jiangtang capsules against diabetic cardiomyopathy via TLR4/MyD88/NF- κ B signaling pathway[J]. *Saudi Pharm J*, 2021, 29(12): 1432–1440.
- [22] Luo S, Gong JZ, Cao XP, et al. Ligustilide modulates oxidative stress, apoptosis, and immunity to avoid pathological damages in bleomycin induced pulmonary fibrosis rats via inactivating TLR4/MyD88/NF- κ B P65[J]. *Ann Transl Med*, 2020, 8(15): 931.
- [23] Li YH, Wang N, Ma ZL, et al. Lipoxin A4 protects against paraquat-induced acute lung injury by inhibiting the TLR4/MyD88-mediated activation of the NF- κ B and PI3K/AKT pathways[J]. *Int J Mol Med*, 2021, 47(5): 86.

(责任编辑:冉明会)