

## • 基础研究 •

## 雾化吸入顺铂对大鼠肺组织损伤的研究\*

唐树彬<sup>△</sup>, 黄其, 侯陈亮, 邹安娜

641000 四川 内江, 内江市第一人民医院 肿瘤科

[摘要] 目的: 探讨雾化吸入不同浓度顺铂对大鼠肺组织的损伤情况。方法: 将 45 只 SD 大鼠随机分为 3 组, 每组 15 只, 分别为高剂量组、低剂量组及空白组。高剂量组和低剂量组分别给予顺铂 6mg/kg、2mg/kg 雾化吸入, 每天 1 次, 连续 60 天; 空白组仅给予生理盐水雾化吸入, 其余同高剂量组和低剂量组。分别在实验开始后第 15 天、30 天、60 天时取大鼠肺组织行病理切片观察, 同时通过酶联免疫吸附法测定肺组织中基质金属蛋白酶-9 (matrix metalloproteinases 9, MMP-9) 和转化生长因子- $\beta$  (transforming growth factor  $\beta$ , TGF- $\beta$ ) 的浓度, 了解不同剂量顺铂雾化对大鼠肺组织的损伤情况。结果: 随着雾化时间延长, 大鼠肺组织损伤呈进行性加重, 60 天时, 各组大鼠肺组织呈现不同病理改变, 三组之间差异明显。MMP-9 在高剂量组中表现为先升高后降低, 在低剂量组中呈现持续性升高。30 天时, 高剂量组 MMP-9 表达为  $(25.378 \pm 1.248) \mu\text{g/L}$ , 低剂量组为  $(21.168 \pm 0.899) \mu\text{g/L}$ , 差异无统计学意义 ( $P < 0.001$ ); 60 天时, 高剂量组 MMP-9 值为  $(21.802 \pm 0.847) \mu\text{g/L}$ , 低剂量组为  $(22.850 \pm 1.338) \mu\text{g/L}$ , 差异无统计学意义 ( $P = 0.141$ )。TGF- $\beta$  在高剂量组与低剂量组都呈现持续性升高, 60 天时, 高剂量组 TGF- $\beta$  表达为  $(55.180 \pm 2.108) \mu\text{g/L}$ , 低剂量组为  $(52.188 \pm 1.396) \mu\text{g/L}$ , 差异有统计学意义 ( $P = 0.041$ )。结论: 雾化吸入顺铂对大鼠肺组织有明确的损害, 提示临床工作中相关医务人员应注意采取对应防护措施。

[关键词] 雾化吸入; 顺铂; 大鼠; 肺损伤

[中图分类号] R979.1+9; R-332; R135.99 [文献标志码] A doi: 10.3969/j.issn.1674-0904.2020.02.007

引文格式: Tang SB, Huang Q, Hou CL, et al. Atomization inhalation of cisplatin on lung tissue injury in rats [J]. J Cancer Control Treat, 2020, 33(2): 119-123, 130. [唐树彬, 黄其, 侯陈亮, 等. 雾化吸入顺铂对大鼠肺组织损伤的研究 [J]. 肿瘤预防与治疗, 2020, 33(2): 119-123, 130.]

## Atomization Inhalation of Cisplatin on Lung Tissue Injury in Rats

Tang Shubin, Huang Qi, Hou Chenliang, Zou Anna

Department of Oncology, The First People's Hospital of Neijiang, Neijiang 641000, Sichuan, China

Corresponding author: Tang Shubin, E-mail: 11555043@qq.com

This study was supported by grants from Science and Technology Bureau of Neijiang (NO. 201885).

[Abstract] **Objective:** To investigate the damage to lung tissue in rats by inhaling different concentrations of cisplatin. **Methods:** A total of 45 Sprague Dawley rats were randomly assigned to the high-dose group (15 cases), the low-dose group (15 cases) and the blank group (15 cases). The former two groups were given nebulized inhaled cisplatin 6mg/kg and 2mg/kg once a day for 60 consecutive days; the blank group was given nebulized saline once a day for 60 consecutive days. On the 15th, 30th, and 60th days after the start of the experiment, rat lung tissue was retrieved for pathological observation. At the same time, the concentrations of matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) and transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) in lung tissue were detected by enzyme-linked immunosorbent assay, so as to understand the damage of nebulized cisplatin on lung tissue in rats. **Results:** With the prolonged nebulization time, the damage to lung tissue of rats gradually increased. At the 60th day of nebulization, obvious difference in the lung tissue of rats was observed among three groups. MMP-9 increased first and then decreased in the high-dose group, and it increased continuously in the low-dose group. At the 30th day, the expression of MMP-9 in the high-dose group was  $(25.378 \pm 1.248) \mu\text{g/L}$ , and it was  $(21.168 \pm 0.899) \mu\text{g/L}$  in the low-dose group. The difference was statistically significant ( $P < 0.001$ ). At the 60th day, the MMP-9 value in the high-dose group was  $(21.802 \pm 0.847) \mu\text{g/L}$ , and it was  $(22.850 \pm 1.338) \mu\text{g/L}$  in the low-dose group. The difference was statistically significant ( $P = 0.141$ ). TGF- $\beta$  increased continuously

[收稿日期] 2019-10-08 [修回日期] 2020-01-14

[基金项目] \* 内江市科技局重点科学技术项目 (编号: 201885)

[通讯作者] <sup>△</sup>唐树彬, E-mail: 11555043@qq.com

in both the high-dose and the low-dose group. At the 60th day, the expression of TGF- $\beta$  in the high-dose group was  $(55.180 \pm 2.108)$  ug/L, and it was  $(52.188 \pm 1.396)$  ug/L in the low-dose group. The difference was statistically significant ( $P = 0.041$ ). **Conclusion:** Atomization inhalation of cisplatin can inflict damage to lung tissue of rats. Therefore, medical staff who are exposed to cisplatin should take protective measures.

[Key words] Atomization inhalation; Cisplatin; Rats; Lung injury

化疗是治疗恶性肿瘤主要方法之一,但化疗药物的毒副作用明显,对机体有广泛的损害<sup>[1]</sup>,既往基础研究提示其还有致畸、致癌、致突变等远期副作用<sup>[2]</sup>。医护人员在日常工作中需要经常接触化疗药物,化疗药物在配置过程中可能外渗,在空气中形成气溶胶<sup>[3]</sup>,护理人员长期吸入化疗药物可能会对其呼吸系统产生损伤。顺铂是一种常用的化疗药物,但其所致肺组织损伤的病理类型及严重程度目前尚不清楚,相关预防措施也缺乏针对性。同时,国内外也未见相关动物模拟实验报道。基质金属蛋白酶-9(matrix metallo proteinases 9, MMP-9)和转化生长因子- $\beta$ (transforming growth factor  $\beta$ , TGF- $\beta$ )是重要损伤修复因子,前期研究证实它们参与了肺组织损伤后炎症反应、创伤修复及纤维化等过程,可用于提示肺组织损伤后的炎症反应强度和纤维化改变<sup>[4]</sup>。本实验利用不同浓度的顺铂对大鼠进行雾化给药,构建肺组织损伤动物模型,了解雾化吸入顺铂对肺组织的病理损害情况,同时观察在雾化不同阶段肺组织中 MMP-9 和 TGF- $\beta$  的表达情况。

## 1 实验材料与方法

### 1.1 实验动物

三月龄雌性 SD 大鼠 45 只,体重 240 ~ 270 g,由成都硕达动物饲养公司提供。饲料为成都硕达公司提供的普通大鼠饲料,饮水为普通矿泉水。将大鼠随机分为 3 组,每组 15 只,分别为高剂量组、低剂量组及空白组。参考相关静脉给药文献,选择不同给药剂量<sup>[5-6]</sup>。高剂量组和低剂量组分别给予顺铂 6mg/kg、2mg/kg 雾化吸入,每天 1 次,连续 60 天;空白组仅给予生理盐水雾化。

### 1.2 实验药物及仪器

注射用顺铂,10mg/支,购自齐鲁制药(海南)有限公司;鼠 MMP-9、TGF- $\beta$  酶联免疫吸附法测定试剂盒购于上海凡科维公司;Bio-Rad 酶标仪(美国 Bio-Rad 公司)。

### 1.3 试验方法

将大鼠放入 17cm × 12cm × 14cm 的铁笼中,再将铁笼放置于 35cm × 20cm × 18cm 的聚乙烯泡沫箱中,雾化器固定于泡沫箱一侧壁,对侧壁开一个 1cm

× 1cm × 1cm 小口通气(图 1)。雾化条件:氧气雾化,氧流量为 5L/分,雾化液配置成 7mL,高剂量组浓度为 0.21mg/mL,低剂量组浓度为 0.07mg/mL。雾化时间 1 小时,每天一次。

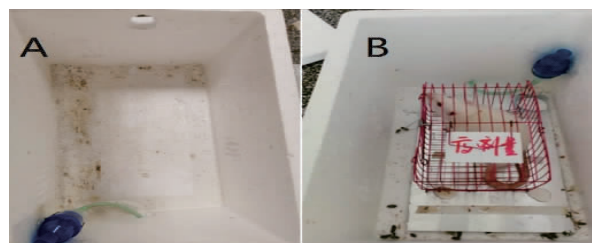


图 1 大鼠雾化时情况

Figure 1. Atomization in Rats

Panel A shows details of foam box; Panel B shows the atomization in rats.

### 1.4 大鼠肺组织病理检测

实验开始后第 15 天、30 天、60 天每组各处死 5 只大鼠,大鼠肺组织用 10% 的中性缓冲福尔马林液固定 24 小时,石蜡包埋切片,HE 染色,显微镜观察病理改变。由我院两位病理科的副高级医生共同阅片判定结果。

### 1.5 大鼠肺组织中 MMP-9 和 TGF- $\beta$ 的浓度的检测

取大鼠左下肺组织 1g,放入液氮中速冻保存,在低温条件下将组织研磨成粉末状,加入生理盐水 2mL 充分溶解。4 000 转离心 10 分钟,取上清液。用 ELISA 法检测上清液中 MMP-9 和 TGF- $\beta$  浓度,具体参照相关试剂盒说明书进行。

### 1.6 统计学处理

实验结果以均数 ± 标准差( $\bar{X} \pm s$ )表示,应用 SPSS 22 统计软件对所有数据进行统计学分析。比较各组雾化 15 天、30 天、60 天时大鼠肺组织中 MMP-9 和 TGF- $\beta$  的浓度。同时进行雾化 15 天、30 天、60 天时各组组内比较。3 组间计量资料比较采用方差分析,检验水准取  $\alpha = 0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 大鼠一般情况

实验开始时各组大鼠体重无明显差异,雾化早期各组大鼠活动及进食正常,但在雾化 30 天以后,高剂量组大鼠出现活动量减少,易怒,体毛光泽度下

降,但进食基本正常。第 60 天时,各组大鼠体重较前无明显变化,各组之间亦无明显差异。

## 2.2 大鼠肺组织病理改变

### 2.2.1 雾化 15 天时各组大鼠肺组织病理改变 空

白组:肺组织结构完整,无出血,肺泡间隔无明显炎性渗出。低剂量组:肺泡结构正常,肺泡间隔轻度水肿,少量炎性渗出。高剂量组:肺泡间隔水肿及渗出情况与低剂量组相似,但范围更广(图 2)。

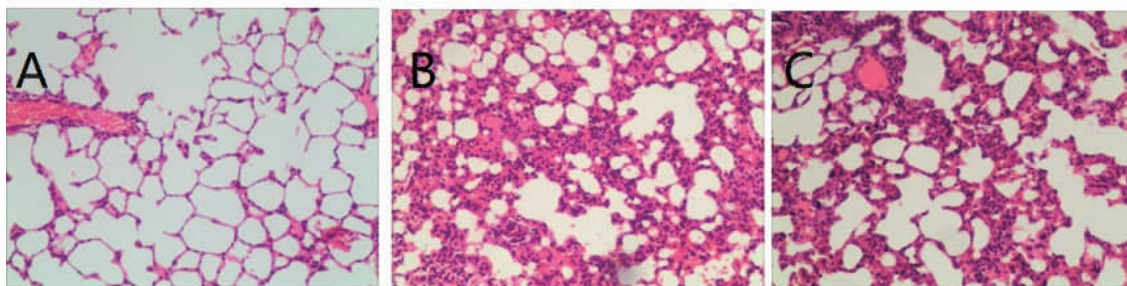


图 2 试验第 15 天时各组大鼠肺组织病理改变(10 × 10)

Figure 2. Pathological Changes of Lung Tissue in Each Group on the 15th Day (10 × 10)

Panel A shows the pathological changes in the blank group; Panel B shows the pathological changes in the low dose group; Panel C shows the pathological changes in the high dose group.

### 2.2.2 雾化 30 天时各组大鼠肺组织病理改变 空

白组:肺泡及间隔正常,无出血及渗出。低剂量组:肺泡间隔水肿及炎性渗出较第 15 天时明显加重,但

肺泡无明显扩张。高剂量组:肺泡腔轻度扩张,肺泡腔内组织细胞渗出,肺泡间隔轻度出血,中度炎性渗出(图 3)。

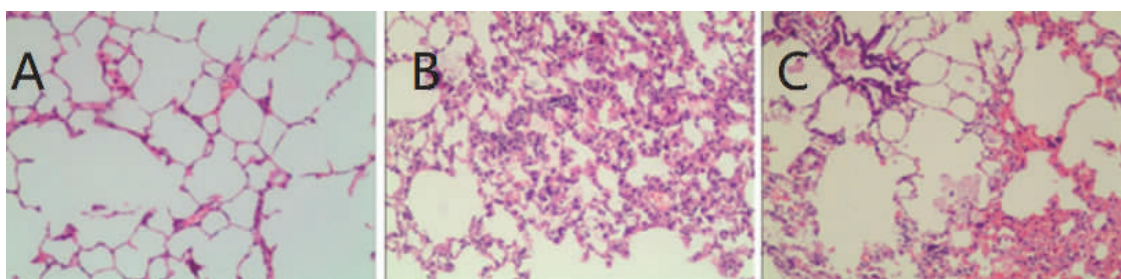


图 3 试验第 30 天时各组大鼠肺组织病理改变(10 × 10)

Figure 3. Pathological Changes of Lung Tissue in Each Group on the 30th Day (10 × 10)

Panel A shows the pathological changes in the blank group; Panel B shows the pathological changes in the low dose group; Panel C shows the pathological changes in the high dose group.

### 2.2.3 雾化 60 天时各组大鼠肺组织病理改变 空

白组:肺泡结构完整,间隔无水肿,较前无明显变化。低剂量组:肺组织结构基本完整,肺泡腔内少许炎性渗出,肺泡腔轻度扩张,肺泡间隔轻度增宽,水肿较

前有所减轻,炎性渗出不明显。高剂量组:肺泡腔内少许组织渗出,间隔渗出不明显,但出现大片肺泡间隔增宽、纤维化(图 4)。

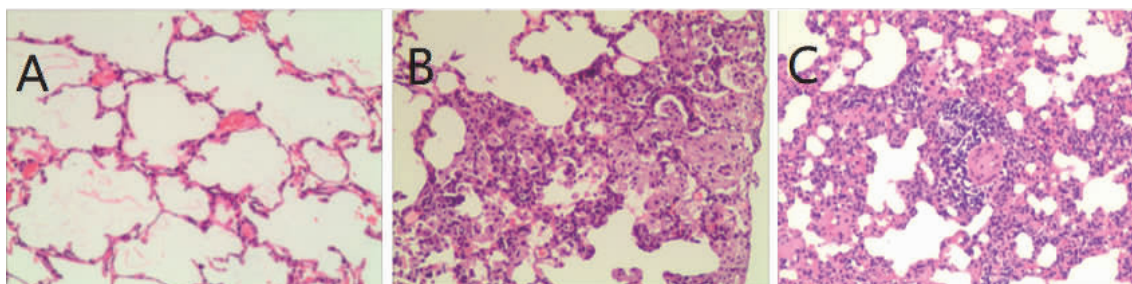


图 4 试验第 60 天时各组大鼠肺组织病理改变(10 × 10)

Figure 4. Pathological Changes of Lung Tissue in Each Group on the 60th Day (10 × 10)

Panel A shows the pathological changes in the blank group; Panel B shows the pathological changes in the low dose group; Panel C shows the pathological changes in the high dose group.

## 2.4 大鼠肺组织中 MMP-9 和 TGF- $\beta$ 浓度检测

2.4.1 各组大鼠肺组织中 MMP-9 表达水平比较  
雾化 15 天时,高剂量组 MMP-9 值为  $(18.096 \pm 0.781) \mu\text{g/L}$ ,较空白组升高明显,差异有统计学意义( $\text{LSD-}t = 3.734, P = 0.003$ );低剂量组为  $(17.478 \pm 0.859) \mu\text{g/L}$ ,较空白组亦有所升高,差异有统计学意义( $\text{LSD-}t = 2.516, P = 0.027$ ),但高、低剂量组之间的差异无统计学意义( $\text{LSD-}t = 1.218, P = 0.247$ )。雾化 30 天时,高剂量组 MMP-9 表达升高

表 1 各组大鼠肺组织 MMP-9 表达情况( $\mu\text{g/L}$ )

Table 1. Expression of MMP-9 in Lung Tissue of Rats in Each Group ( $\mu\text{g/L}$ )

Group	15 days	30 days	60 days
Blank group	16.202 $\pm$ 0.762	16.466 $\pm$ 0.839	16.592 $\pm$ 0.903
Low dose group	17.478 $\pm$ 0.859	21.168 $\pm$ 0.899	22.850 $\pm$ 1.338
High dose group	18.096 $\pm$ 0.781	25.378 $\pm$ 1.248	21.802 $\pm$ 0.847

MMP-9: Matrix metalloproteinases 9.

2.4.2 各组大鼠肺组织中 TGF- $\beta$  表达水平比较  
雾化 15 天时,各雾化组 TGF- $\beta$  表达的差异无统计学意义( $F = 0.435, P = 0.657$ )。雾化 30 天时,高剂量组 TGF- $\beta$  表达升高到  $(53.045 \pm 1.058) \mu\text{g/L}$ ,较空白组升高明显,差异有统计学意义( $\text{LSD-}t = 22.231, P < 0.001$ );低剂量组为  $(46.904 \pm 2.862) \mu\text{g/L}$ ,与空白组比较差异有统计学意义( $\text{LSD-}t =$

表 2 各组大鼠肺组织 TGF- $\beta$  表达情况( $\mu\text{g/L}$ )

Table 2. Expression of TGF- $\beta$  in Lung Tissue of Rats in Each Group ( $\mu\text{g/L}$ )

Group	15 days	30 days	60 days
Blank group	23.390 $\pm$ 2.071	23.079 $\pm$ 2.079	23.048 $\pm$ 2.522
Low dose group	24.472 $\pm$ 1.303	46.904 $\pm$ 2.862	52.188 $\pm$ 1.396
High dose group	23.840 $\pm$ 2.050	53.045 $\pm$ 1.058	55.180 $\pm$ 2.108

TGF- $\beta$ : Transforming growth factor- $\beta$ .

## 3 讨论

目前,分子靶向治疗、免疫治疗等手段在恶性肿瘤治疗中扮演着越来越重要的角色,肿瘤内科治疗进入精准治疗时代<sup>[7-8]</sup>,但化疗仍然是治疗肿瘤的基本手段之一<sup>[9]</sup>,在临床中运用广泛<sup>[10]</sup>。基层医院的设备设施和人员配置相比于上级医院仍有较大差距<sup>[11]</sup>,基层医疗工作者在化疗药物配置过程中更有可能产生有毒微粒<sup>[12]</sup>,这些微粒会通过呼吸道作用于医护人员,可能对医护人员的健康造成不良影响<sup>[13]</sup>。Somayeh 等<sup>[14]</sup>通过回顾性调查分析发现,在长期暴露于化疗药物的护理人员中,口腔炎等疾病的发生率明显高于对照人群。国内学者的研究也证实吸入化疗药物会对医务人员健康造成影响<sup>[15]</sup>。

到  $(25.378 \pm 1.248) \mu\text{g/L}$ ,低剂量组为  $(21.168 \pm 0.899) \mu\text{g/L}$ ,空白组为  $(16.466 \pm 0.839) \mu\text{g/L}$ ,三组之间比较,差异有统计学意义( $F = 97.062, P < 0.001$ )。雾化 60 天时,高剂量组 MMP-9 值稍有下降,为  $(21.802 \pm 0.847) \mu\text{g/L}$ ,低剂量组继续升高到  $(22.850 \pm 1.338) \mu\text{g/L}$ ,高、低剂量组间差异无统计学意义( $\text{LSD-}t = 1.574, P = 0.141$ ),但高剂量组与空白组之间的差异仍有统计学意义( $\text{LSD-}t = 7.824, P < 0.001$ )(表 1)。

17.676,  $P < 0.001$ );同时,高、低剂量组间差异也非常明显,差异有统计学意义( $\text{LSD-}t = 4.555, P = 0.001$ )。雾化 60 天时,高剂量组 TGF- $\beta$  表达为  $(55.180 \pm 2.108) \mu\text{g/L}$ ,低剂量组为  $(52.188 \pm 1.396) \mu\text{g/L}$ ,高、低剂量组之间的差异仍有统计学意义( $\text{LSD-}t = 2.294, P = 0.041$ ),但差异明显缩小(表 2)。

目前,长期暴露于化疗药物会引起呼吸道、消化道等的损害也得到了大家的广泛认同<sup>[16]</sup>。但是,由于人体的特殊性,我们对吸入化疗药物对肺组织的损伤情况还不甚了解。同时,人们对于肺组织病理改变与吸入化疗药物的剂量、时间之间的关系也不太清楚,这方面的动物实验也相对较少。Hureaux 等<sup>[17]</sup>利用紫杉醇对大鼠进行气管内雾化,发现在雾化早期出现气管内炎性渗出,7 天后逐渐减轻,30 天后基本恢复正常。蔡铭等<sup>[18]</sup>通过气管插管雾化给药的方法给予大鼠顺铂、紫杉醇等药物,证实吸入化疗药物会对肺组织造成不同程度的损害。但是,这些研究采用的都是气管插管短期大剂量给药方式,这与医务人员在化疗药物配置过程接触化疗药物的模式并不相同。为了构建更接近于临床的动物模型,我

们选取临床常用的顺铂为研究药物,通过氧气雾化给药方式来探讨此问题。

在本实验中,我们发现大鼠肺组织损伤与顺铂的浓度及给药的时间呈明显的相关性。在雾化的早期,不同浓度的顺铂对大鼠肺组织的损害都不明显,主要表现为肺泡间隔轻度水肿,少量炎性渗出,肺泡腔内无明确组织渗出,肺泡间隔也不增宽。但随着雾化时间进一步延长,不同剂量雾化组间逐渐出现差异。在 30 天时,低剂量雾化组仍表现为肺泡间隔水肿及炎性渗出,但高剂量雾化组则出现肺泡扩张,肺泡腔内组织渗出。到雾化到 60 天时,这种差异进一步增大,低剂量组肺泡腔出现轻度扩张,间隔轻度增宽,但高剂量组则出现大片肺泡间隔增宽,伴纤维化。总的来说,在雾化早期,肺组织损伤主要表现为肺泡间隔炎性渗出,以后逐渐出现肺泡扩张及间隔增宽,最终将出现肺泡破坏伴间隔明显增宽及纤维化。

MMP-9 是 MMPs 家族中重要成员之一,在降解基底膜和促进肺部炎症中发挥了重要的作用<sup>[19]</sup>。曲良超等<sup>[20]</sup>在大鼠缺血/再灌注肺损伤模型中发现 MMP-9 在炎症反应早期即明显升高;王前进等<sup>[21]</sup>在对急性肺损伤研究中发现,损伤的早期阶段,在肺组织、支气管肺泡灌洗液中均可检测到高浓度的 MMP-9。因此, MMP-9 被认为与急性肺损伤密切相关,参与了早期的组织损伤过程<sup>[22]</sup>。肺纤维化的形成是缓慢渐进的过程,持续的慢性炎症是早期纤维化的重要诱因<sup>[23]</sup>,而 TGF- $\beta$  是一类重要的致纤维化细胞因子,可以活化下游转录因子 Smad3,或是通过激活丝裂原活化蛋白激酶信号通路,促进细胞增殖和迁移,使细胞胶原合成增加,最终导致肺纤维化<sup>[24]</sup>。TGF- $\beta$  也可以促进肺成纤维细胞活化及异常增殖,使细胞外基质在肺间质和肺泡间过度积聚<sup>[25]</sup>,促进肺纤维化的形成。因此, TGF- $\beta$  被认为是促进纤维化形成的重要细胞因子<sup>[26]</sup>。本研究中,我们发现 MMP-9 在雾化的早期阶段即出现升高,而此时病理组织仅为轻度炎症改变。此后,低剂量组 MMP-9 表现为进行性升高,大鼠肺组织炎症损害也逐渐加重,但无明显纤维化。高剂量组 MMP-9 表达则呈现出先升高再降低的趋势,与此同时,高剂量组病理改变也由炎症逐渐转变为纤维化。高、低剂量组在雾化早期均无 TGF- $\beta$  升高,但随着试验进行,两组的 TGF- $\beta$  表达都呈进行性升高,且高剂量组更为明显。60 天时高剂量组已经出现肺组织纤维化改变,低剂量组也有间隔增宽表现。这些结果提示,

雾化吸入顺铂所致肺损害可能是在持续慢性炎症反应的基础上发生的肺纤维化过程,损害的严重程度与顺铂的剂量及雾化的时间密切相关。

本实验中我们通过构建大鼠雾化吸入顺铂的肺损伤模型,进一步证实了吸入顺铂等化疗药物会对机体呼吸系统造成不同程度的损害。我们发现在未经防护情况下,大剂量、长时间吸入含顺铂气溶胶会对肺组织产生不可逆损害。这提示我们,化疗药物的配置需要在通风换气的条件下进行,同时护理人员需要做好相应的职业防护。此外,护理人员定期轮岗也是减少损害的有效方法。当然,本研究采用的雾化吸入方法与临床上医护人员的实际暴露情况存在一定差异,需要进一步研究来证实。

**作者声明:** 本文全部作者对于研究和撰写的论文出现的不端行为承担相应责任;并承诺论文中涉及的原始图片、数据资料等已按照有关规定保存,可接受核查。

**学术不端:** 本文在初审、返修及出版前均通过中国知网(CNKI)科技期刊学术不端文献检测系统的学术不端检测。

**同行评议:** 经同行专家双盲外审,达到刊发要求。

**利益冲突:** 所有作者均声明不存在利益冲突。

**文章版权:** 本文出版前已与全体作者签署了论文授权书等协议。

#### [参考文献]

- [1] Wang H, Wu J, Xu L, et al. Albumin nanoparticle encapsulation of potent cytotoxic therapeutics shows sustained drug release and alleviates cancer drug toxicity[J]. Chem Commun (Camb), 2017, 53(17): 2618-2621.
- [2] Framarino-Dei-Malatesta M, Sammartino P, Napoli A. Does anthracycline-based chemotherapy in pregnant women with cancer offer safe cardiac and neurodevelopmental outcomes for the developing fetus? [J]. BMC Cancer, 2017, 17(1): 777.
- [3] 刘瑜, 陈进翠, 陈芳. 一种化疗药物配药器的研制及应用[J]. 护士进修杂志, 2017, 32(2): 190.
- [4] Laskin DL, Malaviya R, Laskin JD. Role of macrophages in acute lung injury and chronic fibrosis induced by pulmonary toxicants [J]. Toxicol Sci, 2019, 168(2): 287-301.
- [5] 张丽娟, 陶仕英, 赵丕文, 等. 顺铂建立大鼠卵巢早衰模型的实验研究[J]. 世界中医药, 2015, 10(10): 1563-1565, 1569.
- [6] 董若曦, 朱小丹, 樊伯珍, 等. 淫羊藿苷对顺铂致卵巢早衰大鼠卵巢储备功能的作用研究[J]. 浙江医学, 2019, 41(3): 230-233.