花形乳糖装载姜黄素固体脂质纳米粒吸入微粉对COPD模型小鼠肺部炎症的影响及机制Δ

李　楠*，李　旭，王　梓，杨　萍，孔令钰#（天津市医药科学研究所，天津　300020）

中图分类号　R943　　**文献标志码**　A　　**文章编号**　1001-0408（2023）14-1691-06
DOI　10.6039/j.issn.1001-0408.2023.14.06

摘　要　目的　探讨肺吸入花形乳糖（FL）装载姜黄素（Cur）固体脂质纳米粒（SLN）吸入微粉（Cur-SLN-FL）对慢性阻塞性肺疾病（COPD）模型小鼠肺部炎症的影响及机制。**方法**　对Cur-SLN-FL的肺部刺激性进行考察，明确吸入材料的局部安全性。然后随机选用10只小鼠经气管注入生理盐水，其余50只小鼠均滴注猪胰蛋白酶溶液（浓度为33.3 mg/mL、给药剂量为1.0 mL/kg）复制COPD模型，小鼠正常喂养28 d后分为假手术组、模型组、布地奈德组（20 mg/kg）和Cur-SLN-FL高、低剂量（100、50 mg/kg）组，每组10只。按要求给予相应药物，每日1次，连续14 d。末次给药24 h后，采集各组小鼠支气管肺泡灌洗液（BALF）并对其中的白细胞分类计数；采用苏木素-伊红（HE）染色观察气管和肺组织病理形态；采用Masson染色检测肺组织胶原纤维沉积；采用免疫组织化学法检测肺组织中核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白3（NLRP3）、胱天蛋白酶1（caspase-1）、白细胞介素1β（IL-1β）的阳性表达；采用Western blot法检测肺组织中NLRP3、caspase-1、核因子κB（NF-κB）的蛋白表达。**结果**　Cur-SLN-FL无明显肺部刺激性。与假手术组比较，模型组小鼠BALF中白细胞总数、中性粒细胞、嗜酸性粒细胞均显著增加，淋巴细胞数显著降低（$P<0.05$）；气管见纤毛柱状上皮增生增厚、脱落，腔内可见黏液蓄积，肺组织可见间质炎性细胞浸润；肺组织胶原纤维沉积明显增加，肺组织中NLRP3、caspase-1、IL-1β的阳性表达明显增强，肺组织中NLRP3、caspase-1、NF-κB蛋白的表达水平均显著升高（$P<0.05$）。给予Cur-SLN-FL后，上述各指标均有一定程度改善。**结论**　Cur-SLN-FL能够改善COPD模型小鼠的肺部炎症反应，其机制可能是通过调控NLRP3信号通路，抑制caspase-1、NF-κB、IL-1β的表达，进而缓解小鼠肺组织纤维化的进程。

关键词　花形乳糖；姜黄素固体脂质纳米粒；吸入微粉；肺部刺激性；慢性阻塞性肺疾病；NLRP3炎症小体

Effects and mechanism of Curcumin solid lipid nanoparticles loaded with flower-shaped lactose for inhalation on pulmonary inflammation in COPD model mice

LI Nan, LI Xu, WANG Zi, YANG Ping, KONG Lingyu (Tianjin Institute of Pharmaceutical Science, Tianjin 300020, China)

ABSTRACT　OBJECTIVE To investigate the effects and mechanism of curcumin (Cur) solid lipid nanoparticles (SLN) loaded with flower-shaped lactose (Cur-SLN-FL) for lung inhalation on lung inflammation in chronic obstructive pulmonary disease (COPD) model mice. **METHODS** Firstly, the irritation of Cur-SLN-FL to lung tissue was investigated, and the local safety of inhalation materials was determined. Then, 10 mice were randomly selected and injected with normal saline through the trachea, and the other 50 mice were all injected with porcine trypsin solution (concentration of 33.3 mg/mL, dosage of 1.0 mL/kg) to induce the COPD model. After normal feeding for 28 days, the mice were divided into sham operation group, model group, budesonide group (20 mg/kg), Cur-SLN-FL high-dose and low-dose groups (100, 50 mg/kg), with 10 mice in each group. The corresponding drugs were given to each group, once a day, for 14 consecutive days. Twenty-four hours after the last administration, the bronchoalveolar lavage fluid (BALF) of mice in each group was collected and the differential count of white blood cells was determined. Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe the histopathology of the trachea and lung tissue in each group. Masson staining was used to detect collagen deposition in the lung tissue of mice in each group. Immunohistochemical method was used to detect the positive expressions of nucleotide-binding oligomerization domains-like receptor protein-3 (NLRP3), caspase-1 and interleukin-1β (IL-1β) in lung tissue of mice. Western blot assay was used to detect the protein expressions of NLRP3, caspase-1 and nuclear factor of kappa B (NF-κB) in lung tissue. **RESULTS** Cur-SLN-FL had no obvious pulmonary irritation. Compared with the sham operation group, the total number of white blood cells, neutrophils and eosinophils in BALF of the model group increased significantly, while the number of lymphocytes decreased significantly ($P<0.05$); ciliated columnar epithelium proliferated, thickened and exfoliated in the trachea, mucus accumulated in the cavity and interstitial inflammatory cells infiltrated in the lung tissue; the deposition of collagen fibers in lung tissue increased significantly, the positive expressions of NLRP3, caspase-1 and IL-1β in lung tissue increased significantly, and the expressions of NLRP3, caspase-1 and NF-κB protein in lung

Δ**基金项目**　国家自然科学基金资助项目（No.81903565）；天津市科技计划项目（No.21JCYBJC01630）；天津市卫生健康科技项目（No.TJWJ2021MS046，No.TJWJ2021QN078）

＊**第一作者**　助理研究员，硕士。研究方向：肺部递药系统。E-mail：llittsnows@126.com

\# **通信作者**　副研究员。研究方向：纳米递药系统。E-mail：lingyu_kong@163.com

tissue all increased significantly ($P<0.05$). After giving Cur-SLN-FL, the above indexes were all improved to certain extent. **CONCLUSIONS** Cur-SLN-FL can improve the pulmonary inflammatory reaction in COPD model mice, and its mechanism may be through regulating the NLRP3 signaling pathway, inhibiting the expressions of caspase-1, NF-κB and IL-1β, thus alleviating the process of pulmonary fibrosis in COPD model mice.

KEYWORDS flower lactose; curcumin solid lipid nanoparticles; power inhalation; pulmonary irritation; chronic obstructive pulmonary disease; NLRP3 inflammatory corpuscles

慢性阻塞性肺疾病（chronic obstructive pulmonary disease，COPD）是以气道的慢性炎症为主要特征的疾病，炎症细胞释放炎症介质和破坏性酶是COPD发展的核心。有报道指出，阻断核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白3（nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein-3，NLRP3）炎症小体的活化可能是治疗COPD局部炎症反应的重要靶点之一[1]。NLRP3炎症小体的过度激活可与胱天蛋白酶1（caspase-1）相互作用，使caspase-1进行自身激活，从而引起炎症反应[2－3]。

姜黄素（curcumin，Cur）是来源于姜科草本植物姜黄的根茎中的一种脂溶性多酚类色素[4]。现代药物研究发现，Cur通过细胞外信号调节途径抑制炎症因子，最终抑制脂多糖诱导的气道炎症[5]。因而，Cur作为肺部炎症治疗药物已成为近年来研究的热点。目前Cur作用机制的研究已深入到细胞和分子水平，但在COPD的研究中，针对Cur的靶点机制报道还较少。近期研究发现，Cur能够抑制NLRP3炎症小体表达，对肾脏损伤及心血管内皮炎症反应均具有改善作用[6－7]。因此，本文以NLRP3炎症小体通路作为研究切入点，以期为Cur应用于COPD的治疗提供研究基础。

Cur本身存在溶解度小、易被代谢、血药浓度低等特点，使得病灶部分很难维持有效的药物浓度[8]。笔者前期制备了花形乳糖（flower lactose，FL）装载Cur固体脂质纳米粒（solid lipid nanoparticles，SLN）吸入微粉（Cur-SLN-FL），实现Cur的肺内靶向递送[9－10]。本研究在前期研究基础上采用气管内滴注猪胰蛋白酶（1 000 U/kg）复制COPD模型，以布地奈德混悬液为阳性对照药物，肺部吸入受试药物Cur-SLN-FL，研究该受试药物对COPD模型小鼠肺部炎症的改善作用，探讨其可能的分子调控机制，为Cur-SLN-FL改善COPD模型小鼠肺部炎症反应提供可靠的研究依据。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器有PL203型精密电子天平（瑞士Mettler Toledo公司），HELOS-OASIS型激光粒度仪（德国Sympatec公司），EG1150H型生物组织包理机、RM 21351型切片机（德国Leica公司），B071型显微摄影器材（日本Olympus公司），Nikon Ci-L型显微镜（日本Nikon公司），MEK-7222K型全自动血细胞分析仪（日本光电工业株式会社），BJ-PW-FM型大鼠/小鼠干粉定量雾化器、BJ-PW-R型液体定量雾化器（深圳市伯建生物科技有限公司）。

1.2 主要药品与试剂

Cur-SLN-FL（批号20210312）为实验室自制；RIPA细胞裂解液试剂盒、BCA蛋白浓度测定试剂盒、5×蛋白上样缓冲液（批号分别为P00138、P0010、P0015）均购自上海碧云天生物技术有限公司；兔抗鼠NLRP3、caspase-1、核因子κB（nuclear factor of kappa B，NF-κB）、白细胞介素1β（interleukin-1β，IL-1β）抗体，DAB显色试剂盒，兔抗小鼠β-肌动蛋白（β-actin）单克隆抗体（批号分别为12621873002、12CM405B、12J18、BM221118、12I16B26、BM0627）均购自武汉博士德生物工程有限公司；超敏ECL化学发光试剂盒（批号17122220）购自沈阳万类生物科技有限公司；猪胰蛋白酶（批号20Yy06S10165）购自天津鼎国生物技术有限责任公司；注射用盐酸替来他明-盐酸唑拉西泮（批号20201118）购自吉林省华牧动物保健品有限公司；吸入用布地奈德混悬液（批号327583）购自阿斯利康药业（中国）有限公司；其余试剂均为分析纯或实验室常用规格，水为纯净水。

1.3 实验动物

雄性SPF级KM小鼠60只，体重为20～22 g，动物生产许可证号为SCXK（京）2019-0008；雄性SPF级SD大鼠18只，体重为180～210 g，动物生产许可证号为SCXK（京）2016-0011，均购自北京维通利华实验动物技术有限公司。动物饲养于天津市医药科学研究所动物实验室，12 h光/12 h暗循环、温度20～24 ℃、相对湿度40%～70%，自由进食饮水。动物实验经天津市医药科学研究所伦理委员会批准（批准号IMPS-EAEP-Z-18JCQNJC13500-02）。

2 方法

2.1 Cur-SLN-FL的制备及其粒径、载药量的检测

称取处方量的泊洛沙姆188和吐温-80，在75 ℃磁力搅拌下加入适量水作为水相；另称取处方量的Cur、单硬脂酸甘油酯和硬脂酸聚氧乙烯酯，在相同温度和转速下加入适量无水乙醇，完全溶解后作为有机相。在80 ℃、1 020 r/min恒温磁力搅拌下将有机相缓慢注入水相中，滴加完毕后，继续恒温搅拌3 h使其浓缩。趁热将热乳液以1∶1（*V*/*V*）加入0～2 ℃的冷水中，低温固化2 h，即得黄色的Cur-SLN混悬液，然后经冷冻干燥将其微粉化制得Cur-SLN冻干粉，最后将冻干粉以2∶1的比例与FL混匀后过筛，即得Cur-SLN-FL[9－10]。同法制备空白SLN-FL，备用。

取3 g Cur-SLN-FL过200目筛，采用激光粒度仪测定其粒径；而后采用超滤离心法测定其载药量。每个实验重复3次。

2.2 Cur-SLN-FL的肺部刺激性研究

取大鼠18只，采用随机数字表法分为3组，即空气对照组、空白SLN-FL组和Cur-SLN-FL组，每组6只（5只正式+1只备用）。空白SLN-FL组和Cur-SLN-FL组大鼠均采用大鼠干粉定量雾化器将吸入微粉按50 mg/kg经气管给药（依据单次雾化最大给药剂量，参考前期细胞毒性实验、细胞药效学实验结果设置），每日1次，连续7 d；空气对照组大鼠给予等体积空气。末次给药24 h后，处死各组动物，迅速取出气管及肺组织，进行苏木精-伊红（HE）病理检查。

2.3 肺部吸入Cur-SLN-FL对COPD模型小鼠炎症反应的实验研究

2.3.1 COPD动物模型的建立

参照相关文献[11－13]并结合课题组前期预实验结果采用气管内滴注猪胰蛋白酶（1 000 U/kg）复制COPD模型：60只小鼠经盐酸替来他明-盐酸唑拉西泮肌内注射50 mg/kg麻醉后，固定于操作台上呈仰卧状态，从颈部开始做皮肤消毒、备皮，切开皮肤、皮下组织，充分暴露气管后，选择5号针头插入气管内。其中随机选用12只小鼠按1.0 mL/kg注入生理盐水，其余小鼠均滴注猪胰蛋白酶溶液（质量浓度为33.3 mg/mL、给药剂量为1.0 mL/kg）。滴注完毕后，先消毒皮肤并缝合。小鼠苏醒后24 h，无死亡，正常喂养28 d，待分组。

2.3.2 分组及给药

除“2.3.1”项下12只滴注生理盐水的小鼠作为假手术组外，造模成功的模型小鼠按体重随机分为模型组、布地奈德组（依据临床一次吸入的剂量换算成小鼠的剂量为20 mg/kg）和Cur-SLN-FL高、低剂量组（100、50 mg/kg，参考前期预实验结果设置），每组12只（10只正式+2只备用）。Cur-SLN-FL高、低剂量组小鼠均采用小鼠干粉定量雾化器经气管给药；布地奈德组小鼠采用液体定量雾化器经气管给药；假手术组和模型组小鼠经气管给予等体积生理盐水，每日1次，连续14 d。

2.3.3 支气管肺泡灌洗液的白细胞分类计数

末次给药24 h后，处死小鼠，打开胸腔，暴露双肺，取出右肺（每组6只），暴露气管，在气管下段作小T形切口，插入钝钢针头，手术线固定，注射器注入8 mL生理盐水，反复抽吸3次回收支气管肺泡灌洗液（bronchoalveolar lavage fluid，BALF），收集BALF 5～8 mL，3 000 r/min离心10 min，取沉淀细胞加200 μL磷酸盐缓冲液重悬，混匀，采用全自动血细胞分析仪进行细胞分类计数，分别计数白细胞、中性粒细胞、淋巴细胞、嗜酸性粒细胞，得到各类细胞的比例，根据总细胞数量计算出各类细胞的绝对数量。

2.3.4 气管及肺组织形态变化的观察

取各组小鼠气管及部分右肺组织，于4%多聚甲醛固定，常规脱水，石蜡包埋，二甲苯脱去切片中的石蜡，再经常规乙醇梯度洗脱、石蜡包埋后，切片（4 μm厚度），进行HE染色以评估各组小鼠气管及肺组织的形态变化。

2.3.5 肺组织胶原纤维沉积情况的检测

采用Masson染色进行检测。取固定于4%多聚甲醛的各组小鼠右肺组织适量，常规脱蜡至水，染色，冲洗，吹干后，封片，于光学显微镜下观察各组小鼠肺组织胶原纤维沉积情况。

2.3.6 肺组织中NLRP3、caspase-1和IL-1β阳性表达的检测

采用免疫组织化学法进行检测。取各组小鼠左肺组织，分离直径为100 μm左右的肺动脉，4%多聚甲醛固定，石蜡包埋，制成厚度为5 μm的切片，免疫组织化学染色；切片脱蜡，分别加入一抗NLRP3、caspase-1、IL-1β（稀释比例均为1∶200）后，4 ℃过夜，再分别加入相应的二抗（稀释比例为1∶200），脱水封片。在显微镜下观察5个不同视野中NLRP3、caspase-1、IL-1β的阳性细胞数。

2.3.7 肺组织中NLRP3、caspase-1和NF-κB蛋白表达的检测

采用Western blot法进行检测。取各组小鼠（5只）新鲜肺组织适量，加RIPA蛋白裂解液于冰上研磨裂解，在EP管中反复冻融，离心后取上清液，采用BCA蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度，高温使蛋白变性。变性蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳，转至0.45 μm聚偏二氟乙烯膜上，5%脱脂奶粉封闭1～2 h后，分别加入一抗NLRP3、caspase-1、NF-κB（稀释比例均为1∶200），4 ℃振荡过夜；磷酸盐缓冲液洗涤3次后，分别加入相应的二抗（稀释比例为1∶200），室温孵育2 h；加入ECL发光试剂显影，分析各蛋白条带的灰度值，以β-actin为内参计算目的蛋白条带的相对比值。

2.4 统计学方法

采用GraphPad Prism 5.0软件和SPSS21.0软件对数据进行统计分析。数据均以$\bar{x}\pm s$表示。多组间比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用Bonferroni法检验，检验水准$\alpha=0.05$。

3 结果

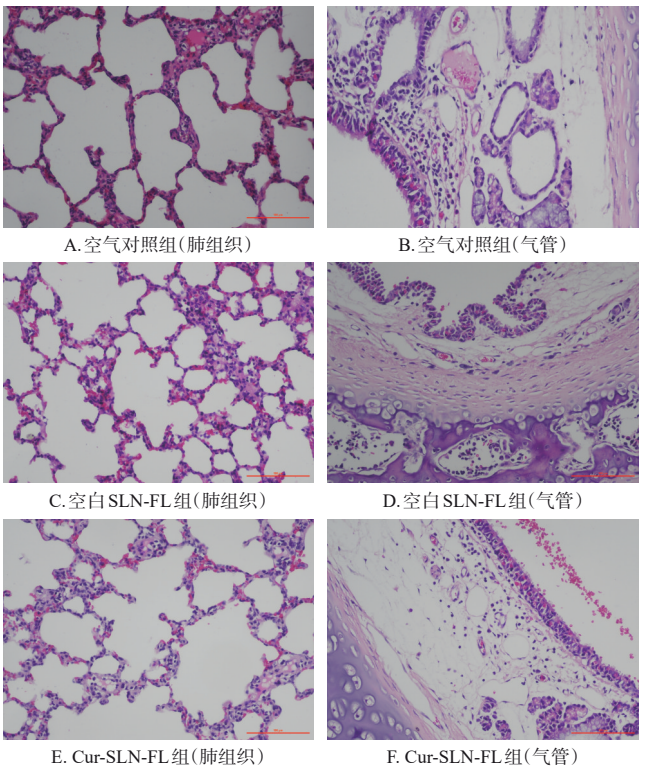
3.1 Cur-SLN-FL粒径和载药量的检测结果

经测定，Cur-SLN-FL的平均粒径为（4.95±0.57）μm、空气动力学粒径为（4.03±0.40）μm，在1～5 μm的范围内，适合肺部吸入微粒的要求[9－10]；载药量为（4.43±0.08）%。

3.2 Cur-SLN-FL的肺部刺激性结果

如图1所示，空气对照组大鼠气管有轻度组织水肿、中度嗜酸性粒细胞浸润，肺泡壁未见明显增厚，有轻微炎症细胞浸润。与空气对照组比较，空白SLN-FL组大鼠气管出现组织水肿，少量嗜酸性粒细胞及淋巴细胞浸润，肺泡壁增厚、间隔增宽，炎症细胞浸润（以淋巴细胞为主），偶见肺泡断裂；Cur-SLN-FL组大鼠气管和肺部未见明显炎症反应。与空白SLN-FL组比较，Cur-SLN-FL组大鼠气管嗜酸性粒细胞及淋巴细胞浸润均减轻，肺

泡壁厚度减小，少量炎症细胞浸润（以淋巴细胞为主）。结果表明，Cur-SLN-FL经呼吸道吸入无明显肺部毒性。



A.空气对照组（肺组织）　B.空气对照组（气管）　C.空白SLN-FL组（肺组织）　D.空白SLN-FL组（气管）　E. Cur-SLN-FL组（肺组织）　F. Cur-SLN-FL组（气管）

图1　各组大鼠气管和肺组织的病理图（HE染色，×200）

3.3　肺部吸入Cur-SLN-FL对COPD模型小鼠炎症反应的影响

3.3.1　BALF的白细胞分类计数结果

与假手术组比较，模型组小鼠BALF中白细胞总数、中性粒细胞数、嗜酸性粒细胞数均显著增加，淋巴细胞数显著降低（$P<0.05$），提示采用气管内滴注猪胰蛋白酶溶液复制的COPD模型小鼠支气管中存在大量炎症细胞聚集。与模型组比较，Cur-SLN-FL高、低剂量组和布地奈德组小鼠BALF中白细胞总数、中性粒细胞数、嗜酸性粒细胞数均有降低趋势，其中Cur-SLN-FL低剂量组和布地奈德组小鼠BALF中白细胞总数、中性粒细胞数以及Cur-SLN-FL低剂量组小鼠BALF中嗜酸性粒细胞数，差异有统计学意义（$P<0.05$）。与模型组比较，Cur-SLN-FL高剂量组小鼠淋巴细胞数显著升高（$P<0.05$）。结果见表1。

表1　各组小鼠BALF中白细胞分类计数的结果（$\bar{x}\pm s$，$n=6$，$\times10^9$/L）

组别	白细胞总数	中性粒细胞数	淋巴细胞数	嗜酸性粒细胞数
假手术组	0.383±0.117	0.167±0.133	0.167±0.103	0.050±0.055
模型组	1.150±0.459[a]	0.550±0.187[a]	0.017±0.041[a]	0.467±0.327[a]
布地奈德组	0.567±0.121[b]	0.250±0.082[b]	0.050±0.055	0.267±0.121
Cur-SLN-FL高剂量组	0.883±0.512	0.417±0.194	0.183±0.256[b]	0.233±0.197
Cur-SLN-FL低剂量组	0.433±0.121[b]	0.250±0.105[b]	0.067±0.082	0.083±0.041[b]

a：与假手术组比较，$P<0.05$；b：与模型组比较，$P<0.05$。

3.3.2　Cur-SLN-FL对COPD模型小鼠气管及肺组织病理学形态的影响

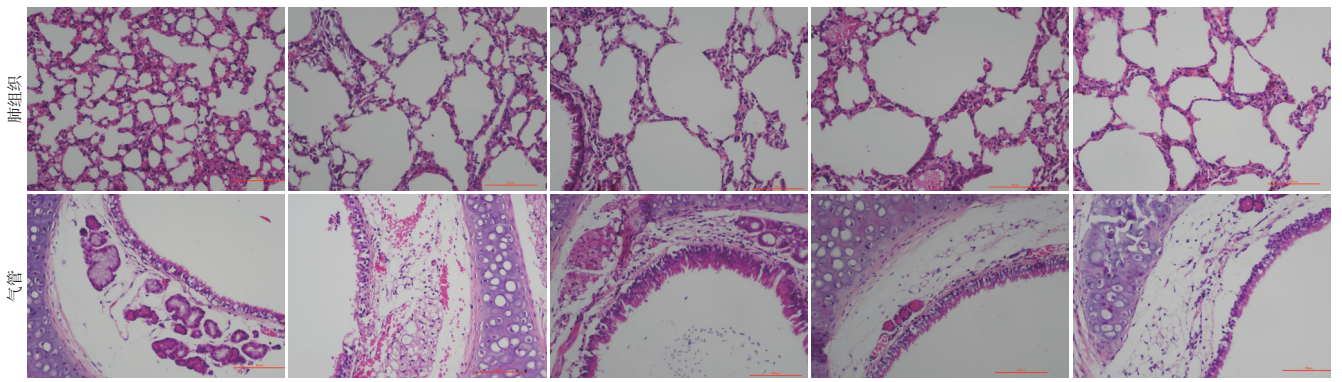
如图2所示，假手术组小鼠气管正常，偶见局部轻度水肿，伴有少量嗜酸性粒细胞浸润；肺泡壁少量出血，局部肺泡轻度扩张。与假手术组比较，模型组小鼠气管见纤毛柱状上皮增生增厚、脱落，腔内见黏液蓄积；肺组织可见间质炎症细胞浸润。与模型组比较，Cur-SLN-FL高剂量组小鼠气管见纤毛柱状上皮增生增厚、脱落，腔内偶见黏液蓄积；肺组织间质均可见轻度炎症细胞浸润，巨噬细胞聚集较明显，均可见肺泡壁变薄、断裂，肺泡腔扩大，部分融合成肺大泡。Cur-SLN-FL低剂量组小鼠气管纤毛柱状上皮部分脱落，少量黏液蓄积，肺组织间质可见轻度炎症细胞浸润。布地奈德组小鼠气管纤毛柱状上皮部分脱落，少量黏液蓄积；肺组织间质可见轻度炎症细胞浸润。

3.3.3　Cur-SLN-FL对COPD模型小鼠肺组织胶原纤维沉积的影响

如图3所示，假手术组小鼠肺泡隔及肺间质见极少量胶原纤维；与假手术组比较，模型组小鼠肺泡隔及肺间质见大量胶原纤维，较致密、深染，提示模型组肺组织出现了明显的肺纤维化病理状态；与模型组比较，Cur-SLN-FL高、低剂量组和布地奈德组小鼠的胶原纤维沉积均有所改善。

3.3.4　Cur-SLN-FL对COPD模型小鼠肺组织中NLRP3、caspase-1和IL-1β阳性表达的影响

NLRP3阳性表达主要见于肺泡间隔及肺泡腔内巨噬细胞胞浆，呈棕色或棕黄色。如图4所示，假手术组未



A.假手术组　B.模型组　C. Cur-SLN-FL高剂量组　D. Cur-SLN-FL低剂量组　E.布地奈德组

图2　各组小鼠气管和肺组织的病理图（HE染色，×200）

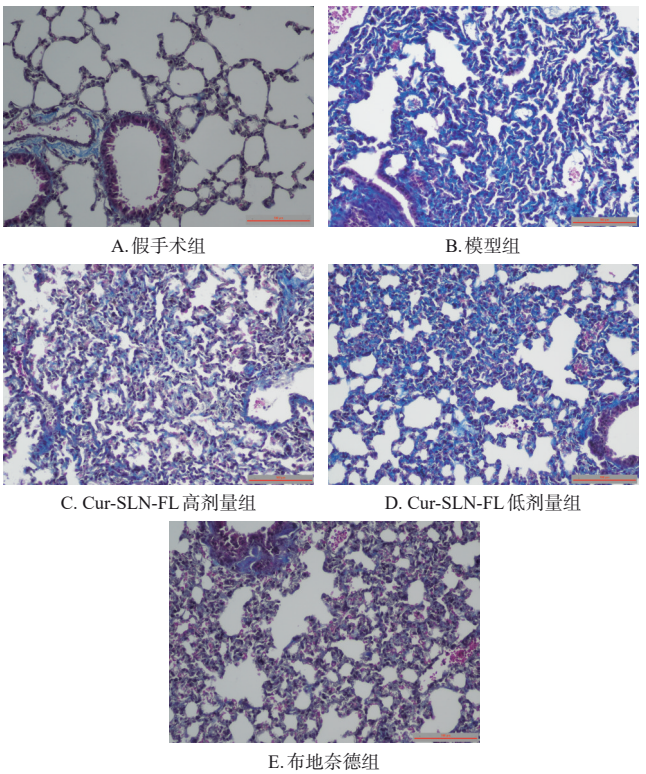


图3　各组小鼠肺组织胶原纤维沉积的显微图（Masson染色，×200）

见明显阳性表达；模型组可见散在的、较多的阳性细胞；与模型组比较，布地奈德组及Cur-SLN-FL低剂量组的阳性表达有所降低。caspase-1阳性表达主要见于肺泡间隔及肺泡腔内巨噬细胞胞浆，呈棕色或棕黄色。假手术组偶见散在的阳性细胞表达；模型组可见散在的、较多的阳性细胞；与模型组比较，Cur-SLN-FL低剂量组阳性表达明显降低。IL-1β阳性表达主要分布在浸润的炎症细胞，少量分布在间质，呈棕黄色。与模型组比较，Cur-SLN-FL低剂量组阳性表达明显降低。

3.3.5　Cur-SLN-FL对COPD模型小鼠肺组织中NLRP3、caspase-1和NF-κB蛋白表达的影响

如表2和图5所示，与假手术组比较，模型组小鼠肺组织中NLRP3、caspase-1、NF-κB蛋白的表达水平均显著升高（$P<0.05$）。与模型组比较，Cur-SLN-FL高剂量组和布地奈德组小鼠肺组织中NLRP3、caspase-1、NF-κB蛋白的表达水平均显著降低（$P<0.05$）。

4　讨论

作为局部给药的剂型，评价药物的局部刺激性也是考察吸入药物的安全性的重要指标[14]。本研究通过大鼠吸入气管和肺组织刺激性实验，结合课题组前期研究结果[9-10]，明确了Cur-SLN-FL是一种低毒、刺激性较小的新型且具有缓释性能的粉雾剂。吸入刺激性实验中，采用大鼠干粉定量雾化器将定量的Cur-SLN-FL以雾化的状态递送至肺部，采用同样方式每日给予等体积空气的空气对照组大鼠气管出现轻度组织水肿和中度嗜酸性粒细胞浸润。与空气对照组比较，Cur-SLN-FL组大鼠未见明显炎症反应；与吸入空白SLN-FL比较，吸入Cur-SLN-FL可降低大鼠气道炎症水平，减轻水肿程度，对肺泡具有保护作用，可减轻肺泡壁的增厚，缓解肺部炎症的发生。

COPD常用造模诱导剂包括有害气体（如香烟烟雾、脂多糖、猪胰蛋白酶），这些诱导剂都可使模型动物产生肺部炎症及肺气肿[15]。本研究中课题组采用猪胰蛋白酶诱导造模，是模拟COPD发病时蛋白酶/抗蛋白酶系统的失衡引起的弹性蛋白过度破坏分解，外周气道扩张，从而产生肺气肿。结果显示，模型小鼠肺组织可见间质炎症细胞浸润和肺气肿，组织水肿、偶见少量出血，肺泡间隔及肺间质可见大量胶原纤维，肺内气管见纤毛柱状上皮增生增厚、脱落，腔内可见黏液蓄积，提示造模成功。而肺部吸入Cur-SLN-FL可改善COPD模型小鼠肺组织的病理变化。同时，有报道指出BALF中白细胞的

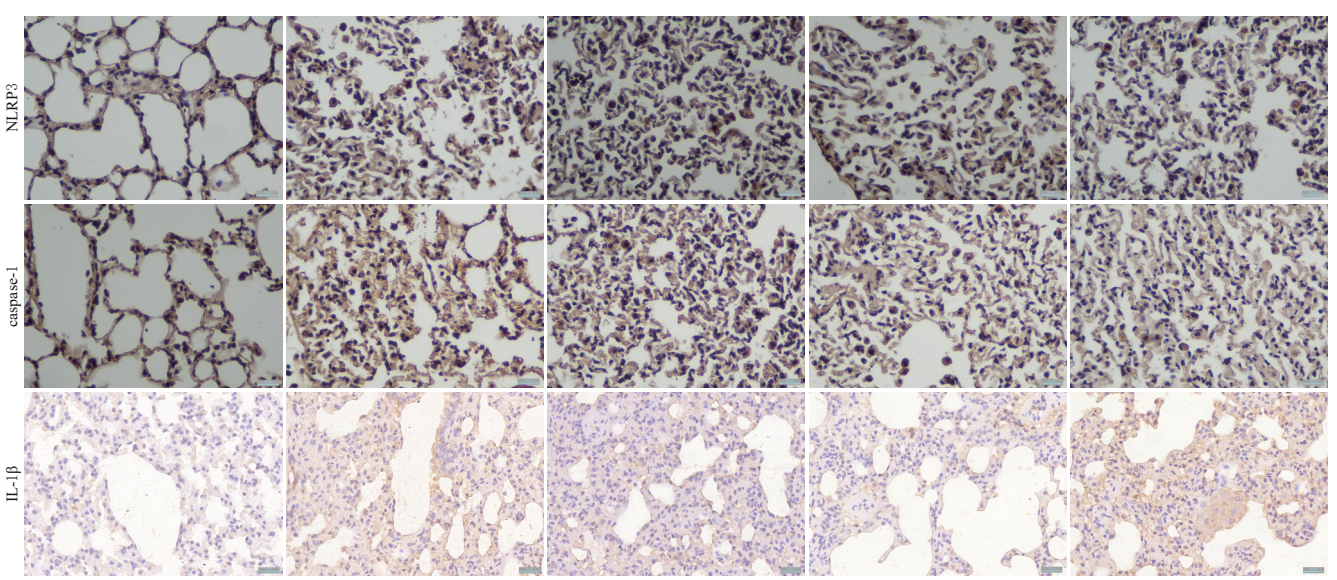


图4　各组小鼠肺组织中NLRP3、caspase-1和IL-1β阳性表达的免疫组化图（×400）

表2　各组小鼠肺组织中NLRP3、caspase-1、NF-κB蛋白表达的结果（$\bar{x}\pm s$，$n=5$）

组别	NRPL3	NF-κB	caspase-1
假手术组	0.060±0.043	0.228±0.238	0.040±0.033
模型组	0.735±0.415[a]	0.763±0.403[a]	0.316±0.201[a]
布地奈德组	0.031±0.013[b]	0.169±0.094[b]	0.033±0.023[b]
Cur-SLN-FL高剂量组	0.113±0.050[b]	0.146±0.029[b]	0.080±0.048[b]
Cur-SLN-FL低剂量组	0.342±0.353	0.395±0.256	0.284±0.087

a：与假手术组比较，$P<0.05$；b：与模型组比较，$P<0.05$。

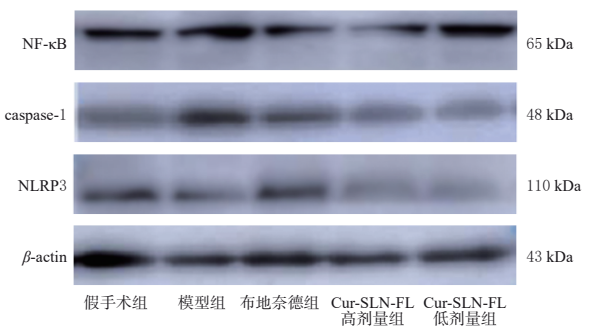


图5　各组小鼠肺组织NLRP3、caspase-1、NF-κB蛋白电泳图

比例及其含量对重症肺炎具有重要的诊断价值[16]。本实验对BALF进行了测定，结果显示，COPD模型小鼠的BALF中存在大量炎症细胞，而肺部吸入Cur-SLN-FL后炎症细胞明显减少，这一结果可证实Cur-SLN-FL对COPD具有明显的改善作用。

NLRP3作为固有免疫的重要组分在机体免疫反应和疾病发生过程中具有重要作用。由于能被多种类型的病原体或危险信号所激活，NLRP3炎症小体可能为各种炎症疾病的治疗提供新的靶点。NLRP3能够调节caspase-1的活化进而在天然免疫防御的过程中促进细胞因子前体pro-IL-1β和pro-IL-18的成熟和分泌[3]。研究发现，NF-κB是COPD等肺部炎症疾病的一个重要特征，其表达水平与COPD气道、肺血管重构呈正相关[17]。因此，本研究将NLRP3、caspase-1、IL-1β和NF-κB作为考察指标。结果显示，COPD模型小鼠肺组织中NLRP3炎症小体被激活，导致下游因子caspase-1蛋白活化，进而促进IL-1β的阳性表达水平升高；同时肺组织中的NF-κB蛋白表达明显增强，表明该炎症介质的表达处于高水平。而肺部吸入Cur-SLN-FL可明显抑制肺组织中炎症介质的分泌，从而阻断COPD模型小鼠肺组织中NLRP3、caspase-1、IL-1β和NF-κB的表达，提示Cur-SLN-FL可抑制COPD模型小鼠的肺部炎症，其作用机制与抑制NLRP3信号通路有关。

综上所述，Cur-SLN-FL能够改善猪胰蛋白酶诱导的COPD模型小鼠的肺部炎症反应，其机制可能是通过调控NLRP3信号通路，抑制caspase-1、NF-κB、IL-1β的表达，进而缓解COPD模型小鼠肺组织纤维化的进程。

参考文献

[1] MAHALANOBISH S，DUTTA S，SAHA S，et al. Melatonin induced suppression of ER stress and mitochondrial dysfunction inhibited NLRP3 inflammasome activation in COPD mice[J]. Food Chem Toxicol，2020，144：111588.

[2] 胡万福，刘明，杨燕，等. 清肺保元胶囊对COPD模型大鼠气道炎症的抑制作用及对NLRP3信号通路的影响[J]. 中国药房，2021，32(3)：309-313.

[3] FU Q，WU J，ZHOU X Y，et al. NLRP3/caspase-1 pathway-induced pyroptosis mediated cognitive deficits in a mouse model of sepsis-associated encephalopathy[J]. Inflammation，2019，42(1)：306-318.

[4] 李楠，李旭，程鹏，等. 纳米多孔花形乳糖装载姜黄素干粉吸入剂的制备及体外释药性能研究[J]. 中国药房，2021，32(7)：794-801.

[5] 张金兰，李朝霞，黄支隆. 姜黄素在肺部疾病中的研究进展[J]. 贵州医药，2019，43(1)：42-45.

[6] LU M M，YIN N C，LIU W，et al. Curcumin ameliorates diabetic nephropathy by suppressing NLRP3 inflammasome signaling[J]. Biomed Res Int，2017，2017：1516985.

[7] 姜楠，周科成，寇俊萍. 中药有效成分调控NLRP3炎症小体活化的研究进展[J]. 药学进展，2016，40(10)：730-738.

[8] 李楠，李旭，刘伟伟，等. 姜黄素固体脂质纳米粒干粉吸入剂的体外释药、体内急性毒性及对哮喘模型小鼠炎症反应的影响[J]. 中国药房，2019，30(3)：332-338.

[9] LI N，LI X，CHENG P，et al. Preparation of curcumin solid lipid nanoparticles loaded with flower-shaped lactose for lung inhalation and preliminary evaluation of cytotoxicity *in vitro*[J]. Evid Based Complement Alternat Med，2021，2021：4828169.

[10] 李楠，李旭，程鹏，等. 纳米多孔花形乳糖装载姜黄素固体脂质纳米粒吸入微粉的制备及其体外抑凋亡作用研究[J]. 中国药房，2023，34(2)：150-155.

[11] 路武杰，冯志军，郭俊华，等. 几种常见慢性阻塞性肺疾病动物模型造模方法的比较[J]. 中华实验外科杂志，2015，32(10)：2404.

[12] 张婷，林也，陈小娟，等. 慢性阻塞性肺疾病病证结合动物模型研究进展[J]. 中国中医急症，2021，30(12)：2240-2244.

[13] 陈文祥，王雍立，谢子昂，等. 应用弹性蛋白酶诱导构建新型慢性阻塞性肺疾病合并骨质疏松症的动物模型[J]. 中国骨伤，2020，33(4)：356-362.

[14] 冯红敏，盛云华，胡玥，等. 药用辅料丙三醇气管内雾化给药局部刺激性和细胞毒性研究[J]. 中国药学杂志，2019，54(1)：42-46.

[15] 刘迪，张洪春. 慢性阻塞性肺疾病动物模型的造模方法[J]. 中国比较医学杂志，2020，30(3)：108-114.

[16] 陈咏芳，唐玮欣，陈丽芳. 血清和支气管肺灌洗液中多项指标对重症肺炎的诊断价值[J]. 中国当代医药，2019，26(33)：165-168.

[17] 赵朝华，廖和和，王甲林，等. 阿奇霉素对慢阻肺大鼠肺脏病理损伤、氧化应激及TLR4/NF-κB信号通路的调节作用[J]. 西部医学，2019，31(12)：1831-1836.

（收稿日期：2023-01-17　修回日期：2023-06-16）

（编辑：曾海蓉）