

• 基础研究 •

## 阿奇霉素对高氧暴露新生大鼠肺损伤保护作用的研究

王燕琼, 黄智峰, 陈雪雨, 韩东山, 林冰纯, 黄子璐, 杨传忠\*

南方医科大学第一临床医学院, 深圳市妇幼保健院新生儿科, 广东 深圳 518000

**[摘要]** 目的:探讨阿奇霉素(azithromycin, AZM)对治疗新生大鼠支气管肺发育不良(bronchopulmonary dysplasia, BPD)的有效性。方法:将新生大鼠随机分成空气-生理盐水(RA-Saline)组、空气-阿奇霉素(RA-AZM)组、氧气-生理盐水(O<sub>2</sub>-Saline)组、氧气-阿奇霉素(O<sub>2</sub>-AZM)组, O<sub>2</sub>-Saline组和O<sub>2</sub>-AZM组大鼠组在出生12 h内暴露于浓度为95%~100%的高氧中以建立BPD新生大鼠模型, RA-AZM组、O<sub>2</sub>-AZM组在生后第1~10天每天腹腔注射AZM(40 mg/kg), RA-Saline组和O<sub>2</sub>-Saline组给予等剂量的生理盐水, 观察大鼠的生存率; qPCR检测炎症因子和趋化因子的表达; 测量肺泡平均线性截距(mean linear intercept, MLI)及次级肺泡隔的生成、肺血管密度来评估AZM对BPD新生大鼠肺发育的影响, 并通过免疫组化检测肺组织中性粒细胞及巨噬细胞来评估AZM对炎症细胞的影响。结果:与O<sub>2</sub>-Saline组比较, O<sub>2</sub>-AZM组大鼠10 d存活率差异无统计学意义( $P > 0.05$ ); qPCR结果显示, 与O<sub>2</sub>-Saline组比较, O<sub>2</sub>-AZM组大鼠白介素-6(interleukin-6, IL-6)、单核细胞趋化蛋白-1(monocyte chemotactic protein-1, MCP-1)、纤溶酶原激活物抑制剂-1(plasminogen activator inhibitor-1, PAI-1)表达显著下降( $P < 0.05$ ), 中性粒细胞趋化因子-1(cytokine induced neutrophil chemoattractant-1, CINC-1)表达差异无统计学意义( $P > 0.05$ ); ELISA结果表明, 与O<sub>2</sub>-Saline组比较, O<sub>2</sub>-AZM组大鼠IL-6水平显著下降( $P < 0.05$ ); 免疫组化结果显示, O<sub>2</sub>-AZM组大鼠肺组织巨噬细胞及中性粒细胞聚集显著减少, 肺血管密度及次级肺泡隔计数增加, 差异均有统计学意义; HE病理分析结果显示, 与O<sub>2</sub>-Saline组比较, O<sub>2</sub>-AZM组大鼠MLI显著缩短, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。结论:AZM可降低高氧暴露新生大鼠肺组织炎症因子和趋化因子的释放, 抑制炎症细胞的趋化或募集, 改善高氧暴露新生大鼠BPD样肺损伤。

**[关键词]** 阿奇霉素; 支气管肺发育不良; 高氧暴露; 炎症; 肺发育

**[中图分类号]** R722.6

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2024)07-901-08

**doi:** 10.7655/NYDXBNSN240102

## Investigation of the protective effect of azithromycin on pulmonary injury in neonatal rats exposed to hyperoxia

WANG Yanqiong, HUANG Zhifeng, CHEN Xueyu, HAN Dongshan, LIN Bingchun, HUANG Zilu, YANG Chuanzhong\*  
Department of Neonatal, Shenzhen Maternal and Child Health Care Hospital, the First School of Clinical Medicine, Southern Medical University, Shenzhen 518000, China

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effectiveness of azithromycin (AZM) on bronchopulmonary dysplasia (BPD) in neonatal rats. **Methods:** Neonatal rats were randomly assigned to four groups: room air-saline (RA-Saline) group, room air-azithromycin (RA-AZM) group, oxygen-saline (O<sub>2</sub>-Saline) group, and oxygen-azithromycin (O<sub>2</sub>-AZM) group. The O<sub>2</sub>-Saline group and O<sub>2</sub>-AZM group were exposed to 95% to 100% oxygen within 12 hours of birth to establish a BPD rat model. The RA-AZM and O<sub>2</sub>-AZM groups received daily intraperitoneal injections of AZM at a dosage of 40 mg/kg from postnatal day 1 to day 10, while the RA-Saline and O<sub>2</sub>-Saline groups were administered an equal volume of saline. The survival rate of the rats was carefully observed. qPCR analysis was conducted to detect the expression of inflammatory factors and chemokines. Additionally, the alveolar mean linear intercept (MLI), the formation of secondary alveolar septa, and pulmonary vascular density were measured to assess the impact of AZM on lung development in BPD neonatal rats. Immunohistochemical detection of neutrophils and macrophages in lung tissue was also performed to evaluate the anti-inflammatory effect of AZM on inflammatory cells. **Results:** Compared to the O<sub>2</sub>-Saline group, the 10-day survival rate of rats in the O<sub>2</sub>-AZM group did not exhibit a statistically significant difference ( $P > 0.05$ ). qPCR analysis revealed that the

**[基金项目]** 深圳市“医疗卫生三名工程”(SZSM 202211001); 广东省高水平临床重点专科(SZGSP009)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: yangczgd@163.com

expressions of interleukin-6 (IL-6), monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), and plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) were significantly reduced in the O<sub>2</sub>-AZM group compared to the O<sub>2</sub>-Saline group ( $P < 0.05$ ), while the expression of cytokine induced neutrophil chemoattractant-1 (CINC-1) showed no significant difference ( $P > 0.05$ ). ELISA analysis further confirmed a significant reduction in IL-6 levels in the O<sub>2</sub>-AZM group compared to the O<sub>2</sub>-Saline group ( $P < 0.05$ ). Immunohistochemical analysis revealed a marked reduction in the accumulation of macrophages and neutrophils in the lung tissues of the O<sub>2</sub>-AZM group, along with an increase in pulmonary vascular density and the count of secondary alveolar septa, all of which were statistically significant. Furthermore, HE pathological examination revealed a significantly shortened MLI in the O<sub>2</sub>-AZM group compared to the O<sub>2</sub>-Saline group, indicating a statistically significant difference ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** AZM reduces the release of inflammatory factors and chemokines in lung tissues of neonatal rats exposed to hyperoxia, inhibits the chemotaxis or recruitment of inflammatory cells, and alleviates BPD-like lung injury in neonatal rats after hyperoxia exposure.

[Key words] azithromycin; bronchopulmonary dysplasia; hyperoxia exposure; inflammation; lung development

[J Nanjing Med Univ, 2024, 44(07): 901-908]

支气管肺发育不良 (bronchopulmonary dysplasia, BPD) 是早产儿最常见的并发症之一, 据报道, 我国超未成熟儿 BPD 的发生率为 74.2%<sup>[1]</sup>, 这使得婴幼儿死亡风险增加, 并使患儿更易罹患慢性肺部疾病及心血管疾病、神经系统发育延迟及生长发育障碍<sup>[2]</sup>。但到目前为止, BPD 仍然没有有效的治疗方法。BPD 的发病机制尚不明确, 可能因为感染、炎症、氧中毒、机械通气以及其他因素阻碍了出生后肺的成熟<sup>[3]</sup>。抗炎因子及促炎因子的失衡是影响肺泡生成和肺血管发育的重要因素<sup>[4-5]</sup>。既往研究也发现, 巨噬细胞及中性粒细胞从血管向肺组织聚集是 BPD 的一个特征性表现<sup>[6]</sup>。炎症对 BPD 的发生发展起到重要作用<sup>[5,7]</sup>。

研究表明, 糖皮质激素可一定程度提高机械通气拔管成功率, 但其对 BPD 的有效性仍不明确<sup>[8]</sup>, 而且糖皮质激素也会增加近远期严重的不良反应, 如高血糖、高血压、自发性肠穿孔和中枢神经系统发育落后等<sup>[9]</sup>, 因此, 临床上并未将糖皮质激素作为 BPD 的常规预防用药。阿奇霉素 (azithromycin, AZM) 是一种大环类酯类抗生素, 它兼具抗感染及抗炎作用<sup>[10-11]</sup>。它可通过抑制核因子- $\kappa$ B 发挥独特的免疫调节作用来限制促炎细胞因子如白介素 (interleukin, IL)-6 和 IL-8 的产生来减少肺部炎症, 它还可以抑制中性粒细胞迁移, 通过改变巨噬细胞的极化状态增加巨噬细胞的吞噬作用而发挥抗炎作用<sup>[12]</sup>。有研究显示, 预防性应用 AZM 可以通过清除解脲脲原体 (ureaplasma urealyticum, UU), 并抑制肺部炎症反应, 从而降低 BPD 的发病率和死亡率<sup>[13]</sup>, 然而, AZM 对治疗 BPD 有效性仍存在争议<sup>[8]</sup>。本研究通过建立 BPD 新生大鼠模型, 探讨 AZM 对

BPD 的有效性及其潜在的作用机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 动物

15 只健康清洁的 SD 孕鼠由南方医科大学实验动物中心提供, 动物许可证号 [SCXK(粤)2021-0041]。将动物饲养于 SPF 级实验动物房, 饲养温度为 20~24 °C, 湿度为 50%~60%, 新生 SD 大鼠作为实验对象。本实验通过中国科学院深圳先进技术研究院实验动物管理和使用委员会批准, 伦理审核批件编号: SFYLS[2021]019。

#### 1.1.2 试剂

AZM (辉瑞公司, 美国)、鼠单克隆抗  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白 ( $\alpha$ -smooth muscle actin,  $\alpha$ -SMA) 抗体 (A2547, Sigma-Aldrich 公司, 美国)、兔多克隆抗血管性血友病因子 (von Willebrand factor, vWF) 抗体 (A0082, Dako Cytomation 公司, 丹麦)、抗 CD68 抗体 (ab31630, Abcam 公司, 美国)、抗髓过氧化物酶 (myeloperoxidase, MPO) 抗体 (ab208670, Abcam 公司, 美国)、TRIzol 试剂 (#15596026, Invitrogen 公司, 美国)、HRP 标记山羊抗兔二抗 (ab6728, Abcam 公司, 美国)、HRP 标记兔抗小鼠二抗 (ab6721, Abcam 公司, 美国)、1% BSA (A1933, Sigma-Aldrich 公司, 美国)、NovaRed (K-4800, Vector 公司, 美国)、cDNA 合成试剂盒 (K1622, Thermo Scientific 公司, 美国)、内源性过氧化物酶强力封闭液 (上海碧云天生物技术有限公司)、HE 染色试剂盒 (北京索莱宝科技有限公司)、大鼠白介素-6 (interleukin-6, IL-6) ELISA Kit (#PI328, 上海碧云天生物技术有限公司)、大鼠单核

细胞趋化蛋白1(monocyte chemotactic protein-1, MCP-1)ELISA Kit(#KE20009, Proteintech公司, 美国)。

### 1.1.3 仪器

HM315 石蜡切片机(Thermo Microm 公司, 美国)、生物组织包埋机+冷台(Leica 公司, 德国)、脱色摇床(江苏南达生物技术开发公司)、光学显微镜(Olympus 公司, 日本)、涡旋振荡器、组织匀浆机(IKA 公司, 德国)、高速冷冻离心机(Eppendorf 公司, 美国)、凝胶成像分析系统(BIO-RAD 公司, 美国)、定量PCR仪-7300 Plus 系统(Applied Biosystems 公司, 美国)。

## 1.2 方法

### 1.2.1 造模及分组

将SD新生大鼠在生后12 h内随机分为空气-生理盐水(RA-Saline)组22只、空气-AZM(RA-AZM)组22只, 氧气组分为氧气-生理盐水(O<sub>2</sub>-Saline)组23只、氧气-AZM(O<sub>2</sub>-AZM)组22只, 每组动物雌雄比例相同。空气组置于空气环境[吸入氧浓度(fraction of inspiration O<sub>2</sub>, FiO<sub>2</sub>)=21%], 氧气组在出生12 h内置于自制氧箱内, 持续暴露于高氧中, 维持FiO<sub>2</sub>于95%~100%。在生后第1天, RA-AZM、O<sub>2</sub>-AZM组每日给予大鼠AZM 40 mg/kg腹腔注射连续10 d, 生理盐水对照组给予等剂量的生理盐水, 实验方案如图1所示。每组动物在第11天进行安乐死并取材。所有动物饲养于SPF级实验动物房, 饲养温度为20~24℃, 湿度为50%~60%, 自动设置12 h明暗交替, 仔鼠予母乳喂养, 每天空气组母鼠与氧气组母鼠进行交换以防止母鼠氧气中毒导致母乳量减少, 每天更换垫料及仔鼠称重, 及时补充饲料及饮用水。

### 1.2.2 标本收集

在大鼠生后第11天, 腹腔注射戊巴比妥钠(160 mg/kg)进行安乐死, 剪开腹腔皮肤, 暴露出腹腔动静脉, 剪断腹腔动静脉进行排气。排气完成后, 其中24只鼠打开胸腔, 直接取肺组织, 迅速置于

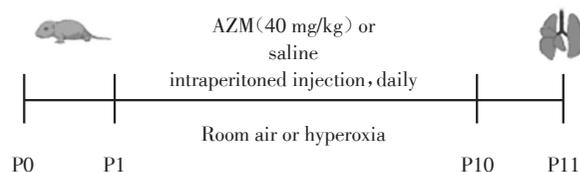


图1 实验方案

Figure 1 Experimental protocol

液氮中冷冻, 然后放置于-80℃冰箱保存, 用于qPCR检测。26只动物在排气完成后, 剪开颈部皮肤, 分离气管周围肌肉组织, 暴露气管, 利用24 G动脉留置针行气管插管, 退出针芯, 手术线扎紧固定, 用4%多聚甲醛进行肺组织原位固定后, 拔除气管插管, 沿胸骨正中打开胸腔, 可见肺组织膨胀, 分离出肺组织和心脏, 置于装有4%多聚甲醛的EP管中4℃冰箱放置24 h, 石蜡包埋切片, 用于HE染色及免疫组化。

### 1.2.3 HE染色及肺泡平均线性截距(mean linear intercept, MLI)的测量

将在4%多聚甲醛中固定24 h后的肺组织进行石蜡包埋。连续切片(厚度4 μm), 放于60℃烤箱中6 h。然后进行HE染色, 树脂封片, 光镜下观察肺组织形态结构。选取染色良好的肺组织, 在200倍放大倍数下拍摄10张照片, 避开大血管和大气道, 使用CellSens软件(Olympus公司, 日本)载入照片, 每张照片载入平均分布的21条直线, 计数测量线末端两点落在肺泡(pulmonary alveoli, PA)里的个数N<sub>1</sub>、测量线末端两点落在气道(air duct, AD)里的个数N<sub>2</sub>、测量线与肺泡间隔(alveolar septum, AS)相交的次数N<sub>3</sub>, 按照公式 $MLI=d \times (N_1 + N_2) / N_3$ 计算, d代表直线长度120 μm<sup>[14]</sup>。

### 1.2.4 qPCR检测炎症因子的表达

使用组织匀浆机将肺组织进行匀浆, 分离并提取出RNA, 用cDNA合成试剂盒合成cDNA。在Applied Biosystems 7300 Plus系统上进行实时定量PCR。β-actin用作管家基因。引物列于表1中。

表1 引物序列

Table 1 Sequences of primers

| Gene    | Forward(5'→3')           | Reverse(5'→3')          |
|---------|--------------------------|-------------------------|
| IL-6    | ATATGTTCTCAGGGAGATCTTGGA | TGCATCATCGCTGTTTCATACAA |
| CINC-1  | GCACCCAAACCGAAGTCATA     | GGGGACACCCTTTAGCATCT    |
| MCP-1   | ATGCAGTTAATGCCCGAGTCA    | TTCTCCAGCCGACTCATTGG    |
| PAI-1   | AGCTGGGCATGACTGACATCT    | GCTGCTCTTGGTCGGAAAGA    |
| β-actin | TTCAACACCCAGCCATGT       | AGTGGTACGACCAGAGGCATACA |

CINC-1: cytokine induced neutrophil chemoattractant-1; PAI-1: plasminogen activator inhibitor-1.

### 1.2.5 免疫组织化学分析

将肺组织进行切片,用抗vWF抗体(标记肺血管,1:5 000稀释)、抗CD 68单克隆抗体(标记巨噬细胞,1:500稀释)、抗MPO抗体(标记中性粒细胞,1:1 000稀释)、抗 $\alpha$ -SMA抗体(标记次级肺泡隔,1:10 000稀释)作为一抗孵育,1% BSA作为对照,二抗孵育用HRP偶联的抗小鼠/兔抗体(1:1 000稀释)。使用显色底物NovaRed显色。在200倍放大倍数下观察vWF染色阳性的切片,每个组织取非重叠10个代表性视野,计数每个视野肺血管的个数,取平均值代表每只动物的肺血管密度;在400倍放大倍数下观察CD68及MPO染色阳性的切片,每个组织取10个代表性视野,计数每视野巨噬细胞及中性粒细胞数量,最后求平均值;在400倍放大倍数下观察 $\alpha$ -SMA染色阳性的切片,在10个非重叠视野中对每个组织中的次级肺泡隔的数量进行计数,并校正/标准化组织面积<sup>[15]</sup>。所有计数方式均为双人双盲计数取平均值。

### 1.2.6 ELISA检测细胞因子

将肺组织进行匀浆,用蛋白裂解液提取蛋白,待充分裂解后,台式离心机预冷至4℃,14 000 r/min离心20 min,取上清液分装至EP管备用,用BCA法测定溶液总蛋白的浓度。将蛋白提取液稀释至合适的浓度进行IL-6、MCP-1细胞因子浓度检测,最终根据总蛋白浓度算得IL-6、MCP-1的终浓度,以pg/mg表示。

### 1.3 统计学方法

实验数据统计及分析用GraphPad Prism 8软件,实验数据结果以均数 $\pm$ 标准误( $\bar{x} \pm s_x$ )表示,多组间比较采用单因素方差分析,通过Sidak校正的t检验进行多重比较,用Kaplan-Meier分析方法绘制生存曲线,通过Log-rank检验进行统计分析,采用双侧检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

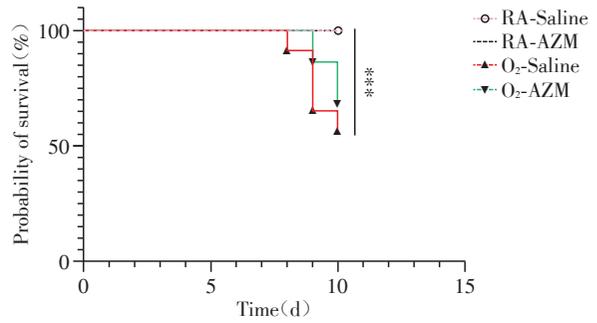
## 2 结果

### 2.1 AZM对高氧暴露组新生大鼠生存率的影响

如图2所示,RA-Saline组新生大鼠无死亡,O<sub>2</sub>-Saline组对比RA-Saline组生存率明显下降( $P < 0.001$ ),O<sub>2</sub>-AZM组对比O<sub>2</sub>-Saline组10 d存活率差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

### 2.2 AZM对高氧暴露肺损伤炎症因子/炎症趋化因子的作用

与RA-Saline组比较,O<sub>2</sub>-Saline组MCP-1、CINC-1、IL-6、PAI-1 mRNA表达水平明显升高( $P < 0.05$ ),与



The 10-day survival curve of neonatal rats in the RA-Saline group ( $n=22$ ), RA-AZM group ( $n=22$ ), O<sub>2</sub>-Saline group ( $n=23$ ), and the O<sub>2</sub>-AZM group ( $n=22$ ), \*\*\* $P < 0.001$ .

图2 AZM对高氧暴露新生大鼠生存率的影响  
Figure 2 Effect of AZM on the survival rate of neonatal rats exposed to hyperoxia

O<sub>2</sub>-Saline组比较,O<sub>2</sub>-AZM组MCP-1、PAI-1、IL-6表达水平明显降低( $P < 0.05$ ),CINC-1水平有下降趋势,但差异无统计学意义( $P=0.07$ )。肺组织匀浆的ELISA定量结果显示,IL-6及MCP-1在高氧暴露组表达明显升高( $P$ 均 $< 0.05$ ),O<sub>2</sub>-AZM组较O<sub>2</sub>-Saline组IL-6表达明显降低( $P < 0.05$ ),而MCP-1的表达有下降趋势,但差异无统计学意义( $P > 0.05$ ,图3)。

### 2.3 AZM对高氧暴露新生大鼠肺部炎症细胞的影响

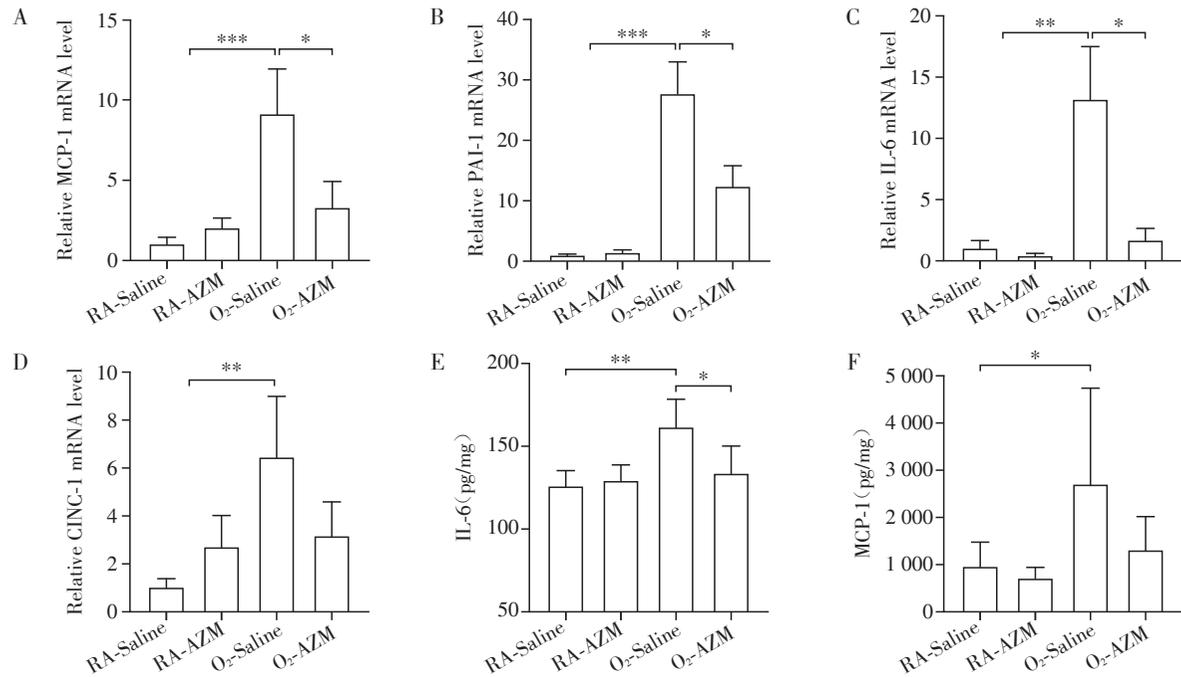
分别用CD68和MPO标记巨噬细胞和中性粒细胞,如图4所示,RA-Saline及RA-AZM组肺组织无明显炎症细胞聚集,而O<sub>2</sub>-Saline组表现出明显炎症细胞聚集现象,表现为O<sub>2</sub>-Saline组巨噬细胞计数明显增加( $P < 0.001$ ),中性粒细胞计数明显增加( $P < 0.001$ );而AZM干预后炎症细胞聚集现象明显受到抑制,表现为O<sub>2</sub>-AZM组巨噬细胞数量明显减少( $P < 0.01$ ),中性粒细胞计数也显著减少( $P < 0.001$ ,图4)。

### 2.4 AZM对高氧暴露新生大鼠肺发育的影响

如图5所示,RA-Saline组及RA-AZM组新生大鼠肺组织肺泡大小均匀,形态规则,肺泡间隔无明显增厚,而O<sub>2</sub>-Saline组新生大鼠肺组织结构排列紊乱,肺泡腔明显增大,肺泡间隔增厚,肺血管减少,O<sub>2</sub>-Saline对比RA-Saline组MLI明显增大( $P < 0.001$ ),次级肺泡隔( $\alpha$ -SMA染色)数量明显减少( $P < 0.001$ ),提示BPD模型成功,而O<sub>2</sub>-AZM组对比O<sub>2</sub>-Saline组肺泡腔有所减小,MLI明显减小( $P < 0.05$ ),次级肺泡隔数量明显增多( $P < 0.05$ )。

### 2.5 AZM对高氧暴露新生大鼠肺血管发育的影响

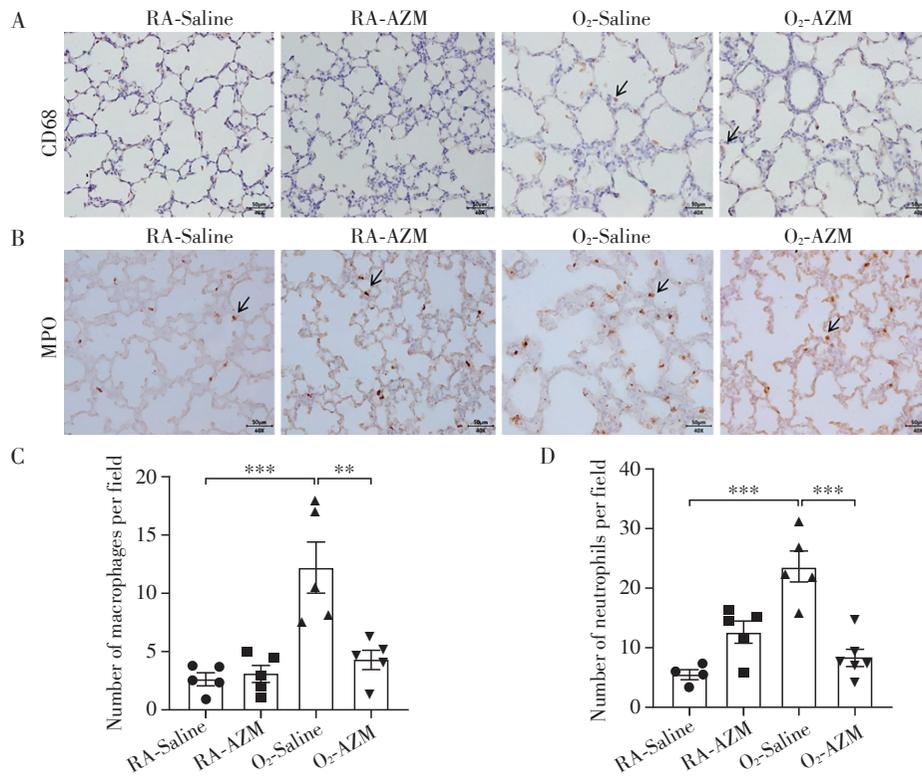
O<sub>2</sub>-Saline组对比RA-Saline组肺血管密度明显下降( $P < 0.001$ ),O<sub>2</sub>-AZM组肺血管密度明显增加



A-D: The relative mRNA levels of MCP-1 (A), PAI-1 (B), IL-6 (C), and CINC-1 (D) in lung tissues in each group ( $n=6$ ). E, F: The expression of IL-6 (E) and MCP-1 (F) in lung tissues ( $n=5\sim6$ ). \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  and \*\*\* $P < 0.001$ .

图3 AZM对高氧暴露新生大鼠肺损伤炎症因子/炎症趋化因子的作用

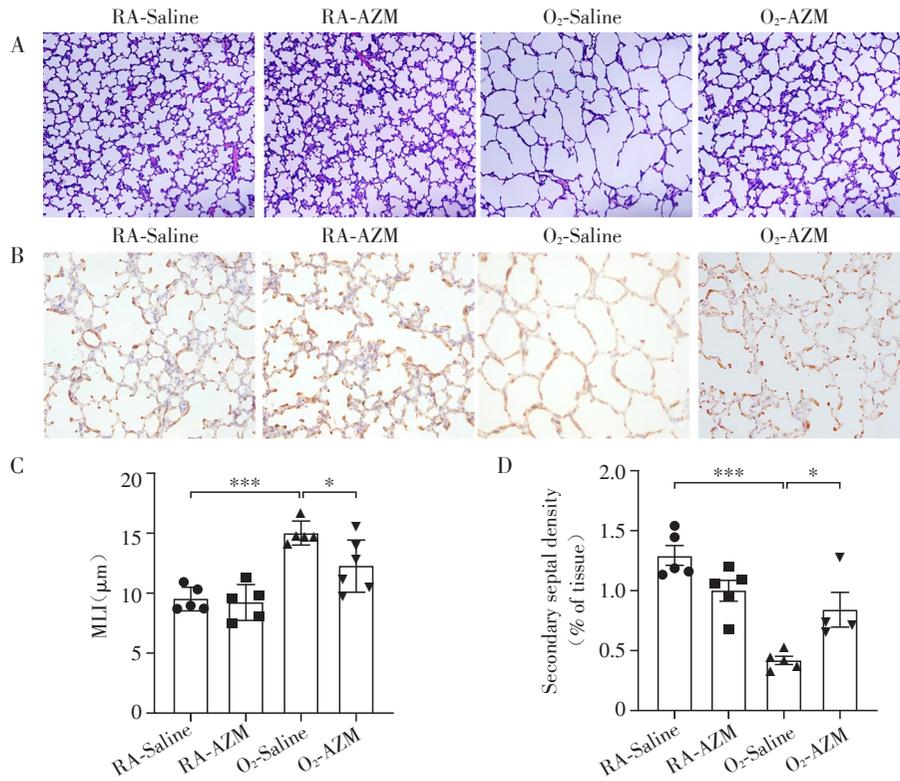
Figure 3 Effect of AZM on inflammatory factors/inflammatory chemokines in lung injury of neonatal rats induced by hyperoxia



A: Representative images of lung sections stained for the macrophage marker CD68 ( $\times 400$ ). B: Representative images of lung sections stained for the neutrophils marker MPO ( $\times 400$ ). C: Statistical analysis of macrophage count ( $n=5$ ). D: Statistical analysis of neutrophil count, RA-Saline group ( $n=4$ ), RA-AZM group ( $n=5$ ), O<sub>2</sub>-Saline group ( $n=5$ ), O<sub>2</sub>-AZM group ( $n=6$ ). \*\* $P < 0.01$  and \*\*\* $P < 0.001$ .

图4 AZM对高氧暴露新生大鼠肺组织炎症细胞的影响

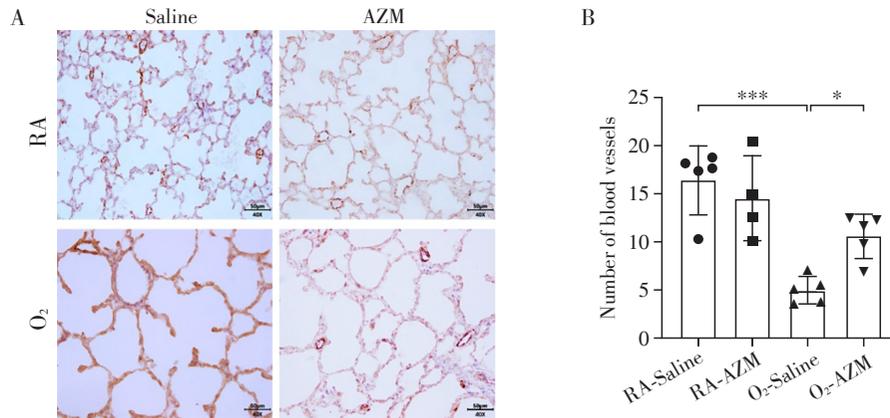
Figure 4 Effect of AZM on inflammatory cells in lung tissue of neonatal rats exposed to hyperoxia



A: Representative images of HE staining ( $\times 200$ ). B: Representative image of  $\alpha$ -SMA stained lungs ( $\times 400$ ). C: Statistical analysis of MLI. RA-Saline group ( $n=5$ ), RA-AZM group ( $n=5$ ),  $O_2$ -Saline group ( $n=5$ ),  $O_2$ -AZM group ( $n=6$ ). D: Statistical analysis of secondary alveolar septal density, RA-Saline group ( $n=5$ ), RA-AZM group ( $n=5$ ),  $O_2$ -Saline group ( $n=5$ ),  $O_2$ -AZM group ( $n=4$ ). \* $P < 0.05$  and \*\*\* $P < 0.001$ .

图5 AZM对高氧暴露新生大鼠肺发育的影响

Figure 5 Effect of AZM on lung development in neonatal rats exposed to hyperoxia



A: Representative images of lung vessels stained with vWF ( $\times 400$ ). B: Statistical analysis of pulmonary vascular density. RA-Saline group ( $n=5$ ), RA-AZM group ( $n=4$ ),  $O_2$ -Saline group ( $n=5$ ),  $O_2$ -AZM group ( $n=5$ ), \* $P < 0.05$  and \*\*\* $P < 0.001$ .

图6 AZM对高氧暴露新生大鼠肺血管发育的影响

Figure 6 Effect of AZM on pulmonary vascular development in neonatal rats exposed to hyperoxia

( $P < 0.05$ ), RA-AZM组对比RA-Saline组肺血管密度差异无统计学意义( $P > 0.05$ ,图6)。

### 3 讨论

本研究采用高氧暴露成功制造BPD大鼠模型，

并且氧气暴露组使用AZM干预后显示出明显的抗炎作用，表现为炎症因子的下调及炎症细胞向肺组织聚集减少，同时也证实了AZM可减轻新生大鼠BPD样肺损伤。

本研究用新生大鼠暴露于高氧中建立BPD的

模型, 该模型稳定, 可重复性强。高氧是 BPD 发生机制中的一个重要因素, BPD 的特征是不成熟肺的肺泡化和肺血管化减少<sup>[16]</sup>。新生大鼠是研究 BPD 的良好动物模型, 啮齿类动物出生时肺处于发育的囊状期, 可模拟早产婴儿的肺发育阶段, 暴露于高氧后发生慢性肺部炎症, 随后发生持续性肺泡结构简单化、肺纤维化等<sup>[17-18]</sup>。有研究发现, 高氧暴露的新生大鼠, CINC-1、MCP-1、IL-6、组织因子、PAI-1、分泌性白细胞蛋白酶抑制剂、基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMP)-12、p21、金属硫蛋白和血红素加氧酶等均有所上调<sup>[6, 19]</sup>。本研究中, 高氧暴露组 IL-6、CINC-1、MCP-1、PAI-1 的表达均有明显上调。中性粒细胞和单核巨噬细胞被认为在慢性肺疾病的炎症过程中起重要作用<sup>[5, 20-21]</sup>。本研究也观察到高氧暴露后肺组织中性粒细胞及巨噬细胞迁移/募集增多, 与既往研究一致<sup>[6]</sup>。

AZM 不仅具有抗感染作用, 还具有抗炎/免疫调节作用, 其作用机制已有研究报道。研究发现 AZM 可通过抑制 NF- $\kappa$ B 的活性<sup>[22]</sup>, 降低许多炎症细胞因子水平, 包括 IL-6、IL-8、肿瘤坏死因子和粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子, 以及 MMP<sup>[11, 23-24]</sup> 来发挥抗炎作用。它还可以直接或间接影响中性粒细胞而发挥抗炎作用, 如减少中性粒细胞聚集, 抑制中性粒细胞氧化爆发, 减轻炎症因子的释放等<sup>[12, 25]</sup>。AZM 还可以通过影响巨噬细胞的极化状态、增加巨噬细胞的吞噬作用来发挥抗炎作用<sup>[23, 26]</sup>。在本研究中也观察到高氧暴露组予 AZM 处理后炎症因子/炎症趋化因子下降及炎症细胞的聚集减少。

AZM 的抗感染、抗炎及免疫调节特性使它有别于其他的抗生素而在临床上广泛应用, 包括慢性阻塞性肺病、囊性纤维化、支气管扩张、闭塞性细支气管炎、弥漫性泛细支气管炎和哮喘等<sup>[27-28]</sup>。并且, 有研究发现 AZM 对新冠肺炎可能也有治疗效果<sup>[29]</sup>。因此, 推测 AZM 可能对 BPD 这种慢性疾病也有效。研究表明, 5 d 疗程的 AZM 治疗可降低炎症因子的水平, 并减少机械通气早产儿的死亡率及 28 d/死亡时氧气依赖<sup>[30]</sup>。然而, 关于 AZM 对 BPD 的有效性研究仍存在争议<sup>[8, 13, 31]</sup>, 并且, 两项动物实验也存在不一致的结果<sup>[32-33]</sup>。本研究在前人研究的基础上进一步从炎症因子、炎症细胞、肺组织及肺血管发育的角度对 AZM 对高氧暴露肺损伤的保护作用进行了深入研究。并且, 本研究在前期也做了 AZM 药物剂量摸索以确定 AZM 的最佳药物剂量。本研究的局限性在于没有深入研究 AZM 的抗炎作用机制, 后期

需要进一步研究。且本研究只是证实了 AZM 可改善高氧暴露新生大鼠 BPD 样肺损伤, 但是应用于临床还需要进一步探讨剂量、疗程及安全性等问题, 并进行临床试验来进一步明确。

总之, 本研究表明 AZM 对高氧暴露新生大鼠具有抗炎作用, 且能减轻新生大鼠 BPD 样肺损伤。但 AZM 在临床上对 BPD 的有效性及安全性还有待进一步明确, 需要大型的随机对照试验来进一步证实。

#### [参考文献]

- [1] CAO Y, JIANG S Y, SUN J H, et al. Assessment of neonatal intensive care unit practices, morbidity, and mortality among very preterm infants in China [J]. *JAMA Netw Open*, 2021, 4(8): e2118904
- [2] HWANG J S, REHAN V K. Recent advances in bronchopulmonary dysplasia: pathophysiology, prevention, and treatment[J]. *Lung*, 2018, 196(2): 129-138
- [3] SHUKLA V V, AMBALAVANAN N. Recent advances in bronchopulmonary dysplasia[J]. *Indian J Pediatr*, 2021, 88(7): 690-695
- [4] GILFILLAN M, BHANDARI A, BHANDARI V. Diagnosis and management of bronchopulmonary dysplasia[J]. *BMJ*, 2021, 375: n1974
- [5] HOLZFURTNER L, SHAHZAD T, DONG Y, et al. When inflammation meets lung development - an update on the pathogenesis of bronchopulmonary dysplasia[J]. *Mol Cell Pediatr*, 2022, 9(1): 7
- [6] O'REILLY M, THÉBAUD B. Animal models of bronchopulmonary dysplasia. The term rat models [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2014, 307(12): L948-L958
- [7] THÉBAUD B, GOSS K, LAUGHON M, et al. Bronchopulmonary dysplasia[J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2019, 5: 1-23
- [8] JENSEN E A. Prevention of bronchopulmonary dysplasia: a summary of evidence-based strategies [J]. *Neoreviews*, 2019, 20(4): e189-e201
- [9] DOYLE L W, CHEONG J L, EHRENKRANZ R A, et al. Early (< 8 days) systemic postnatal corticosteroids for prevention of bronchopulmonary dysplasia in preterm infants [J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2017, 10(10): CD001146
- [10] VISCARDI R M, TERRIN M L, MAGDER L S, et al. Randomised trial of azithromycin to eradicate ureaplasma in preterm infants [J]. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*, 2020, 105(6): 615-622
- [11] XING Y W, LIU K Z. Azithromycin inhibited oxidative stress and apoptosis of high glucose-induced podocytes by inhibiting STAT1 pathway [J]. *Drug Dev Res*, 2021, 82

- (7):990-998
- [12] HEIDARY M, EBRAHIMI SAMANGANI A, KARGARI A, et al. Mechanism of action, resistance, synergism, and clinical implications of azithromycin[J]. *J Clin Lab Anal*, 2022, 36(6):e24427
- [13] RAZAK A, ALSHEHRI N. Azithromycin for preventing bronchopulmonary dysplasia in preterm infants: a systematic review and meta - analysis [J]. *Pediatr Pulmonol*, 2021, 56(5):957-966
- [14] CHEN X Y, HAN D S, WANG X, et al. Vascular and pulmonary effects of ibuprofen on neonatal lung development[J]. *Respir Res*, 2023, 24(1):39
- [15] HUANG Z L, LIN B C, HAN D S, et al. Platelets are indispensable for alveolar development in neonatal mice [J]. *Front Pediatr*, 2022, 10:943054
- [16] SAHNI M, BHANDARI V. Patho-mechanisms of the origins of bronchopulmonary dysplasia[J]. *Mol Cell Pediatr*, 2021, 8(1):21
- [17] GIUSTO K, WANCZYK H, JENSEN T, et al. Hyperoxia-induced bronchopulmonary dysplasia: better models for better therapies [J]. *Dis Model Mech*, 2021, 14 (2) : dmm047753
- [18] SHAHZAD T, CHAO C M, HADZIC S, et al. TRAIL protects the immature lung from hyperoxic injury [J]. *Cell Death Dis*, 2022, 13(7):614
- [19] WAGENAAR G T, TER HORST S A, VAN GASTELEN M A, et al. Gene expression profile and histopathology of experimental bronchopulmonary dysplasia induced by prolonged oxidative stress [J]. *Free Radic Biol Med*, 2004, 36(6):782-801
- [20] HIRANI D, ALVIRA C M, DANOPOULOS S, et al. Macrophage-derived IL-6 trans-signalling as a novel target in the pathogenesis of bronchopulmonary dysplasia[J]. *Eur Respir J*, 2022, 59(2):2002248
- [21] KALYMBETOVA T V, SELVAKUMAR B, RODRÍGUEZ-CASTILLO J A, et al. Resident alveolar macrophages are master regulators of arrested alveolarization in experimental bronchopulmonary dysplasia [J]. *J Pathol*, 2018, 245 (2): 153-159
- [22] HAYDAR D, CORY T J, BIRKET S E, et al. Azithromycin polarizes macrophages to an M2 phenotype via inhibition of the STAT1 and NF- $\kappa$ B signaling pathways [J]. *J Immunol*, 2019, 203(4):1021-1030
- [23] OLIVER M E, HINKS T S C. Azithromycin in viral infections[J]. *Rev Med Virol*, 2021, 31(2):e2163
- [24] BARKS J D E, LIU Y Q, DOPP I A, et al. Azithromycin reduces inflammation - amplified hypoxic - ischemic brain injury in neonatal rats [J]. *Pediatr Res*, 2022, 92 (2) : 415-423
- [25] HAFNER M, PAUKNER S, WICHA W W, et al. Anti-inflammatory activity of lefamulin versus azithromycin and dexamethasone *in vivo* and *in vitro* in a lipopolysaccharide-induced lung neutrophilia mouse model[J]. *PLoS One*, 2021, 16(9):e0237659
- [26] TARIQUE A A, TULADHAR N, KELK D, et al. Azithromycin augments bacterial uptake and anti-inflammatory macrophage polarization in cystic fibrosis [J]. *Cells*, 2024, 13(2):166
- [27] CRAMER C L, PATTERSON A, ALCHAKAKI A, et al. Immunomodulatory indications of azithromycin in respiratory disease: a concise review for the clinician[J]. *Postgrad Med*, 2017, 129(5):493-499
- [28] PŁUSA T. Azithromycin in the treatment of patients with exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease[J]. *Pol Merkur Lekarski*, 2020, 48(283):65-68
- [29] ECHEVERRÍA - ESNAL D, MARTIN - ONTIYUELO C, NAVARRETE - ROUCO M E, et al. Azithromycin in the treatment of COVID-19: a review [J]. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 2021, 19(2):147-163
- [30] NUNES C R, PROCIANOY R S, CORSO A L, et al. Use of azithromycin for the prevention of lung injury in mechanically ventilated preterm neonates: arandomized controlled trial[J]. *Neonatology*, 2020, 117(4):522-528
- [31] CHANG E, BALLARD K E, JOHNSON P N, et al. Azithromycin for eradication of Ureaplasma and prevention of bronchopulmonary dysplasia in preterm neonates in the neonatal intensive care unit[J]. *J Pediatr Pharmacol Ther*, 2023, 28(1):10-19
- [32] BALLARD H O, BERNARD P, QUALLS J, et al. Azithromycin protects against hyperoxic lung injury in neonatal rats[J]. *J Investig Med*, 2007, 55(6):299-305
- [33] LONDHE V A, SUNDAR I K, LOPEZ B, et al. Hyperoxia impairs alveolar formation and induces senescence through decreased histone deacetylase activity and up-regulation of p21 in neonatal mouse lung[J]. *Pediatr Res*, 2011, 69(5 Pt 1):371-377

[收稿日期] 2024-01-26

(本文编辑:戴王娟)