

# 马蔺子素对大鼠放射性肺损伤的防护作用

王寒蕾, 毛艳, 梁洁, 王勇, 李觅, 刘文其\*

(广西医科大学第一附属医院, 南宁 530021)

**[摘要]** **目的:**探讨马蔺子素对 SD 大鼠放射性肺损伤的防护作用。**方法:**将 210 只 SD 大鼠随机分为 0.9% 氯化钠溶液组(正常组),马蔺子素组(单药组),单纯照射组(模型组),激素组,马蔺子素大、中、小剂量(60,30,15 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>)组,每组 30 只。采用<sup>60</sup>Co  $\gamma$  单次 20 Gy 右全肺照射,建立大鼠放射性肺损伤模型。照射后第 1,4,8,12,24 周取大鼠肺组织苏木素伊红(HE)染色,马松三色(Masson)染色进行组织病理学观察;紫外分光光度计检测肺组织中羟脯氨酸含量;酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测血清肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ),白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )和转化生长因子- $\beta_1$ (TGF- $\beta_1$ )浓度;免疫组化法检测肺组织中 TNF- $\alpha$ ,TGF- $\beta_1$  的表达。**结果:**与模型组比较,大、中剂量马蔺子素照射组可显著降低放射性肺损伤的程度,且有降低羟脯氨酸含量和抑制 TNF- $\alpha$ ,IL-1 $\beta$ ,TGF- $\beta_1$  表达的作用( $P < 0.05$ )。单药组各项指标与正常组相当。**结论:**中、大剂量马蔺子素对放射性肺损伤有较好的防护作用,且对大鼠肺组织几乎无毒性。

**[关键词]** 放射性肺损伤; 马蔺子素; 羟脯氨酸; 肿瘤坏死因子- $\alpha$ ; 白细胞介素-1 $\beta$ ; 转化生长因子  $\beta_1$

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)05-0151-09

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2016050151

## Irisquinone Protects Against Radiation-induced Lung Injury in Rats

WANG Han-lei, MAO Yan, LIANG Jie, WANG Yong, LI Mi, LIU Wen-qi\*

(The First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the protective effect of irisquinone for radiation-induced lung injury (RILI) in SD rats. **Method:** Two hundred and ten SD rats were randomly divided into 0.9% sodium chloride solution group (normal group), irisquinone group (single drug group), radiation group (model group), hormone group, high-dose (60 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>), medium-dose (30 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>), and low-dose (15 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>) irisquinone + radiation group,  $n = 30$  in each group. The models of RILI in SD rats were established by irradiating right whole chest with a single dose of 20 Gy using <sup>60</sup>Co  $\gamma$  therapeutic machine. Rats were sacrificed from the seven groups at week 1, 4, 8, 12 and 24 post-irradiation, and the pathological changes of the lung were observed by hematoxylin-eosin (HE) staining and Masson staining; content of hydroxyproline in lung tissues was detected by UV spectrophotometer, tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) and transforming growth factor  $\beta_1$  (TGF- $\beta_1$ ) in serum were detected by enzyme-linked immunosorbent assay, expression of TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta_1$  in lung tissues were detected by immunohistochemical method. **Result:** High-dose and medium-dose irisquinone + radiation group could significantly ameliorate radiation-induced lung injury, effectively reduce the content of hydroxyproline and inhibit the expression of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and TGF- $\beta_1$ , with statistically significant difference compared with model group ( $P < 0.05$ ). There was no significant difference between the low-dose irisquinone + radiation group and the model group. There was no statistically significant difference between the single drug group and the normal group. **Conclusion:** The high-dose and medium-dose irisquinone has protective effect on the

**[收稿日期]** 20150816(002)

**[基金项目]** 广西科技攻关课题(桂科攻 1140003A-24)

**[第一作者]** 王寒蕾,在读硕士,从事肿瘤放射治疗研究,Tel:18275738256,E-mail:402423611@qq.com

**[通讯作者]** \*刘文其,博士,主任医师,从事肿瘤放射治疗研究,Tel:13507681161,E-mail:liuwenqi999@yahoo.com.cn

radiation-induced lung injury and is nearly non-toxic for the lung tissues of rats.

[Key words] radiation-induced lung injury; irisquinone; tumor necrosis factor  $\alpha$ ; interleukin- $1\beta$ ; transforming growth factor  $\beta_1$

肺在胸部肿瘤放疗过程中不可避免地受到照射,导致放射性肺损伤的发生,近年来关于放射性肺损伤的机制及防护研究越来越多,但对放射性肺损伤如何进行有效的防护仍是放射治疗研究的难点之一。中医中药有着资源丰富,成本低廉,不良反应少等优势,在临床领域有着重要的研发价值。马蔺子素是从鸢尾科植物马蔺的种皮中提取的一种醌类化合物,成分为马蔺子甲素和乙素<sup>[1]</sup>。国内研究发现其对肿瘤的原发灶放疗具有增敏效果,加速肿瘤体积的减小,加快病灶的全消率<sup>[2]</sup>,马蔺子素除了放射增敏作用外,目前尚无其对放射性肺损伤防护研究的报道。本研究采用<sup>60</sup>Co  $\gamma$  治疗机单次右肺照射 20 Gy,建立大鼠放射性肺损伤模型,观察马蔺子素对大鼠放射性肺损伤的防护作用,初步探讨其作用机制,为进一步临床治疗提供理论依据。

## 1 材料

**1.1 动物及药物** 健康成年 SPF 级 Sprague Dawley (SD) 大鼠 210 只,体重(200  $\pm$  20) g,购买于广西医科大学实验动物中心,合格证号 SCXK(桂)2009-0002,该中心给予标准能量喂养,室温(25  $\pm$  1)  $^{\circ}$ C,湿度(55  $\pm$  5)%,在此条件下饲养 3 d 后无异常者入组实验。

**1.2 试剂及仪器** 大鼠肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ),白介素- $1\beta$  (IL- $1\beta$ ),转化生长因子  $\beta_1$  (TGF- $\beta_1$ ) 酶联免疫(ELISA)分析试剂盒均购于武汉博士得生物工程有限公司,编号分别为 EK0526, EK0393, EK0514; 羟脯氨酸试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号 A030-2)。TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta_1$  兔多克隆抗体(武汉博士得生物工程有限公司,批号分别为 BA0131, BA0290); 通用型 SP 检测试剂盒、二氨基联苯胺(DAB)显色试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号 WP142407, K146613),马蔺子素胶囊(山东新华制药股份有限公司,国药准字 H19980009),醋酸泼尼松片(浙江仙琚制药股份有限公司,国药准字 H33021207, 5 mg/片)。TH SIMVIW NT 型常规模拟定位机(德国西门子公司), GWXJ80 型<sup>60</sup>Co  $\gamma$  射线放射治疗仪(中国核动力研究设计院设备制造厂), LAMBDA BIO20 型双光速紫外分光光度计(美国 PE 公司), 5810R 型高速低温离心机(德国 Eppendorf 公司), Multiskan MK3 型酶标仪(美国

Thermo Electron Corporation 公司)。

## 2 方法

**2.1 分组及模型建立** 将 210 只 SD 雌雄各半大鼠完全随机分为 0.9% 氯化钠溶液组(正常组), 马蔺子素组(单药组), 单纯照射组(模型组), 醋酸泼尼松组(激素组), 马蔺子素大、中、小剂量(60, 30, 15 mg  $\cdot$  kg<sup>-1</sup>  $\cdot$  d<sup>-1</sup>)组, 每组 30 只。模型组, 激素组及大、中、小剂量马蔺子素照射组用<sup>60</sup>Co  $\gamma$  治疗机单次 20 Gy 右全肺照射放射性肺损伤造模, 用 10% 水合氯醛按 400 mg  $\cdot$  kg<sup>-1</sup> 予大鼠腹腔麻醉后, CT 模拟机定位扫描右肺的位置, 用铅块遮挡照射野外部, 射野采用单后野垂直照射, 单次照射总剂量为 20 Gy, 照射野为 2 cm<sup>2</sup>, 源皮距为 80 cm, 吸收剂量率为 3 Gy  $\cdot$  min<sup>-1</sup>。

**2.2 给药依据** 马蔺子素成人临床用量换算大鼠给药剂量, 马蔺子素大、中、小剂量(60, 30, 15 mg  $\cdot$  kg<sup>-1</sup>  $\cdot$  d<sup>-1</sup>) 分别为 20, 10, 5 倍成人有效剂量。单药组(30 mg  $\cdot$  kg<sup>-1</sup>  $\cdot$  d<sup>-1</sup>), 大、中、小剂量马蔺子素组以相应浓度马蔺子素 *ig*。激素组 *ig* 给予泼尼松溶液(醋酸泼尼松片用生理盐水溶解), 激素组 1 ~ 2 周 *ig* 给予 1.25 mg  $\cdot$  kg<sup>-1</sup>  $\cdot$  d<sup>-1</sup> 泼尼松溶液, 3 ~ 4 周 *ig* 给予 0.062 5 mg  $\cdot$  kg<sup>-1</sup>  $\cdot$  d<sup>-1</sup> 泼尼松溶液, 4 周以后 *ig* 等体积生理盐水。正常组和模型组 *ig* 等体积的生理盐水。大鼠照射前 1 周 *ig* 至肺组织取出。

**2.3 标本收集及处理** 在照射后 1, 4, 8, 12, 24 周共 5 个时点, 每个时间点 6 只大鼠采用 10% 水合氯醛(400 mg  $\cdot$  kg<sup>-1</sup>) 麻醉, 取 5 mL 心脏血静置 30 min, 4  $^{\circ}$ C, 3 000 r  $\cdot$  min<sup>-1</sup> 离心 20 min, 取上清液于 -80  $^{\circ}$ C 冻存, 用于检测细胞因子。取右肺中叶置于 10% 甲醛溶液固定 48 h, 常规石蜡包埋, 切片(4  $\mu$ m) 备用, 经苏木素-伊红(HE), 马松三色(Masson)染色, 免疫组化染色后观察病理改变。

**2.4 HE 染色** 石蜡切片二甲苯中脱蜡, 无水乙醇脱水, 水洗后苏木素染色, 盐酸酒精分化后返蓝, 伊红染色, 乙醇脱水, 二甲苯透明, 中性树脂胶封片。细胞核呈蓝(紫蓝)色, 细胞浆, 肌纤维, 胶原纤维呈不同程度的红色。

**2.5 Masson 染色** 石蜡切片常规二甲苯脱蜡, 无水乙醇脱水, 苏木素染核, 水洗后, 盐酸酒精分化, 丽春红酸性品红溶液染色, 冰乙酸浸洗后, 磷酸酸水溶

液分化,亮绿液复染,冰乙酸浸洗,中性树胶封片。胶原纤维,黏液,软骨呈绿色,胞浆,肌纤维素及红细胞呈红色,胞核呈蓝褐色。

**2.6 ELISA 测定相关蛋白** 血清测定前置 4 ℃ 恒温复融 1 h,4 ℃ 3 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 20 min,取上清加到相应的孔中,37 ℃ 温育 90 min,加生物素标记抗体(TNF- $\alpha$ ,IL-1 $\beta$ ,TGF- $\beta_1$  抗体浓度均为 1:100),37 ℃ 温育 60 min;每孔添加工作液,再依次每孔添加四甲基联苯胺(TMB)显色液,避光反应,添加 TMB 终止液,反应终止 5 min,在酶标仪 450 nm 测定吸光度 A。以对照品的浓度为横坐标,A 为纵坐标,在 CurveExpert 软件算出相应浓度。

**2.7 羟脯氨酸测定** 利用样本碱水解法检测大鼠肺组织中总羟脯氨酸含量。精确称取肺组织 30 ~ 100 mg 于试管中,加入 1 mL 水解液,加盖后 95 ℃ 或沸水浴 20 min,然后调 pH 6.0 ~ 6.8,水解产物稀释后加适量活性炭混匀,3 500 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min,取上清液于 550 nm 处经双光束紫外分光光度计测各管 A。

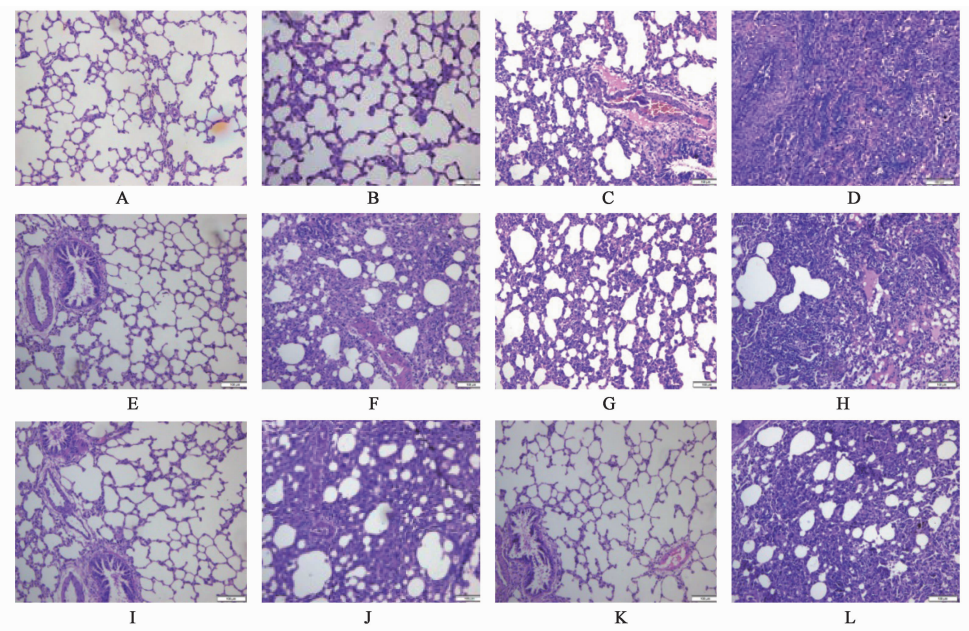
**2.8 免疫组化测定蛋白** 用 SP 三步法染色法检测 TNF- $\alpha$ ,TGF- $\beta_1$  蛋白的表达。石蜡切片常规二甲苯,无水乙醇中脱蜡脱水后高压修复,依次加过氧化氢,山羊血清孵育 10 min,后滴加一抗(TNF- $\alpha$ ,TGF- $\beta_1$

抗体浓度分别为 1:100,1:400)4 ℃ 过夜,二抗孵育 15 min 后滴加辣根酶标记链霉卵白素,水洗后 DAB 显色,复染,脱水透明后封片。病理染色胞质,胞核呈棕色为阳性表达,染色越深,A 越大,吸光度越低,吸光度是 A 的倒数;透光率分为 256 级,最黑为 0 级,最亮为 256 级,阳性细胞吸光度越低,说明其免疫组化染色越深,即蛋白表达越高,若以 A 代表,则 A 越大。每张切片取 5 个视野,用 Image-ProPlus6.0 图像分析系统测定阳性细胞表达的吸光度。

**2.9 统计学分析** 采用 SPSS 17.0 统计软件进行统计学处理,计量资料多组间比较用单因素方差分析与 LSD-t 检验,计量资料采用  $\bar{x} \pm s$  表示, $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 各组大鼠肺组织病理学变化** 正常组和单药组肺组织结构正常。模型组和小剂量组 1 周时有大量炎性细胞灶,肺水肿,肺泡间隔增宽;照射后 24 周时肺泡壁重度增厚,肺泡腔缺失,大量的成纤维细胞增生,形成纤维化病灶。激素组及中、大剂量马蔺子素组在早期有较少的炎性细胞,肺泡间隔略增厚,结构基本正常,病理较同时期模型组轻;照射后 24 周时肺泡壁间隔中度增厚,肺泡腔大部分尚存,部分成纤维细胞增生,均轻于模型组。见图 1。



A. 正常组;B. 单药组;C ~ D. 模型组 1,24 周;E ~ F. 激素组 1,24 周;G ~ H. 马蔺子素小剂量组 1,24 周;I ~ J. 马蔺子素中剂量组 1,24 周;K ~ L. 马蔺子素高剂量组 1,24 周(图 2 ~ 4 同)

图 1 各组大鼠肺组织不同时间点的病理改变(HE,  $\times 100$ )

Fig.1 Pathology changes of lung tissues of each group in different time points (HE,  $\times 100$ )

**3.2 肺组织胶原纤维病理学变化** 正常组和单药组肺组织结构正常,肺泡完整。与正常组比较,模型组和马蔺子素小剂量照射组 1 周肺泡间隔增宽,并出现少量胶原纤维沉积;24 周肺泡塌陷,肺泡腔消

失,出现大量纤维化灶。激素组,马蔺子素中、高剂量组早期肺泡间隔稍增宽,但程度较模型组轻;24 周少量成纤维细胞增生,但仍能看到肺泡,程度轻于模型组。见图 2。

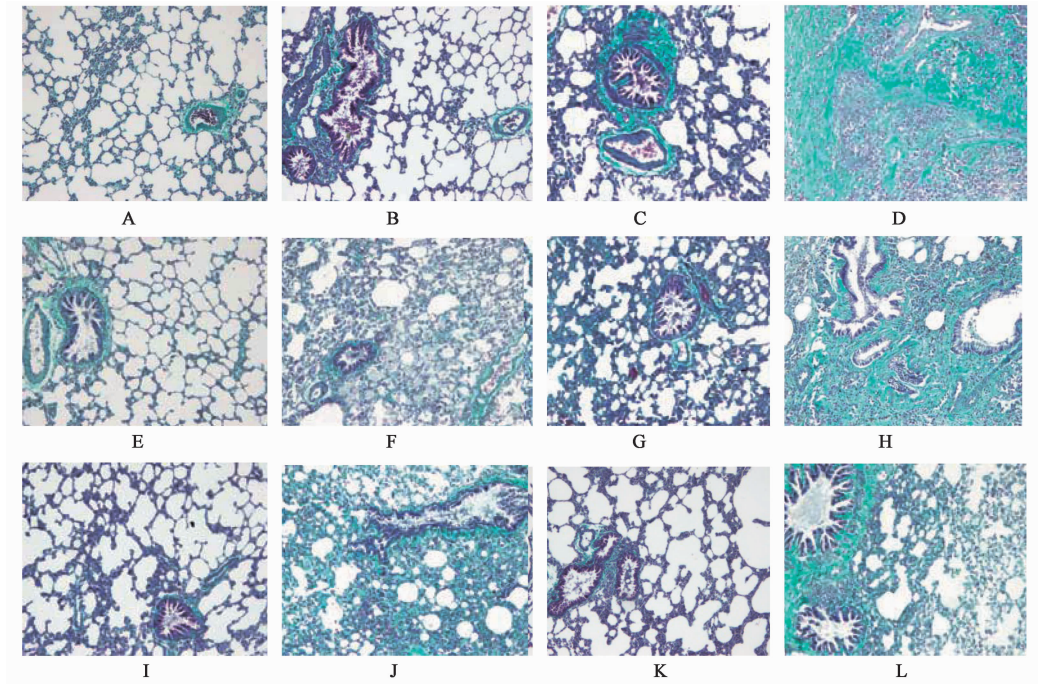


图 2 各组大鼠肺组织不同时间点的胶原纤维改变 (Masson, ×100)

Fig. 2 Collogen fibrils changes of lung tissues of each group in different time points (Masson, ×100)

**3.3 血清细胞因子 TNF- $\alpha$  变化** 与正常组、单药组比较,马蔺子素各剂量组 TNF- $\alpha$  值在各个时间点明显升高 ( $P < 0.05$ ),第 4 周达到峰值,继而下降,

24 周趋于稳定。与模型组,马蔺子素小剂量组比较,激素组,马蔺子素中、高剂量组 TNF- $\alpha$  明显降低 ( $P < 0.05$ )。见表 1。

表 1 同一时间点不同组别大鼠的血清 TNF- $\alpha$  含量比较 ( $\bar{x} \pm s, n = 30$ )

Table 1 Concentration of TNF- $\alpha$  in serum at the same time point in different groups ( $\bar{x} \pm s, n = 30$ )

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	1 周	4 周	8 周	12 周	24 周
正常	-	46.786 $\pm$ 2.635	45.370 $\pm$ 3.391	47.650 $\pm$ 3.674	48.370 $\pm$ 3.604	47.506 $\pm$ 3.055
单药	30	45.523 $\pm$ 2.339	46.082 $\pm$ 3.098	46.968 $\pm$ 2.700	47.683 $\pm$ 3.359	48.097 $\pm$ 2.590
模型	-	83.004 $\pm$ 4.163 <sup>1)</sup>	87.821 $\pm$ 2.748 <sup>1)</sup>	86.812 $\pm$ 2.943 <sup>1)</sup>	58.373 $\pm$ 3.687 <sup>1)</sup>	55.499 $\pm$ 4.195 <sup>1)</sup>
激素	1.25 ~ 0.062 5	72.856 $\pm$ 2.748 <sup>1,2,3)</sup>	74.054 $\pm$ 2.449 <sup>1,2,3)</sup>	72.697 $\pm$ 3.366 <sup>1,2,3)</sup>	52.203 $\pm$ 2.748 <sup>1,2,3)</sup>	51.287 $\pm$ 3.465 <sup>1,2,3)</sup>
马蔺子素	15	83.102 $\pm$ 3.197 <sup>1)</sup>	87.174 $\pm$ 3.483 <sup>1)</sup>	86.688 $\pm$ 2.658 <sup>1)</sup>	58.698 $\pm$ 3.741 <sup>1)</sup>	55.067 $\pm$ 3.464 <sup>1)</sup>
	30	75.400 $\pm$ 2.592 <sup>1,2,3)</sup>	76.032 $\pm$ 2.054 <sup>1,2,3)</sup>	74.568 $\pm$ 2.748 <sup>1,2,3)</sup>	54.100 $\pm$ 3.559 <sup>1,2,3)</sup>	51.658 $\pm$ 3.590 <sup>1,2,3)</sup>
	60	73.967 $\pm$ 2.558 <sup>1,2,3)</sup>	75.121 $\pm$ 2.658 <sup>1,2,3)</sup>	73.736 $\pm$ 2.740 <sup>1,2,3)</sup>	53.611 $\pm$ 4.164 <sup>1,2,3)</sup>	51.594 $\pm$ 3.299 <sup>1,2,3)</sup>

注:与正常组比较<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ;与模型组比较<sup>2)</sup> $P < 0.05$ ;与马蔺子素小剂量组比较<sup>3)</sup> $P < 0.05$ (表 2 ~ 6 同)。

**3.4 血清细胞因子 IL-1 $\beta$  变化** 与正常组、单药组比较,马蔺子素各剂量组 IL-1 $\beta$  在各个时间点明显升高 ( $P < 0.05$ ),第 8 周达到峰值,继而下降,24 周趋于稳定的趋势。与模型组、马蔺子素小剂量组比

较,激素组、马蔺子素中、高剂量组 IL-1 $\beta$  明显降低 ( $P < 0.05$ )。见表 2。

**3.5 血清细胞因子 TGF- $\beta_1$  变化** 与正常组、单药组比较,马蔺子素各剂量组 TGF- $\beta_1$  在各个时间点明

显升高 ( $P < 0.05$ ), 第 12 周达到峰值, 继而下降, 24 周趋于稳定的趋势。与模型组、马蔺子素小剂量组

比较, 在 4, 8, 12, 24 周激素组, 马蔺子素中、高剂量组 TGF- $\beta_1$  明显降低 ( $P < 0.05$ )。见表 3。

表 2 同一时间点不同组别大鼠的血清 IL-1 $\beta$  含量比较 ( $\bar{x} \pm s, n = 30$ )

**Table 2 Concentration of IL-1 $\beta$  in serum at the same time point in different groups ( $\bar{x} \pm s, n = 30$ )** ng·L<sup>-1</sup>

组别	剂量/mg·kg <sup>-1</sup>	1 周	4 周	8 周	12 周	24 周
正常	-	73.460 ± 4.715	75.210 ± 3.651	76.612 ± 3.496	77.013 ± 3.496	77.454 ± 6.782
单药	30	73.697 ± 4.371	75.389 ± 3.881	76.898 ± 3.620	76.898 ± 3.651	77.214 ± 6.164
模型	-	92.628 ± 4.472 <sup>1)</sup>	164.241 ± 3.800 <sup>1)</sup>	172.760 ± 5.849 <sup>1)</sup>	146.990 ± 4.448 <sup>1)</sup>	123.830 ± 5.120 <sup>1)</sup>
激素	1.25 ~ 0.062 5	80.689 ± 5.206 <sup>1,2,3)</sup>	154.890 ± 4.315 <sup>1,2,3)</sup>	157.160 ± 5.228 <sup>1,2,3)</sup>	130.964 ± 5.163 <sup>1,2,3)</sup>	116.876 ± 6.582 <sup>1,2,3)</sup>
马蔺子素	15	92.578 ± 3.944 <sup>1)</sup>	164.210 ± 5.228 <sup>1)</sup>	169.370 ± 5.292 <sup>1)</sup>	142.610 ± 4.273 <sup>1)</sup>	124.743 ± 6.164 <sup>1)</sup>
	30	82.712 ± 3.651 <sup>1,2,3)</sup>	155.720 ± 4.472 <sup>1,2,3)</sup>	160.230 ± 5.537 <sup>1,2,3)</sup>	133.970 ± 5.099 <sup>1,2,3)</sup>	118.250 ± 6.236 <sup>1,2,3)</sup>
	60	81.691 ± 3.552 <sup>1,2,3)</sup>	154.679 ± 5.120 <sup>1,2,3)</sup>	159.370 ± 5.513 <sup>1,2,3)</sup>	131.850 ± 3.478 <sup>1,2,3)</sup>	117.269 ± 5.621 <sup>1,2,3)</sup>

表 3 同一时间点不同组别大鼠的血清 TGF- $\beta_1$  含量比较 ( $\bar{x} \pm s, n = 30$ )

**Table 3 Concentration of TGF- $\beta_1$  in serum at the same time point in different groups ( $\bar{x} \pm s, n = 30$ )** ng·L<sup>-1</sup>

组别	剂量/mg·kg <sup>-1</sup>	1 周	4 周	8 周	12 周	24 周
正常	-	12.569 ± 1.619	13.880 ± 1.563	14.610 ± 2.403	15.012 ± 1.884	15.422 ± 1.490
单药	30	12.880 ± 2.366	13.021 ± 1.763	14.820 ± 1.490	15.623 ± 1.707	15.829 ± 1.903
模型	-	17.140 ± 2.054 <sup>1)</sup>	18.400 ± 2.054 <sup>1)</sup>	26.640 ± 2.403 <sup>1)</sup>	27.605 ± 2.403 <sup>1)</sup>	24.605 ± 1.707 <sup>1)</sup>
激素	1.25 ~ 0.062 5	16.990 ± 1.563 <sup>1)</sup>	16.140 ± 2.403 <sup>1,2,3)</sup>	21.280 ± 1.955 <sup>1,2,3)</sup>	22.714 ± 1.749 <sup>1,2,3)</sup>	19.714 ± 1.749 <sup>1,2,3)</sup>
马蔺子素	15	17.220 ± 2.211 <sup>1)</sup>	18.142 ± 1.649 <sup>1)</sup>	25.590 ± 1.667 <sup>1)</sup>	26.172 ± 1.744 <sup>1)</sup>	23.484 ± 1.559 <sup>1)</sup>
	30	17.020 ± 1.760 <sup>1)</sup>	16.081 ± 2.424 <sup>1,2,3)</sup>	22.720 ± 1.749 <sup>1,2,3)</sup>	22.587 ± 1.736 <sup>1,2,3)</sup>	18.587 ± 1.246 <sup>1,2,3)</sup>
	60	16.890 ± 1.763 <sup>1)</sup>	16.150 ± 2.403 <sup>1,2,3)</sup>	22.680 ± 1.707 <sup>1,2,3)</sup>	22.703 ± 1.931 <sup>1,2,3)</sup>	18.703 ± 1.314 <sup>1,2,3)</sup>

3.6 羟脯氨酸含量 与正常组、单药组比较, 马蔺子素各剂量照射组羟脯氨酸含量在各个时间点明显升高 ( $P < 0.05$ ), 第 24 周达到峰值。与模型组、马

蔺子素小剂量照射组比较, 在 4, 8, 12, 24 周激素组, 马蔺子素中、高剂量照射组羟脯氨酸含量明显降低 ( $P < 0.05$ )。见表 4。

表 4 同一时间点不同组别大鼠的肺组织羟脯氨酸含量比较 ( $\bar{x} \pm s, n = 30$ )

**Table 4 Concentration of hydroxyproline in lung tissues at the same time point in different groups ( $\bar{x} \pm s, n = 30$ )** ng·L<sup>-1</sup>

组别	剂量/mg·kg <sup>-1</sup>	1 周	4 周	8 周	12 周	24 周
正常	-	0.900 ± 0.166	0.933 ± 0.187	0.948 ± 0.202	0.915 ± 0.138	1.013 ± 0.153
单药	30	0.912 ± 0.152	0.926 ± 0.198	0.920 ± 0.166	0.944 ± 0.178	1.016 ± 0.154
模型	-	1.177 ± 0.174 <sup>1)</sup>	1.482 ± 0.229 <sup>1)</sup>	1.581 ± 0.213 <sup>1)</sup>	1.821 ± 0.198 <sup>1)</sup>	2.137 ± 0.161 <sup>1)</sup>
激素	1.25 ~ 0.062 5	1.180 ± 0.179 <sup>1)</sup>	1.226 ± 0.198 <sup>1,2,3)</sup>	1.278 ± 0.191 <sup>1,2,3)</sup>	1.465 ± 0.221 <sup>1,2,3)</sup>	1.701 ± 0.149 <sup>1,2,3)</sup>
马蔺子素	15	1.137 ± 0.198 <sup>1)</sup>	1.493 ± 0.234 <sup>1)</sup>	1.531 ± 0.203 <sup>1)</sup>	1.786 ± 0.191 <sup>1)</sup>	2.162 ± 0.126 <sup>1)</sup>
	30	1.130 ± 0.192 <sup>1)</sup>	1.246 ± 0.230 <sup>1,2,3)</sup>	1.298 ± 0.205 <sup>1,2,3)</sup>	1.565 ± 0.213 <sup>1,2,3)</sup>	1.835 ± 0.170 <sup>1,2,3)</sup>
	60	1.159 ± 0.160 <sup>1)</sup>	1.266 ± 0.220 <sup>1,2,3)</sup>	1.284 ± 0.179 <sup>1,2,3)</sup>	1.497 ± 0.147 <sup>1,2,3)</sup>	1.804 ± 0.190 <sup>1,2,3)</sup>

3.7 肺组织 TNF- $\alpha$  的表达 与正常组、单药组比较, 马蔺子素各剂量组 TNF- $\alpha$  的表达量在各个时间点明显升高 ( $P < 0.05$ ), 第 24 周达到峰值。与模型组、马蔺子素小剂量组比较, 马蔺子素中、高剂量组 TNF- $\alpha$  的表达量明显升高 ( $P < 0.05$ )。见表 5, 图 3。

3.8 肺组织 TGF- $\beta_1$  的表达 与正常组、单药组比

较, 马蔺子素各剂量组 TGF- $\beta_1$  的表达量在各个时间点明显升高 ( $P < 0.05$ ), 主要在支气管周围、成纤维细胞、血管周围等中表达, 表达呈逐渐递减趋势, 第 24 周达到峰值。与模型组、马蔺子素小剂量组比较, 在 4, 8, 12, 24 周马蔺子素中、高剂量组 TNF- $\alpha$  的表达量明显降低 ( $P < 0.05$ )。见表 6, 图 4。

表 5 同一时间点不同组别大鼠的肺组织 TNF- $\alpha$  的表达 ( $\bar{x} \pm s, n = 30$ )

**Table 5 Expression of TNF- $\alpha$  in lung tissues at the same time point in different groups ( $\bar{x} \pm s, n = 30$ )** ng·L<sup>-1</sup>

组别	剂量/mg·kg <sup>-1</sup>	1 周	4 周	8 周	12 周	24 周
正常	-	161.630 ± 6.027	158.942 ± 7.180	164.852 ± 5.654	160.839 ± 5.647	159.65 ± 6.076
单药	30	158.610 ± 5.577	159.243 ± 7.209	165.398 ± 6.347	161.281 ± 5.672	158.84 ± 5.582
模型	-	107.500 ± 4.333 <sup>1)</sup>	75.033 ± 5.672 <sup>1)</sup>	71.345 ± 6.322 <sup>1)</sup>	65.467 ± 5.465 <sup>1)</sup>	58.364 ± 5.934 <sup>1)</sup>
激素	1.25 ~ 0.062 5	125.570 ± 5.674 <sup>1,2,3)</sup>	96.258 ± 5.340 <sup>1,2,3)</sup>	86.639 ± 5.150 <sup>1,2,3)</sup>	81.360 ± 5.409 <sup>1,2,3)</sup>	76.236 ± 5.328 <sup>1,2,3)</sup>
马蔺子素	15	111.470 ± 5.452 <sup>1)</sup>	78.496 ± 5.464 <sup>1)</sup>	73.296 ± 5.894 <sup>1)</sup>	67.423 ± 5.585 <sup>1)</sup>	59.186 ± 5.769 <sup>1)</sup>
	30	127.520 ± 5.117 <sup>1,2,3)</sup>	93.852 ± 5.654 <sup>1,2,3)</sup>	83.642 ± 5.542 <sup>1,2,3)</sup>	78.163 ± 4.896 <sup>1,2,3)</sup>	74.274 ± 4.958 <sup>1,2,3)</sup>
	60	127.900 ± 4.563 <sup>1,2,3)</sup>	95.973 ± 6.458 <sup>1,2,3)</sup>	85.372 ± 5.399 <sup>1,2,3)</sup>	79.246 ± 4.619 <sup>1,2,3)</sup>	75.463 ± 5.065 <sup>1,2,3)</sup>

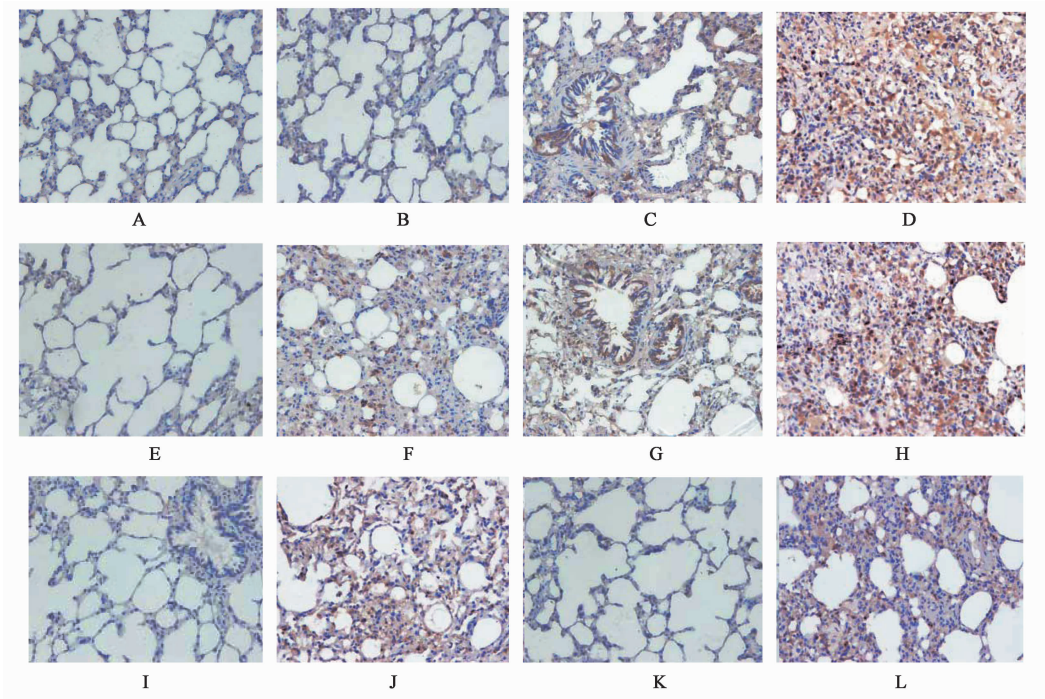


图 3 各组大鼠肺组织 TNF- $\alpha$  的表达 (免疫组化,  $\times 200$ )

Fig. 3 TNF- $\alpha$  expression of lung tissues of each group (immunohistochemistry,  $\times 200$ )

表 6 同一时间点不同组别大鼠的肺组织 TGF- $\beta_1$  的表达 ( $\bar{x} \pm s, n = 30$ )

**Table 6 Expression of TGF- $\beta_1$  in lung tissues at the same time point in different groups ( $\bar{x} \pm s, n = 30$ )** ng·L<sup>-1</sup>

组别	剂量/mg·kg <sup>-1</sup>	1 周	4 周	8 周	12 周	24 周
正常	-	154.463 ± 5.537	154.650 ± 6.640	151.170 ± 9.980	151.530 ± 5.802	149.850 ± 6.204
单药	30	155.11 ± 5.264	155.240 ± 5.867	153.260 ± 4.954	152.680 ± 5.192	148.360 ± 4.691
模型	-	97.601 ± 5.520 <sup>1)</sup>	85.644 ± 5.170 <sup>1)</sup>	67.595 ± 6.062 <sup>1)</sup>	55.955 ± 6.257 <sup>1)</sup>	46.237 ± 4.366 <sup>1)</sup>
激素	1.25 ~ 0.062 5	97.206 ± 5.313 <sup>1)</sup>	96.253 ± 4.625 <sup>1,2,3)</sup>	77.637 ± 6.119 <sup>1,2,3)</sup>	65.276 ± 5.349 <sup>1,2,3)</sup>	56.374 ± 4.453 <sup>1,2,3)</sup>
马蔺子素	15	97.507 ± 5.046 <sup>1)</sup>	86.298 ± 4.405 <sup>1)</sup>	69.663 ± 5.359 <sup>1)</sup>	56.638 ± 5.045 <sup>1)</sup>	45.156 ± 4.296 <sup>1)</sup>
	30	96.507 ± 4.537 <sup>1)</sup>	91.535 ± 5.107 <sup>1,2,3)</sup>	74.376 ± 5.593 <sup>1,2,3)</sup>	63.051 ± 4.886 <sup>1,2,3)</sup>	54.146 ± 4.133 <sup>1,2,3)</sup>
	60	97.404 ± 5.416 <sup>1)</sup>	9.279 ± 4.963 <sup>1,2,3)</sup>	75.598 ± 4.832 <sup>1,2,3)</sup>	64.092 ± 4.774 <sup>1,2,3)</sup>	55.289 ± 4.399 <sup>1,2,3)</sup>

#### 4 讨论

放射性肺损伤在国内外所报道的发生率不相同,目前总体上仍高于 17%<sup>[3-4]</sup>。放射性肺损伤的

发生机制尚未完全清楚,目前有细胞因子,关键靶细胞和自由基等主要学说<sup>[5-7]</sup>。其中,细胞因子仍是研究热点。后期放射性肺纤维化一旦发生则不可逆

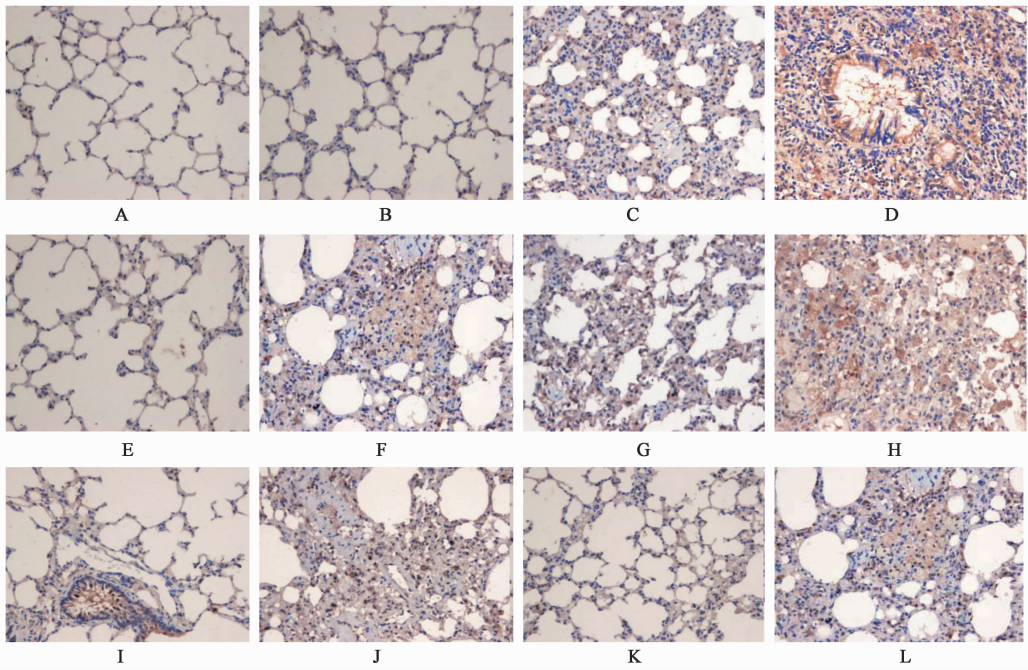


图 4 各组大鼠肺组织 TGF- $\beta_1$  的表达 (免疫组化,  $\times 200$ )

Fig. 4 TGF- $\beta_1$  expression of lung tissues of each group (immunohistochemistry,  $\times 200$ )

转,因此预防比治疗更重要。目前放射性肺损伤的防治手段不多,国内外主要用抗生素、激素、抗氧化剂,细胞因子抑制剂等来治疗<sup>[8-9]</sup>,因存在不良反应,不建议长期使用或作为预防性用药。目前放射性肺损伤尚无很好的防护及治疗药物,但因为中草药经济,来源广泛,所以一直为该研究领域的热点。国内研究发现马蔺子素对头颈部原发肿瘤有放射增敏作用<sup>[2]</sup>,近年来国外研究发现马蔺子素对肺移植瘤的放射增敏作用能通过 PET/CT 动态检测<sup>[10]</sup>。而关于马蔺子素除了放射增敏作用外,有无抗炎抗氧化作用及对放射性肺损伤的防护作用尚无相关报道。本研究通过建立大鼠放射性肺损伤模型,探讨马蔺子素对放射性肺损伤的防护作用及机制。

本研究采用<sup>60</sup>Co  $\gamma$  单次右肺照射 20 Gy,成功地构建出了放射性肺损伤模型,这与卢宏达等<sup>[11]</sup>研究中报道一致。放射性肺损伤在早期表现为放射性肺炎,以炎细胞浸润灶,水肿及肺泡间隔逐渐增厚;晚期放射性肺纤维化主要表现为肺泡壁明显增厚,肺泡间隔进行性地增宽,肺泡塌陷甚至缺失,大量成纤维细胞增生,形成纤维化改变。本研究通过病理学染色观察到放射性肺损伤的典型演变过程,并证实中、大剂量马蔺子素可在一定程度减轻急性放射性肺损伤及慢性放射性肺纤维化病灶,通过比较正常组和单药组,可观察到马蔺子素对正常肺组织无明显毒副作用。羟脯氨酸是胶原蛋白所特有的氨基

酸,其含量的高低可以间接反映总体胶原纤维的水平,本实验通过测定羟脯氨酸的含量来评估放射性肺纤维化的程度。发现马蔺子素组在各个时间点羟脯氨酸含量均呈逐渐增加的趋势,8~12 周之间增加幅度最大。中、大剂量马蔺子素组羟脯氨酸含量虽较非照射组明显升高,但在 4, 8, 12, 24 周与模型组和小剂量马蔺子素组相比明显降低,与激素组比较无差别。这一结果提示马蔺子素可能通过降低羟脯氨酸含量来抑制放射性肺纤维化的形成。

放射性肺损伤是多个细胞复杂作用的过程,与放射性肺损伤密切相关的细胞因子分为两类,一类是促炎性因子介导炎症反应,另一类是促进成纤维细胞增殖和分化的纤维化调节因子<sup>[12]</sup>。大量放射性肺损伤早期研究表明,当肺 II 型细胞和肺血管内皮细胞在被照射后,释放促炎性因子如 TNF- $\alpha$ , 白细胞介素-1 (IL-1), 进而诱发和促进成纤维细胞释放促纤维化因子如 TGF- $\beta_1$ , 刺激成纤维细胞增生和胶原蛋白合成,促进肺纤维化的形成。这些细胞因子水平在照射后持续升高,是放射性肺损伤的决定因素<sup>[13]</sup>。Chung 等<sup>[14-15]</sup>照射前用活性氧清除剂异氟烷,通过减少 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  在肺部的释放,来抑制急性肺损伤的发生。Rube 等<sup>[16]</sup>照射前用 TNF- $\alpha$  的拮抗剂己酮可可碱,通过抑制支气管上皮细胞,血管内皮细胞 TNF- $\alpha$  的表达来减轻放射性肺损伤的发生。Flechsigs 等<sup>[17]</sup>通过应用 TGF- $\beta_1$  受体激酶的小分子

抑制剂来阻断 TGF- $\beta_1$  的信号通路来减轻放射性肺损伤。以上研究证实 TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta_1$  肺与放射肺损伤的发生密切相关。国内外许多学者研究发现通过监测照射前后血浆中 TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta_1$  的变化水平,是预测放射性肺损伤的危险因素之一。

本研究中通过 ELISA 法及免疫组化法观察不同时间点血清 IL-1 $\beta$  及肺组织间 TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta_1$  的表达,均观察到照射组表达较非照射组明显升高,且血清 TNF- $\alpha$  于 4 周达到高峰,继而逐渐下降,这与 Bao 等<sup>[18]</sup> 研究趋势大致一致;血清 IL-1 $\beta$  于 4 周达到高峰,继而逐渐下降, Miyake 等<sup>[19]</sup> 有类似相关报道;血清 TGF- $\beta_1$  于 12 周达到高峰,继而逐渐下降,这与 Martin 等<sup>[20]</sup> 报道的结果一致。免疫组化结果显示照射后肺组织中 TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta_1$  蛋白阳性表达随时间逐渐增加。同时本研究发现用马蔺子素后,在中、大剂量马蔺子素组,大鼠放射性肺损伤减轻的同时,也降低了血浆 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  和 TGF- $\beta_1$  的浓度,与激素组无差异。ELISA 结果显示照射后,中、大剂量马蔺子素组在同一时间点血浆 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TGF- $\beta_1$  浓度较正常组高,但显著低于模型组和低剂量马蔺子素组,且与激素组比较无差异。而免疫组化结果显示在照射后同一时间点,中、大剂量马蔺子素照射组肺组织中 TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta_1$  蛋白阳性表达高于正常组,但较模型组和低剂量马蔺子素组低,与激素组比较无差别。本实验发现中、大剂量马蔺子素可能通过降低肺组织羟脯氨酸含量和血浆 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TGF- $\beta_1$  的浓度及肺组织中 TNF- $\alpha$  和 TGF- $\beta_1$  的表达,从而在早期发挥减轻放射性肺损伤的作用,在晚期发挥减轻放射性肺纤维化的作用。而低剂量组马蔺子素照射组与模型组比较,病理和各项指标无明显差异,这一结果提示,小剂量组马蔺子素对放射性肺损伤的防护效果不明显,提示临床预防和治疗放疗引起的放射性肺损伤时,可能需要较大剂量。马蔺子素对放射性肺损伤的防护作用的药理机制可能与马蔺子素成分中含有大量黄酮类及醌类化合物有关<sup>[21]</sup>,有研究发现黄酮类及醌类能提高抗氧化,抗炎能力,抗癌功效,通过清除过多的氧自由基来保护肺组织的保护膜,提高机体抗氧化酶的活性,促进氧的生成,促进组织对氧的利用,肺组织的修复和肺部细胞的再生。通过上述同样指标比较正常组和马蔺子素组,观察到在各个时间点上两组均无明显差异,这一结果显示马蔺子素对正常大鼠肺组织无毒副作用。然而本研究中血浆中 TNF- $\alpha$  和 TGF- $\beta_1$  的表达早期呈增加,后期呈减少的趋势,

而肺组织中 TNF- $\alpha$  和 TGF- $\beta_1$  蛋白在照射后一直呈增加的趋势,在后期仍有明显的表达,两种指标的变化趋势不完全相同,一方面可能是由于本实验在同一个时间点的样本数太小,可能会对结果有影响;另一方面采用的免疫组织化学评分为半定量方法,可能会对实验结果造成一定的误差;此外血浆的表达与肺组织的表达在同一时间点可能不完全一致。

本研究通过建立大鼠放射性肺损伤模型,在各个时间点上观察到马蔺子素在一定程度上能减轻放射性肺损伤,其机制可能与其能抑制血清和肺组织的 TNF- $\alpha$  和 TGF- $\beta_1$  的表达有关。马蔺子素除了文献报道的增敏作用外,本研究还发现其具有抗炎抗氧化的双重作用,且价格低廉、副反应小等优势,有望成为新型放射性肺损伤的双重增敏剂和防护剂。然而马蔺子素对放射性肺损伤的防护作用,与其他纤维化信号通路有无联系还有待进一步实验探索。

#### [参考文献]

- [1] 牛剑钊, 湛建峰, 张启明, 等. 马蔺子素研究进展[J]. 中国药事, 2010, 24(8): 825-827.
- [2] 金凤, 吴伟莉, 董红敏, 等. 马蔺子素对鼻咽癌后程加速超分割放疗增敏作用的前瞻性临床研究[J]. 中华放射肿瘤学杂志, 2005, 9(14): 413-414.
- [3] Jenkins P, Welsh A. Computed tomography appearance of early radiation injury to the lung: correlation with clinical and dosimetric factors[J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2011, 81(1): 97-103.
- [4] Jenkins P, Watts J. An improved model for predicting radiation pneumonitis incorporating clinical and dosimetric variables[J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2011, 80(4): 1023-1029.
- [5] Liao Z X, Travis E L, Tucker S L et al. Damage and morbidity from pneumonitis after irradiation of partial volumes of mouse lung[J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 1995, 32(5): 1359-1370.
- [6] 白蕴红, 王德文. 放射性间质性肺炎的自由基生物学机理的探讨[J]. 中华放射医学与防护杂志, 1994, 14(4): 253-255.
- [7] Rube C E, Wilfert F, Uthe D, et al. Increased expression of pro-inflammatory cytokines as a cause of lung toxicity after combined treatment with gemcitabine and thoracic irradiation [J]. Radiother Oncol, 2004, 72(2): 231-241.
- [8] Borst G R, Ishikawa M, Nijkamp J, et al. Radiation pneumonitis in patients treated for malignant pulmonary lesions with hypofractionated radiation therapy [J].

- Radiother Oncol, 2009, 91(3):307-313.
- [ 9 ] Asakura H, Hashimoto T, Zenda S, et al. Analysis of dose-volume histogram parameters for radiation pneumonitis after definitive concurrent chemoradiotherapy for esophageal cancer [ J ]. Radiother Oncol, 2010, 95 ( 2 ) : 240-244.
- [ 10 ] Xu H, Sun G, Wang H. Dynamic observation of the radiosensitive effect of irisquinone on rabbit VX2 lung transplant tumors by using fluorine-18-deoxyglucose positron emission tomography/computed tomography [ J ]. Nucl Med Commun, 2013, 34 ( 3 ) : 220-228.
- [ 11 ] 卢宏达,董克臣,雷章,等. 连花清瘟对大鼠急性放射性肺损伤的防护作用 [ J ]. 中华放射医学与防护杂志, 2014, 6(5):419-422.
- [ 12 ] Rubin P, Finkelstein J, Shapiro D, et al. Molecular biology mechanisms in the radiation induction of pulmonary injury syndromes; interrelationship between the alveolar macrophage and the septal fibroblast [ J ]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 1992, 24(1):93-101.
- [ 13 ] Rube C E, Wilfert F, Uthe D, et al. Increased expression of pro-inflammatory cytokines as a cause of lung toxicity after combined treatment with gemcitabine and thoracic irradiation [ J ]. Radiother Oncol, 2004, 72 ( 2 ) : 231-241.
- [ 14 ] Chung I S, Kim J A, Kim J A, et al. Reactive oxygen species by isoflurane mediates inhibition of nuclear factor  $\kappa$ B activation in lipopolysaccharide-induced acute inflammation of the lung [ J ]. Anesth Analg, 2013, 116 ( 2 ) : 327-335.
- [ 15 ] Rube C E, Palm J, Erren M, et al. Cytokine plasma levels; reliable predictors for radiation pneumonitis [ J ]. PLoS One, 2008, 3(8):e2898.
- [ 16 ] Rube C E, Wilfert F, Uthe D, et al. Modulation of radiation-induced tumour necrosis factor alpha ( TNF-alpha ) expression in the lung tissue by pentoxifylline [ J ]. Radiother Oncol, 2002, 64(2):177-187.
- [ 17 ] Flechsig P, Dadrich M, Bickelhaupt S, et al. LY2109761 attenuates radiation-induced pulmonary murine fibrosis via reversal of TGF- $\beta$  and BMP-associated proinflammatory and proangiogenic signals [ J ]. Clin Cancer Res, 2012, 18(13):3616-3627.
- [ 18 ] Bao P, Gao W, Li S, et al. Effect of pretreatment with high-dose ulinastatin in preventing radiation-induced pulmonary injury in rats [ J ]. Eur J Pharmacol, 2009, 603 ( 1/3 ) : 114-119.
- [ 19 ] Miyake K, Tani K, Kakiuchi S, et al. Epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitor ( gefitinib ) augments pneumonitis, but attenuates lung fibrosis in response to radiation injury in rats [ J ]. J Med Invest, 2012, 59(1/2):174-185.
- [ 20 ] Martin M, Lefaix J, Delanian S, et al. TGF-beta1 and radiation fibrosis: a master switch and a specific therapeutic target? [ J ]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2000, 47(2):277-290.
- [ 21 ] 黄爱玲. 黄酮类化合物药理作用研究进展 [ J ]. 安徽农学通报, 2007, 13(10):71-72.

[ 责任编辑 张丰丰 ]