

· 论 著 ·

## 小鼠放射性肺损伤动物模型的建立与鉴定\*

周 芊, 王 东, 李梦侠, 曾林立, 王 阁, 杨镇洲<sup>△</sup>

(第三军医大学大坪医院野战外科研究所肿瘤中心, 重庆 400042)

**摘要:**目的 建立放射性肺损伤小鼠模型和有效的定量评价方法。方法 雌性昆明种小鼠 72 只, 完全随机分为对照组(18 只)、照射组(54 只)。全肺单次照射 20 Gy, 于照射后 1、3 d 和 1、2、4、8 周取照射组及相同鼠龄对照组小鼠肺组织和静脉血, 分别用 HE、Masson 染色, 在光镜下观察组织病理改变和胶原纤维沉积情况, 用酶联免疫(ELISA)法测定血清转化生长因子- $\beta$ 1(TGF- $\beta$ 1)含量。结果 与对照组比较, 照射组小鼠肺组织早期以渗出为主, 表现为肺间质及肺毛细血管充血、水肿, 照射后期以肺泡间隔及部分肺泡腔内可见纤维素样渗出物为特征。同时, ELISA 法显示照射后 7 d 血清 TGF- $\beta$ 1 含量[(18.46 $\pm$ 1.678)ng/mL]明显增高, 与对照组[(9.61 $\pm$ 2.027)ng/mL]比较差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。结论 通过病理形态学和血清学指标证实成功地建立了放射性肺损伤小鼠模型, 该模型较好地模拟了放射性肺损伤的发生、发展过程。

**关键词:**放射性肺损伤; 小鼠; 动物模型; 转化生长因子- $\beta$ 1

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2010.19.004

中图分类号: R818.74; R563.1

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2010)19-2553-02

## Establishment and identification of mice model of radition-induced lung injury\*

ZHOU Qian, WANG Dong, LI Meng-xia, et al.

(Cancer Center, Research Institute of Surgery, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

**Abstract: Objective** To establish a mice model of radiation-induced lung injury and effective quantitative assessment methods.

**Methods** Seventy-two Kunming female mice were assigned randomly to control group (received sham-irradiation,  $n=18$ ) and treatment group (received irradiation on the thoraces with single fraction 20-gray X-rays,  $n=54$ ). The mice were sacrificed at 1, 3 days and 1, 2, 4, 7 weeks after the irradiation, lung tissues and venous blood were extracted to observe the pathological changes collagen fiber deposition of lung tissue by HE and Massion staining, and measure the content of TGF- $\beta$ 1 in blood serum via ELISA methods.

**Results** Compared with the control group, significant effusion eg. vasocongestion, edema of lung interstitial substance and pulmonary capillary was observed in the treatment group at early stage after irradiation. At late stage after irradiation, cellulose effusion was main in alveolar septum and alveolar space. The difference of TGF- $\beta$ 1 content was significant ( $P < 0.01$ ) between treatment group (18.46 $\pm$ 1.678) ng/mL and control group (9.61 $\pm$ 2.027) ng/mL at 7 days after irradiation by ELISA method. **Conclusion** A mice model of radition-induced lung injury that was confirmed by the pathological morphology and blood serum index was established succussfully.

**Key words:** radition-induced lung injury; mice; mice model; TGF- $\beta$ 1

放疗是胸部肿瘤最主要的治疗手段之一, 而放射性肺炎(radiation pneumonitis, RP)作为胸部肿瘤放疗常见的严重并发症和剂量限制因素, 其发生率达 5%~15%, 一旦发生, 通常引起严重的临床后果<sup>[1]</sup>。因此, 对放射性肺损伤病理过程及发生机制的研究越来越受到各国学者的重视, 建立一种合适的放射性肺炎动物模型以及稳定、准确的鉴定方法是进一步深入研究所必须的。为此, 本研究建立了放射性肺损伤小鼠动物模型, 并对模型进行了病理组织学和血清学鉴定, 为今后研究放射性肺损伤防护提供基础。

## 1 材料与方 法

**1.1 实验材料** 体质量 17~21 g 成年健康雌性昆明小鼠 72 只, 购自第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心。数字化直线加速器(瑞典 ELEKTA 公司)、普通光学显微镜(BX-50, Olympus, 日本)、蛋白核酸分析仪(美国 Bio-Rad 公司)、5804 型台式冷冻离心机(德国 Eppendorf)、PROTEAN II

中型垂直电泳仪(美国 Bio-Rad 公司)、TGF- $\beta$ 1 小鼠单抗试剂盒(美国 Biosource)等。

**1.2 全胸照射方法** 速眠新 II (1.5 mg/kg) 肌肉注射, 全身麻醉小鼠, 将小鼠仰卧位固定于治疗床上, 以 5 mm 铅板防护动物头部和腹部。照射组小鼠使用直线加速器产生的 8 mV X 射线, 经前胸野单次照射小鼠肺脏中平面 20 Gy, 剂量率为 200 cGy/min, 动物与放射源距离为 100 cm, 射野范围为 10 cm $\times$ 10 cm。对照组小鼠给予麻醉后佯装照射。

**1.3 鼠肺大体标本观察** 于照射后 1、3 d 和 1、2、4、8 周 6 个时相点麻醉小鼠, 先结扎气管再剖开胸腔分离主气管, 并快速将气管及双肺剥离出胸腔, 观察肺的大体结构改变。

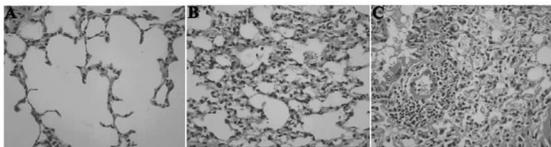
**1.4 组织病理学观察** 选取小鼠右肺组织予 10% 甲醛固定, 常规石蜡包埋切片, 作 HE 染色和利用 Masson 三联染色(肺组织胶原纤维染色)评价肺组织切片纤维化程度, 光镜观察病理组织结构改变。

**1.5 酶联免疫(ELISA)法检测** 于照射后 1、3 d 和 1、2、4、8 周 6 个时相点,每组取 3 只小鼠眼静脉血 1.5~2 mL,25 ℃ 下放置 30 min,4 000 r/min 离心 5 min,取血清 0.5 mL 置于 1.5 mL 聚丙烯二试管内,血清转化生长因子(TGF-β1)含量测定按说明书进行操作。用包被缓冲液稀释兔抗鼠 IgG 单克隆抗体包被酶标板,稀释度分别为 1:5 000、1:10 000、1:20 000、1:40 000,每一浓度包被 3 个纵行,每孔 100 μL,4 ℃ 过夜,每孔均作复孔。次日,将酶标板洗涤 3 次,5% BSA 封闭,每孔 200 μL,37 ℃ 孵育 2 h,洗涤 3 次。在横行包被孔中依次加入阴性对照血清,弱阳性抗原液及强阳性抗原液,每孔 100 μL,37 ℃ 孵育 1 h,洗涤 3 次。在每一包被浓度的一个纵行中分别加入按 1:2 000、1:5 000、1:10 000 稀释的上述多克隆抗体,每孔 100 μL,37 ℃ 孵育 1 h,洗涤 3 次。在每一包被浓度的一个纵行中分别加入按 1:5 000 稀释的 HRP 标记羊抗兔 IgG 抗体,每孔 100 μL,37 ℃ 孵育 45 min,洗涤 3 次。加 TMB 底物,室温避光显色 15~20 min,用 2 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 终止反应,读取 OD<sub>450</sub> 值。以 OD 值为纵坐标,以标准品浓度为横坐标,绘制标准曲线。根据血清样品的 OD 值在标准曲线上查出其浓度。

**1.6 统计学方法** 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 SPSS13.0 统计软件进行单因素方差分析,组间比较进行 *t* 检验。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

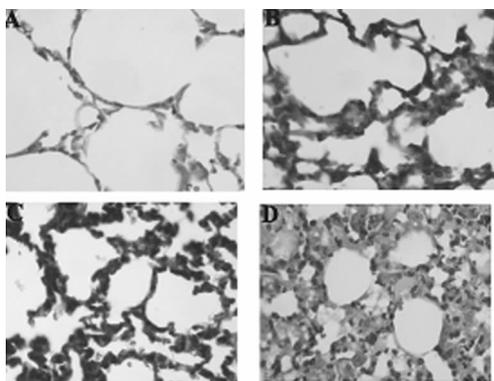
**2 结 果**

**2.1 大体观察** 小鼠全肺照射后 4 周,照射野内被毛明显脱落。解剖标本显示:对照组小鼠肺脏外观呈粉红色,表面光滑,弹性良好;照射组肺脏轻度肿胀、充血,表面和切面可见散在出血点,照射后 8 周全肺呈暗红色。



A: 对照组; B: 照射后 1 周; C: 照射后 8 周。

**图 1 小鼠肺照射后组织形态学改变(HE×400)**



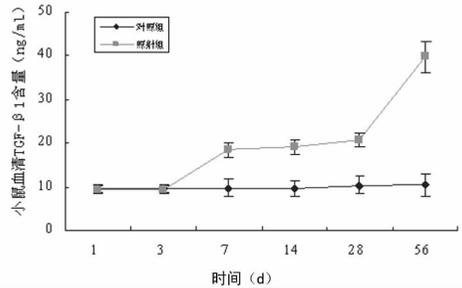
A: 对照组; B: 照射后 2 周; C: 照射后 4 周; D: 照射后 8 周。

**图 2 小鼠肺组织 Masson 三联染色显示肺组织受照射后胶原纤维的变化(Masson×400)**

**2.2 HE 染色和 Masson 染色组织学观察** 对照组小鼠肺组织结构正常,肺间质未见充血,毛细血管壁完整,肺泡及细支气管腔无炎性渗出,见图 1A。而照射组小鼠肺组织照射后 1、3、7、14 d 病变以渗出为主,肺间质及肺毛细血管充血、水肿,肺泡

腔及细支气管内见较多的淋巴细胞,间质水肿致肺泡壁轻度增厚,部分肺泡间含水肿液,见图 1B。照射后 4、8 周病变以慢性炎症为主,支气管和血管周围可见以淋巴细胞为主的炎症细胞浸润,肺泡壁增厚,肺泡腔变小,肺泡间隔及部分肺泡腔内可见纤维素样渗出物,见图 1C。Masson 三联染色:可见肺间质蓝色胶原纤维沉积,对照组可见少许纤维组织,见图 2A;照射组照射后 2 周纤维组织开始增生,见图 2B,照射后 4、8 周肺纤维化形成,肺结构紊乱,并可见大量染成绿色的胶原纤维,见图 2C、D。

**2.3 血清 TGF-β1 检测结果** 照射后 1 周血清 TGF-β1 含量明显增高,此后逐渐增高,第 8 周达高峰,与对照组比较差异有统计学意义( $P < 0.01$ ),见图 3。



**图 3 各组小鼠血清 TGF-β1 含量检测**

**3 讨 论**

放射性肺损伤动物模型建立对进一步研究放射性肺损伤机制及防治至关重要。综合遗传背景、操作难易程度、费用等因素,由于小鼠体积小、成本低,易于建立并方便快捷,目前认为建立放射性肺损伤鼠类动物模型比较适合且应用最为广泛。本研究应用昆明小鼠建立了放射性肺损伤模型,该小鼠特点是抗病力和适应力强、成活率高。

放射性肺损伤与照射剂量、受照体积和部位等因素相关,研究者可根据研究目的来选择照射剂量。进行放射肺损伤的长期效应研究,国外有学者给予 4 Gy 或 7 Gy 单次照射小鼠肺组织,应用呼吸频率和致死率来评价 1 年后放射性肺损伤,也有研究者采用 13.5 Gy 单次照射小鼠并持续观察 24 周<sup>[1-2]</sup>。杨明会等<sup>[3]</sup>报道对比大鼠一次性给予 30 Gy 或 3 Gy、每周 2 次、总剂量 30 Gy 的照射,组织学证实两组均能引发典型的放射性肺炎和肺纤维化,但 26 周后发现小剂量多次照射组大鼠存活率高。对放射肺损伤进行短期研究,目前多采用大分割单次照射法。孟玲玲等<sup>[4]</sup>采用 6 mV X 线单次照射小鼠右肺 30 Gy,观察至照射后 2 个月。虽然小剂量多次照射被认为更符合临床常规治疗剂量,但目前大家也逐步开始关注全身立体定向治疗时的大分割照射,故在本实验中仍采用 20 Gy 全肺单次照射构建放射性肺炎模型。本研究结果表明,通过全肺 20 Gy 单次照射雌性昆明小鼠,成功地复制出典型的放射性肺炎小鼠动物模型。

国内外学者研究认为放射性肺损伤的病理形态学改变主要是肺间质充血水肿,肺泡内渗出物增加,炎细胞浸润,后期纤维结缔组织增生,肺泡萎缩<sup>[5-6]</sup>。本研究结果基本与之相符,照射组 2 周内以渗出为主,4 周后病变以慢性炎症为主,肺泡间隔及部分肺泡腔内可见纤维素样的渗出物。因而,通过病理观察证实本放射性肺炎小鼠模型成功建立。目前比较认同的放射性肺损伤发生的机制为放疗产生的活性氧直接作用于实质细胞并通过改变细胞因子的微环境而启动一(下转第 2557 页)

用的药敏实验方法有一定的关系<sup>[10-11]</sup>。桂西地区处于滇、黔、桂 3 省交界处,属于边远山区,经济发展比较落后;该地区有壮、汉、瑶、苗等民族分布,主要以壮、汉族为主。近几年,由于国家药品采购制度以及抗菌药物使用制度逐渐完善,医师的用药习惯也逐步规范,滥用抗菌药物的现象明显减少,迅速增长的抗菌药物耐药率得到了有效控制<sup>[12]</sup>,但是,由于原发性和继发性耐药的发生,耐药率还是逐年上升。诱导原发性和继发性耐药发生的原因是什么,是否真的与地理分布、民族、经济水平、用药习惯等因素有关?本研究使用了单因素  $\chi^2$  分析 Hp 耐药与性别、民族、疾病及年龄的关系,寻找产生耐药性的影响因素,研究结果显示差异无统计学意义。由此可见,桂西地区人群的性别、民族、疾病及年龄并不是 Hp 耐药产生的主要影响因素。

本研究结果还显示了桂西地区 Hp 耐药菌株的区域分布情况,4 县市各抗菌药物耐药率比较没有超过 1%。原因可能是该地区地理位置、经济情况、卫生条件等因素的影响,各医院医师的治疗方法以及用药习惯比较一致,致使原发性耐药和继发性耐药的发生差异无统计学意义。

#### 参考文献:

- [1] 胡伏莲. 重视 Hp 耐药菌株的研究[J]. 胃肠病学, 2006, 7(3):385.
- [2] 武静, 张碧霞, 赵德军, 等. 产气袋法培养幽门螺杆菌[J]. 临床检验杂志, 2004, 22(4):283.
- [3] 赵丽娟, 黄衍强. 医学微生物学实验指导与考试指南[M]. 南宁: 广西科学技术出版社, 2008:153.

(上接第 2554 页)

系列的“分子级联”反应,随着活性氧自由基的增多,导致脂质过氧化、DNA 和蛋白质的氧化以及致炎因子的进一步激活,最终导致纤维化形成<sup>[7-8]</sup>。国内外学者对这些生物因子进行了大量研究,目前比较一致的观点认为血清 TGF- $\beta$ 1 水平可以作为放射性肺损伤的预测因子,与急性放射性肺炎尤其是放射性纤维化密切相关。本实验发现放疗后小鼠血清 TGF- $\beta$ 1 含量呈现逐渐升高过程,与对照组比较差异有统计学意义( $P < 0.01$ ),这与 Machtay 等<sup>[2]</sup>研究结果类似,只是在发生改变所对应的时相点和含量的高低上有所差别。

#### 参考文献:

- [1] Travis EL, De Luca AM. Protection of mouse lung by WR-2721 after fractionated doses of irradiation[J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 1985, 11(3):521.
- [2] Machtay M, Scherpereel A, Santiago J, et al. Systemic polyethylene glycol-modified (PEGylated) superoxide dismutase and catalase mixture attenuates radiation pulmonary fibrosis in the C57/bl6 mouse[J]. Radiother Oncol, 2006, 81(2):196.
- [3] 杨明会, 张利军, 冯林春, 等. 小剂量多次照射大鼠放射性

- [4] 俞树荣, 陈拯, 张卓然, 等. 微生物学与微生物学检验[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2001:455.
- [5] 张万岱, 萧树东, 胡伏莲, 等. 对幽门螺杆菌若干问题共识意见[J]. 世界华人消化杂志, 2004, 12(10):2457.
- [6] 吕琳, 罗红春, 杨致邦, 等. 重庆地区幽门螺杆菌临床株耐药性研究[J]. 重庆医学, 2009, 38(6):669.
- [7] 代丽萍, 宋春花, 吕全军, 等. 河南新乡县农村居民幽门螺杆菌感染调查[J]. 中国公共卫生, 2006, 22(7):822.
- [8] Poon SK, Chang CS, Su I, et al. Primary resistance to antibiotics and its clinical impact on the efficacy of Helicobacter pylori lansoprazole based triple therapies[J]. Aliment Pharmacol Ther, 2002, 16:291.
- [9] Perez AL, Kato M, Nakagawa S, et al. The relationship between consumption of antimicrobial agents and the prevalence of primary Helicobacter pylori resistance[J]. Helicobacter, 2002, 7:306.
- [10] 黄衍强, 赵丽娟, 黄赞松, 等. 桂西地区幽门螺杆菌对克拉霉素的耐药性分析[J]. 中华微生物学与免疫学杂志, 2009, 29(1):37.
- [11] 黄衍强, 黄赞松, 何勇强, 等. 桂西地区壮族人与汉族人幽门螺杆菌的 REP-PCR 分析[J]. 山东医药, 2008, 48(27):85.
- [12] 吕在明, 周长文. 多药联合治疗幽门螺杆菌阳性消化性溃疡 128 例分析[J]. 重庆医学, 2008, 37(14):1583.

(收稿日期:2010-04-22 修回日期:2010-06-08)

肺损伤模型的评价[J]. 军医进修学院学报, 2006, 27(6):415.

- [4] 孟玲玲, 冯林春, 石怀银, 等. 苦参碱防治放射性肺损伤的实验观察[J]. 军医进修学院学报, 2008, 29(2):134.
- [5] Szabo S, Ghosh SN, Fish BL, et al. Cellular inflammatory infiltrate in pneumonitis induced by a single moderate dose of thoracic x radiation in rats[J]. Radiat Res, 2010, 173(4):545.
- [6] Kiazimov KI. Pathogenesis, diagnostics and treatment of radiation pneumonitis induced by radiotherapy of lung cancer[J]. Georgian Med News, 2009, 174:115.
- [7] Ghafoori P, Marks LB, Vujaskovic Z, et al. Radiation-induced lung injury. Assessment, management, and prevention[J]. Oncology (Williston Park), 2008, 22(1):37.
- [8] Zhao W, Robbins ME. Inflammation and chronic oxidative stress in radiation-induced late normal tissue injury: therapeutic implications[J]. Curr Med Chem, 2009, 16(2):130.

(收稿日期:2010-05-12 修改日期:2010-06-28)