

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2023.04.002

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail//50.1097.R.20221205.1728.006.html\(2022-12-06\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail//50.1097.R.20221205.1728.006.html(2022-12-06))

红霉素抑制 PI3K/Akt 通路增加 Nrf2 蛋白表达减轻烟草烟雾暴露下单核细胞炎症反应的效果研究*

孙雪皎, 陈琳[△], 陈慧, 李程, 蓝官引

(柳州市人民医院呼吸与危重症医学科, 广西柳州 545006)

[摘要] **目的** 研究红霉素通过抑制 PI3K/Akt 通路增加 Nrf2 蛋白表达从而减轻烟草烟雾暴露下单核细胞炎症反应的效果。**方法** 以人单核细胞株(U937)为研究对象, 采用烟草烟雾提取物(CSE)制造细胞氧化应激模型, 分为空白对照(NC)组、CSE 组(CSE 刺激细胞)、红霉素组(红霉素预孵育+CSE 刺激细胞)、抑制剂组(PI3K 通路抑制剂 LY294002 预孵育+CSE 刺激细胞)等 4 组。根据转染 Nrf2-siRNA 干扰细胞中 Nrf2 蛋白的表达, 分为 siRNA NC 对照组、siRNA NC+CSE 组、NC+CSE+红霉素组、Nrf2-siRNA 组、Nrf2-siRNA+CSE 组、Nrf2-siRNA+CSE+红霉素组等 6 组。采用逆转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)检测各组细胞中 Akt mRNA、Nrf2 mRNA 的表达。采用 Western blotting 检测各组细胞内 Akt、PAkt、Nrf2、核因子(NF)- κ B p65 蛋白的水平。**结果** 与空白对照组比较, CSE 组白细胞介素-8(IL-8)水平明显升高, PAkt 及 NF- κ B p65 蛋白的表达水平上升, Nrf2 蛋白及 Nrf2 mRNA 的表达水平下降。红霉素组和抑制剂组 IL-8 水平较 CSE 组下降, PAkt 及 NF- κ B p65 蛋白的表达水平下降, Nrf2 蛋白及 Nrf2 mRNA 的表达水平有所升高。不同细胞氧化应激模型组 Akt mRNA 水平比较差异无统计学意义($P>0.05$)。Nrf2-siRNA 组 Nrf2 的表达水平较 siRNA NC 组明显降低, 但与 Nrf2-siRNA+CSE 组、Nrf2-siRNA+CSE+红霉素组比较无明显差异; siRNA NC-CSE 组 Nrf2 表达水平下降, 而 NC-CSE+红霉素组表达水平上升; siRNA NC-CSE 组及 Nrf2-siRNA+CSE 组 NF- κ B p65 及 PAkt 表达水平上升, 但 siRNA NC-CSE+红霉素组、NC-CSE+红霉素组表达水平下降。Nrf2-siRNA 组与 siRNA NC 组 NF- κ B p65 及 PAkt 表达水平无明显差异。不同干扰组间 Akt 蛋白的表达水平无明显差异。**结论** 红霉素可通过抑制 PI3K/Akt 通路增加 Nrf2 蛋白的表达减轻烟草烟雾暴露下单核细胞的炎症反应。

[关键词] 红霉素; 烟草烟雾提取物; 单核细胞; Nrf2 蛋白; PI3K/Akt 通路炎症

[中图分类号] R563.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2023)04-0486-05

Erythromycin inhibits the PI3K/Akt pathway and increases the expression of Nrf2 protein to reduce the inflammatory response of monocytes exposed to cigarette smoke*

SUN Xuejiao, CHEN Lin[△], CHEN Hui, LI Cheng, LAN Guanyin

(Department of Respiratory and Critical Care Medicine, Liuzhou People's Hospital, Liuzhou, Guangxi 545006, China)

[Abstract] **Objective** To study the effect of erythromycin on reducing the inflammatory response of monocytes exposed to cigarette smoke by inhibiting the phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)/Akt pathway and increasing the expression of nuclear factor-erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) protein. **Methods** Taking human monocyte cell line (U937) as the research object, the cell oxidative stress model was made by using cigarette smoke extract (CSE), the cells were divided into four groups: the normal control (NC) group, the CSE group (CSE stimulated cells), the erythromycin group (erythromycin pre-incubation + CSE stimulated cells), and the inhibitor group (PI3K pathway inhibitor LY294002 pre-incubated + CSE stimulated cells). According to the expression of Nrf2 protein in cells transfected with Nrf2-siRNA interference, the cells were divided into the siRNA NC group, the siRNA NC+CSE group, the NC+CSE+erythromycin group, the Nrf2-siRNA group, the Nrf2-siRNA+CSE group, the Nrf2-siRNA+CSE+erythromycin group. The expressions of Akt mRNA and Nrf2 mRNA in the cells of each group were detected by reverse transcription-polymerase chain

* 基金项目: 广西壮族自治区自然科学基金(青年基金)项目(2018JJB140433); 广西壮族自治区柳州市科技局科技计划项目(2018BJ10507)。

作者简介: 孙雪皎(1984—), 主任医师, 博士, 主要从事慢性阻塞性肺疾病发病机制及治疗方面的研究。 [△] 通信作者, E-mail: 403176823@qq.com。

reaction (RT-PCR). The levels of Akt, phosphorylated-Akt (PAkt), Nrf2, nuclear factor kappa-B (NF- κ B) p65 protein in each group were detected by Western blotting. **Results** Compared with the blank control group, the interleukin-8 (IL-8) level in the CSE group was significantly increased, the expression levels of PAkt and NF- κ B p65 proteins were increased, and the expression levels of Nrf2 protein and Nrf2 mRNA were decreased. Compared with the CSE group, the IL-8 level in the erythromycin group and the inhibitor group decreased, the expression levels of PAkt and NF- κ B p65 protein decreased, and the expression levels of Nrf2 protein and Nrf2 mRNA increased. There was no significant difference in Akt mRNA levels in different cell oxidative stress model groups ($P > 0.05$). The expression level of Nrf2 in Nrf2-siRNA group was significantly lower than that in siRNA NC group, but there was no significant difference compared with Nrf2-siRNA+CSE group and Nrf2-siRNA+CSE+erythromycin group. The expression level of Nrf2 decreased in the siRNA NC-CSE group, but increased in the NC-CSE+erythromycin group. The expression levels of NF- κ B p65 and PAkt increased in siRNA NC-CSE group and Nrf2-siRNA+CSE group, but decreased in siRNA NC-CSE+erythromycin group and NC-CSE+erythromycin group. There was no significant difference in the expression levels of NF- κ B p65 and PAkt between Nrf2-siRNA group and siRNA NC group. There was no significant difference in the expression level of Akt protein among different interference groups. **Conclusion** Erythromycin can reduce the inflammatory response of monocytes exposed to cigarette smoke by inhibiting the PI3K/Akt pathway and increasing the expression of Nrf2 protein.

[Key words] erythromycin; cigarette smoke extract; monocytes; nuclear factor-erythroid 2-related factor 2 protein; phosphatidylinositol-3-kinase/Akt pathway inflammation

慢性阻塞性肺疾病(COPD)是累及肺部及全身的慢性炎症性疾病,疾病呈进行性发展,严重的 COPD 致残率及致死率较高,会影响患者生活质量,给患者带来极大的心理负担及经济负担。烟草烟雾及环境污染等可引起氧化应激,导致氧化损伤,进而直接损伤气道上皮、加重气道的炎症反应,亦可导致蛋白酶抗蛋白酶失衡等,最终导致气流受限^[1-2]。患者脱离氧化应激环境后气流受限不能完全逆转,呈持续性的气流受限,这是导致 COPD 发生、发展的主要原因之一。

红系衍生的核因子相关因子 2(Nrf2)是具有调节抗氧化基因、维持细胞内氧化还原平衡、抑制凋亡及炎症等多种生物活性的关键转录因子,其与多种细胞因子相互关联,从而发挥多重保护作用^[3-4]。Nrf2 与氧化应激、炎症反应、呼吸系统疾病、恶性肿瘤、癌前病变及心血管疾病等的发生、发展有着密切的联系^[5-6]。近年来,研究发现 Nrf2 在 COPD 的发生、发展中具有重要作用^[7-8]。有研究表明,PI3K 信号通路激活 Nrf2,进而对抗氧化应激,维持氧化/抗氧化平衡^[9]。然而,是否有药物可以通过作用于 Nrf2 进而改善 COPD 患者的炎症反应,国内外尚无类似研究。作者以此为切入点,以单核细胞株(U937 细胞)为研究对象,观察红霉素是否能够通过作用于 Nrf2 蛋白的表达,减轻烟草烟雾暴露下单核细胞的炎症反应,同时验证在单核细胞炎症反应中,PI3K/Akt 通路与 Nrf2 的关系,以及 Nrf2 是否受 PI3K/Akt 通路的调控。本研究将为 COPD 的防治提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料

以人 U937 细胞为研究对象,购于中国科学院细胞库。

1.2 方法

1.2.1 分组

采用烟草烟雾提取物(CSE)制造细胞氧化应激模型,分为以下 4 组:空白对照组($n=3$),细胞培养液培养 U937 细胞,不给予红霉素及 CSE 干预;CSE 组($n=3$),给予 CSE 刺激细胞过夜;红霉素组($n=3$),给予红霉素预孵育 2 h 后予 CSE 刺激过夜;抑制剂组($n=3$),给予 PI3K/Akt 抑制剂 LY294002 预孵育 2 h 后予 CSE 刺激过夜。根据转染 Nrf2-siRNA 干扰细胞 Nrf2 蛋白表达方式,分为以下 6 组:siRNA NC 对照组($n=3$),采用细胞培养液培养,不给予红霉素及 CSE 干预;siRNA NC+CSE 组($n=3$),给予 CSE 刺激细胞过夜;NC+CSE+红霉素组($n=3$),给予红霉素预孵育 2 h 后予 CSE 刺激过夜;Nrf2-siRNA 组($n=3$),应用脂质体法 Nrf2-siRNA 转染 U937 细胞,转染后的细胞应用细胞培养液培养;Nrf2-siRNA+CSE 组($n=3$),转染后的细胞给予 CSE 刺激细胞过夜;Nrf2-siRNA+CSE+红霉素组($n=3$),转染后的细胞给予红霉素预孵育 2 h 后予 CSE 刺激过夜。

1.2.2 U937 细胞的培养

U937 细胞为悬浮细胞,采用由 RPMI1640 培养基及胎牛血清配置、含 10%胎牛血清的培养基培养,于二氧化碳培养箱 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 环境中温育。培养基 4 $^{\circ}$ C 存储。严格按照无菌操作,无菌台使用前打开紫外灯照射 30 min,各种所需的容器、枪头等物品必须经高压灭菌消毒后才能用于细胞培养。应用脂质体法 Nrf2-siRNA 转染 U937 细胞。给予 PI3K/Akt

抑制剂 LY294002 预孵育 2 h 后予 CSE 刺激过夜。

1.2.3 CSE 的刺激及红霉素、抑制剂的干预

(1)CSE 的制备与应用。将 2 支去过滤嘴燃烧的香烟烟雾由注射器驱动装置连续抽吸,将烟雾缓慢通入 20 mL 无血清的培养基中,制成悬液,放入密封瓶内,摇动使其充分溶解,应用紫外分光光度计(波长 320 nm,吸光系数 17.5)测量烟草烟雾提取物的浓度。(2)CSE 及红霉素的水平确定。应用 Brdu 法确定试验中所应用的 CSE 及红霉素水平。(3)红霉素及抑制剂的干预。红霉素组给予红霉素预孵育 2 h 后予 CSE 刺激过夜;抑制剂组、CSE 组应用细胞培养液代替红霉素,其余不变;空白对照组应用细胞培养液代替 CSE 及红霉素。经以上处理后,离心并获取上清液及细胞。

1.2.4 各项指标的检测

(1)IL-8 水平。采用酶联免疫吸附试验(ELISA,武汉华美生物工程有限公司)测定各组细胞上清液中 IL-8 的浓度。(2)Akt mRNA、Nrf2 mRNA 及核因子(NF)- κ B p65 mRNA 水平。采用逆转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)检测各组细胞中 Akt mRNA、Nrf2 mRNA、NF- κ B p65 mRNA 的表达。(3)Akt、PAkt、Nrf2、NF- κ B p65 蛋白水平。采用 Western blotting 检测各组细胞内 Akt、PAkt、Nrf2、NF- κ B p65 蛋白的表达。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 22.0 统计学软件进行数据分析,计量

资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析;计数资料以频数或百分比表示,组间比较采用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 空白对照组、CSE 组、红霉素组、抑制剂组 IL-8 水平比较

与空白对照组比较,CSE 组 IL-8 水平明显升高,红霉素组、抑制剂组 IL-8 水平较 CSE 组下降($P < 0.01$)。见表 1。

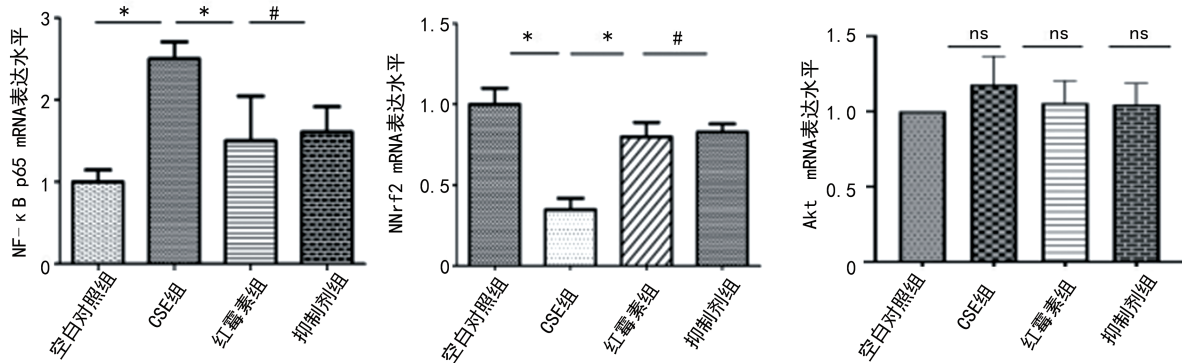
表 1 不同细胞氧化应激模型组 IL-8 浓度比较($\bar{x} \pm s, \mu\text{g/L}$)

组别	n	浓度
空白对照组	3	11.2 ± 1.7
CSE 组	3	39.2 ± 5.1 ^a
红霉素组	3	26.7 ± 3.6 ^b
抑制剂组	3	23.9 ± 5.2 ^b

^a: $P < 0.01$,与空白对照组比较;^b: $P < 0.01$,与 CSE 组比较。

2.2 不同细胞氧化应激模型组细胞中 Akt mRNA、Nrf2 mRNA 及 NF- κ B p65 mRNA 比较

不同细胞氧化应激模型组细胞中 Akt mRNA 差异无统计学意义($P > 0.05$)。CSE 组 Nrf2 mRNA 表达较空白对照组下降,NF- κ B p65 mRNA 表达升高;红霉素组和抑制剂组 Nrf2 mRNA 表达有所提高,NF- κ B p65 mRNA 表达降低。见图 1。



*: $P < 0.01$; #: $P > 0.05$; ns: $P > 0.05$ 。

图 1 不同细胞氧化应激模型组细胞中 Akt mRNA、Nrf2 mRNA 及 NF- κ B p65 mRNA 比较

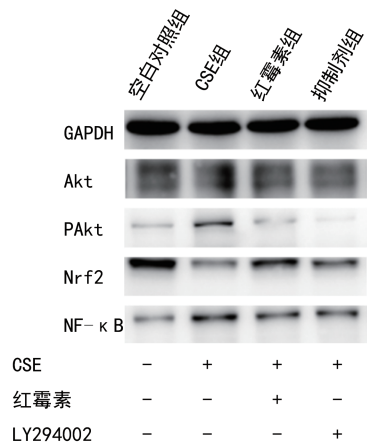
2.3 不同细胞氧化应激模型组细胞中 Akt、PAkt、Nrf2 及 NF- κ B p65 蛋白表达比较

4 组细胞中 Akt 蛋白表达无明显差异。CSE 组 Nrf2 蛋白表达较空白对照组下降,PAkt 及 NF- κ B p65 蛋白表达升高;红霉素组和抑制剂组 Nrf2 蛋白表达有所提高,PAkt 及 NF- κ B p65 蛋白表达降低,但两组间无明显差异。见图 2。

2.4 不同干扰组中细胞 Akt、PAkt、Nrf2 及 NF- κ B p65 蛋白表达比较

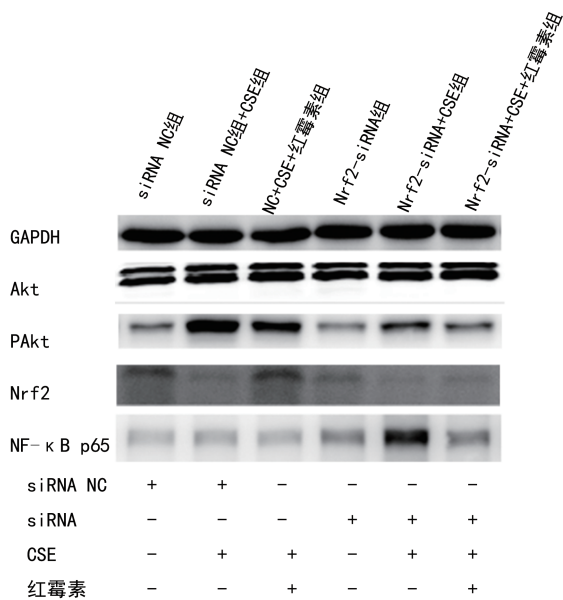
Nrf2-siRNA 组 Nrf2 蛋白表达较 siRNA NC 组

明显降低,但与 Nrf2-siRNA + CSE 组及 Nrf2-siRNA + CSE + 红霉素组比较无明显差异;Nrf2-siRNA 组的 NF- κ B p65 蛋白表达较 siRNA NC 组升高;siRNA NC + CSE 组 Nrf2 蛋白表达较 siRNA NC 组降低,而 NC + CSE + 红霉素组较 siRNA NC + CSE 组表达升高;siRNA NC 组与 Nrf2-siRNA 组的 PAkt 蛋白表达无差异,但 siRNA NC + CSE 组、Nrf2-siRNA + CSE 组表达均升高,而 NC + CSE + 红霉素组、Nrf2-siRNA + CSE + 红霉素组表达又再度降低。不同干扰组间 Akt 蛋白表达无明显差异。见图 3。



GAPDH: 甘油醛-3-磷酸脱氢酶, 内参; +, 加入; -, 不加入。

图2 不同细胞氧化应激模型组细胞中 Akt、PAkt、Nrf2 及 NF-κB p65 蛋白表达比较



+ : 加入; - : 不加入。

图3 不同干扰组中细胞 Akt、PAkt、Nrf2 及 NF-κB p65 蛋白表达比较

3 讨论

Nrf2 活化受蛋白磷酸化的调控。目前认为,丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)、PI3K、蛋白激酶 C(PKC)等信号通路分子广泛参与了 Nrf2 的活化和核转位过程,诱导 Nrf2 核转位的信号通路类型与诱导剂、细胞种类等因素相关。有研究表明,PI3K/Akt-Nrf2 信号通路激活是兔内毒素休克诱发急性肺损伤时机体的适应性调节机制^[10]。然而,在 COPD 炎症的发生与发展中,Nrf2 的表达如何受 PI3K/Akt 通路调节尚不明确,是否有抗炎药物能够通过作用于 PI3K/Akt-Nrf2 信号通路减轻 COPD 的炎症反应,国内外尚无相关研究。

本研究结果表明,单核细胞经 CSE 刺激后炎症细胞因子水平提高,NF-κB p65 升高,PI3K/Akt 通路关键蛋白 PAkt 表达增加,Nrf2 表达下降;经红霉素干预后炎症反应减轻,PAkt 表达下降,而 Nrf2 水平升

高。应用 PI3K/Akt 通路抑制剂 LY294002 作为本研究的阳性对照,其与红霉素有同样的效果。烟草烟雾刺激后单核细胞炎症反应增加,与 PI3K/Akt 通路激活、Nrf2 蛋白表达下降有关,红霉素及通路抑制剂均可抑制 PI3K/Akt 通路活性,提高 Nrf2 蛋白的表达,进而减轻烟草烟雾暴露下单核细胞的炎症反应。为进一步证实 PI3K/Akt 通路与 Nrf2 蛋白的关系,作者转染 Nrf2-siRNA 干扰细胞中 Nrf2 蛋白的表达,应用 siRNA NC 组作为对照,结果表明,Nrf2-siRNA 组的 NF-κB p65 蛋白表达较 siRNA NC 组升高,进一步证明 Nrf2 表达下降可导致炎症反应增加;而两组的 PAkt 蛋白表达无差异,证明 Nrf2 的变化不影响 PI3K/Akt 通路活性。结合前述实验结果,证明 Nrf2 在 PI3K/Akt 下游,受 PI3K/Akt 通路的调控,红霉素可通过作用于 PI3K/Akt-Nrf2 减轻烟草烟雾暴露导致的单核细胞炎症反应。

国外有研究显示,Nrf2 系统的激活被认为是一种有效的细胞保护策略,可用于治疗不同的疾病,例如新型冠状病毒感染^[11]。此外,COPD 相关的研究显示,Nrf2 激活剂 CPUY192018 通过激活 Nrf2,在对抗氧化应激和改善代谢方面显示出显著效果^[12]。在经 CSE 和脂多糖处理的 A549 细胞中,DJ-1 通过激活 Wnt3a/β-catenin 信号通路来调节 Nrf2 介导的 MRP1 表达和抗氧化防御,以上两项研究可能在 COPD 的治疗方面提供潜在的靶点和新思路^[13]。紫杉醇可能通过刺激 Nrf2 信号通路来抑制苯并芘所致肺损伤的氧化应激和炎症反应^[14]。由此可见,Nrf2 的作用在近年来受到了广泛关注,值得进一步的研究与探索。

综上所述,PI3K/Akt 信号通路活性及其下游 Nrf2 蛋白的表达与烟草烟雾暴露的单核细胞炎症反应表达有关,红霉素能够抑制 PI3K/Akt 通路活性,增加 Nrf2 蛋白表达,减轻炎症反应,这将为今后的研究及防治工作提供新思路及实验依据。

参考文献

[1] PETER J B. Senescence in COPD and its comorbidities[J]. Annu Rev Physiol, 2017, 79: 517-539.

[2] PETER J B. Cellular and molecular mechanisms of asthma and COPD[J]. Clin Sci, 2017, 131(13):1541-1558.

[3] LINXIA Z, DELINDA J, JEFFREY A J. Deletion of Nrf2 impairs functional recovery, reduces clearance of myelin debris and decreases axonal remyelination after peripheral nerve injury[J]. Neurobiol Dis, 2013, 54: 329-338.

[4] DARREN M M, INDRAPAL N S, JUAN A W,

- et al. Administration of the Nrf2-ARE activators sulforaphane and carnosic acid attenuates 4-hydroxy-2-nonenal-induced mitochondrial dysfunction ex vivo[J]. *Free Radic Biol Med*, 2013,57:1-9.
- [5] TAKASHI I, YUKIO I, KEN I, et al. Nrf2-deficient mice are highly susceptible to cigarette smoke-induced emphysema [J]. *Genes Cells*, 2005,10(12):1113-1125.
- [6] RANGASAMY T, GUO J, MITZNER W A, et al. Disruption of Nrf2 enhances susceptibility to severe airway inflammation and asthma in mice [J]. *J Exp Med*, 2005,202(1):47-59.
- [7] PETER S. Reactive oxygen species in tumor progression[J]. *Front Biosci*, 2005,10:1881-1896.
- [8] IRFAN R. The role of oxidative stress in the pathogenesis of COPD; implications for therapy [J]. *Treat Respir Med*, 2005,4(3):175-200.
- [9] 章静, 史佳, 余剑波, 等. PI3K/Akt/Nrf2 信号通路在兔内毒素休克诱发急性肺损伤中的作用 [J]. *中华麻醉学杂志*, 2015,35(10):1257-1260.
- [10] 陈牡林, 余剑波, 宫丽荣, 等. PI3K/Nrf2 通路在内毒素休克兔肾损伤中的作用 [J]. *中国病理生理杂志*, 2016,32(1):129-133.
- [11] ALEXEY V U, ANDREY A R, GEORGII P G, et al. Nrf2/Keap1/ARE signaling: towards specific regulation [J]. *Life Sci*, 2022,291:120111.
- [12] LI W, XINYI C, XIANG L, et al. Developing a novel strategy for COPD therapy by targeting Nrf2 and metabolism reprogramming simultaneously [J]. *Free Radic Biol Med*, 2021,169:436-445.
- [13] JIAN Z, CHUANZONG Q, XIN F, et al. DJ-1 modulates Nrf2-mediated MRP1 expression by activating Wnt3a/ β -catenin signalling in A549 cells exposed to cigarette smoke extract and LPS [J]. *Life Sci*, 2021,276:119089.
- [14] ISLAM J, SHREE A, VAFA A, et al. Taxifolin ameliorates Benzo[a]pyrene-induced lung injury possibly via stimulating the Nrf2 signalling pathway [J]. *Int Immunopharmacol*, 2021,96:107566.
- (收稿日期:2022-04-20 修回日期:2022-10-30)
- (上接第 485 页)
- [17] WESLEY N, MICHELLE L. Feasibility of surface guided radiotherapy for patient positioning in breast radiotherapy versus conventional tattoo-based setups-a systematic review [J]. *Tech Innov Patient Support Radiat Oncol*, 2022,22:39-49.
- [18] ALEXANDRA B, SARAH E, JASON W, et al. Use of magnetic resonance image-guided radiotherapy for breast cancer; a scoping review [J]. *J Med Radiat Sci*, 2022,69(1):122-133.
- [19] 艾秀清, 王雪, 唐成琼, 等. 乳腺癌保乳术后调强放射治疗不同配准方法摆位精度的临床研究 [J]. *癌症进展*, 2020,18(15):1578-1588.
- [20] 罗惠煌, 童远, 王永斌. 早期左侧乳腺癌术后锥形束 CT 引导下 VMAT 摆位误差致靶区及危及器官受照剂量 [J]. *中外医学研究*, 2020,18(36):66-68.
- [21] CHEN S, LE Q, MUTAF Y, et al. Feasibility of CBCT-based dose with a patient-specific step-wise HU-to-density curve to determine time of replanning [J]. *J Appl Clin Med Phys*, 2017,18(5):64-69.
- [22] 加尔宝·吐尔德, 艾秀清, 阿迪娜·贾库林, 等. 锥形束 CT 引导下乳腺癌保留乳房术后调强放疗摆位误差临床分析 [J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2019,26(10):719-723.
- [23] KAI J B, YANNIS J, MATHIAS D, et al. Impact of CBCT frequency on target coverage and dose to the organs at risk in adjuvant breast cancer radiotherapy [J]. *Sci Rep*, 2021,11(1):17378.
- [24] ZHENHUI D, YIWEN Z, LIN Z, et al. Geometric and dosimetric evaluation of deep learning-based automatic delineation on CBCT-synthesized CT and planning CT for breast cancer adaptive radiotherapy: a multi-institutional study [J]. *Front Oncol*, 2021,11:725507.
- [25] ARIYARATNE H, CHESHAM H, PETTINGELL J, et al. Image-guided radiotherapy for prostate cancer with cone beam CT: dosimetric effects of imaging frequency and PTV margin [J]. *Radiother Oncol*, 2016,121(1):103-108.
- (收稿日期:2022-05-03 修回日期:2023-01-06)